

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 37, NR 3-4, 1991

Kanaly jonowe	122
Nobel '91 dla neurobiologów	128
Fosfocholina a substancje sygnałowe	129
Synapsyny — substraty kinaz białkowych	133
Inhibitory aktywatorów plazminogenu	139
Mucyna	146
Mukowiscydoza	153
Syntetyczne immunomodulatory	159
Hormon juvenilny	172
Sprawozdanie z działalności P. T. Bioch.	181
Nagrody P. T. Bioch.	182
Prenumerata	183
Bio-telefony	okładka

oferuje:

odczynniki diagnostyczne
i biochemiczne

(ceny katalogowe)



Boehringer Mannheim GmbH

odczynniki chemiczne

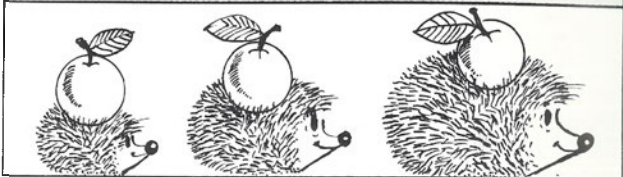
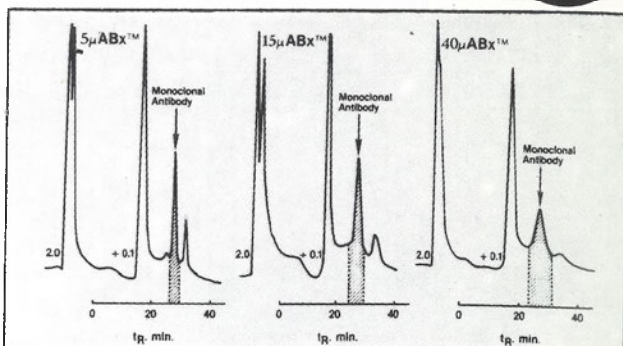
(ceny katalogowe)

Riedel-de Haën

Über 160 Jahre Erfahrung in der Chemie

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

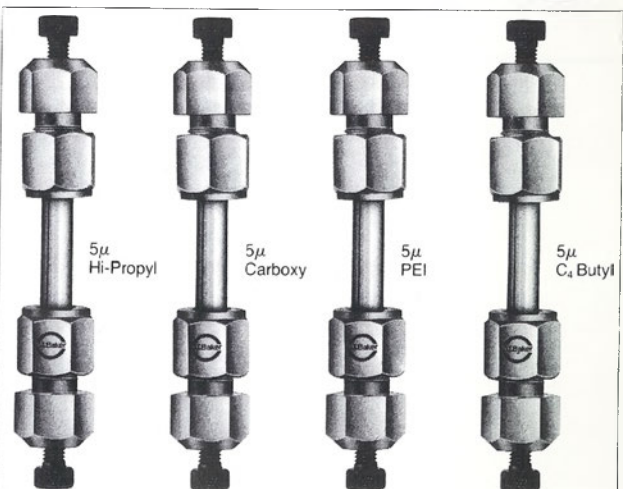
**Jednakowa powierzchnia
wszystkich ziaren
BAKERBOND**



Szeroka gama zastosowań faz BAKERBOND

Chemicznie związane fazy do chromatografii ciecowej BAKERBOND niezależnie od granulacji krzemionki 5 µm, 15 µm, 40 µm, mają zawsze jednakowe chemiczne pokrycie powierzchni. Jednolitość pokrycia grupami funkcyjnymi jest gwarantowana dla wszystkich serii produkcyjnych. Umożliwia to uzyskiwanie stałych wyników oraz łatwość przejścia od procedury analitycznej, poprzez rozdział preparatywny do oczyszczania na skalę przemysłową. Informacje szczegółowe: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne, skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. 81 31 40, tlx 88 53 67 zab, fax 81 52 83 (Skład celny ul. Tylna 3)

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



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

Wybór metody + krótka analiza HPLC

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

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

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland

Oficyna wydawnicza
BIO-TEXT sp. z o. o.
Dantego 1/49
01-914 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board

REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 49-04-15
JACEK KUŹNICKI
tel. 659-31-43
fax: (22) 22-53-42
BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
Adam Dubin
(Kraków)
Konrad Famulski
(Warszawa)
Danuta Hulanicka
(Warszawa)
Marian Mordarski
(Włocław)
Barbara Oderfeld-Nowak
(Warszawa)
Grażyna Palamarczyk
(Warszawa)
Jolanta Skangiel-Kramka
(Warszawa)
Zofia Zielińska
(Warszawa)

ADRES REDAKCJI

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

Spis treści: Contents:

Budowa kanałów jonowych: rodziny strukturalne Ion channel structural families JANINA KWIATKOWSKA	122
Nobel '91 dla neurobiologów STANISŁAW GŁĄŻEWSKI	128
Indukowany przez substancje sygnałowe rozpad fosfatydylocholiny a przekazywanie informacji w komórce Receptor-mediated phosphatidylcholine breakdown in intracellular signaling JOLANTA BARAŃSKA, MAŁGORZATA CZARNY	129
Synapsyny — endogenne substraty kinaz białkowych mózgowia Synapsins — endogenous substrates for protein kinases of brain ZBIGNIEW, HRABEC, LILLA LACHOWICZ	133
Inhibitory aktywatorów plazminogenu Plasminogen-activator inhibitors MARIA ŚWIĄTKOWSKA, MAŁGORZATA WILCZYŃSKA, CZESŁAW S. CIERNIEWSKI	139
Śluz i mucyna — problem biochemiczny i medyczny Mucus and mucin — a biochemical and medical problem ANDRZEJ GINDZIENSKI, KRZYSZTOF ZWIERZ	146
Molekularne podłoże mukowiscydozy Molecular basis of cystic fibrosis JERZY BAL	153
Syntetyczne immunomodulatory wzorowane na naturalnych produktach mikroorganizmów Synthetic immunomodulators designed on the basis of naturally occurring microbial products PIOTR ROMANOWSKI, KRYSZYNA DZIERZBIĆKA, ANDRZEJ MYŚLIWSKI, ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK	159
Owadzi hormon juvenilny. Synteza, degradacja oraz oddziaływanie na poziomie komórkowym i tkankowym Insect juvenile hormone. Synthesis, degradation and interaction on the cell and tissue level JOANNA MICHALIK	172
Konkurs Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	179
Sprawozdanie z Międzynarodowej Zimowej Szkoły FEBS/EMBO	180
Sprawozdanie z działalności P. T. Bioch. w 1991 r.	181
Nagrody P. T. Bioch. przyznane w 1991 r.	182
Prenumerata	184
Bio-telefony	okładka

Budowa kanałów jonowych: rodziny strukturalne

Ion channel structural families

JANINA KWIATKOWSKA¹

Spis treści:

- I. Krótki rzut oka na historię badań
- II. Kanały zależne od potencjału błony (napięciowo-zależne)
 - II-1. Kanał sodowy
 - II-2. Kanał wapniowy (wiązący dihydropirydynę)
 - II-3. Kanał potasowy z *Drosophila*
- III. Kanały „bramkowane” przez ligandy
 - III-1. Nikotynowy receptor acetylocholinowy
 - III-2. Receptor GABA_A
 - III-3. Receptor glicyny
 - III-4. Receptor glutaminianu (podtyp kainianowy)
- IV. Czy istotnie dwie rodziny strukturalne?

Contents:

- I. Short history of studies
- II. Voltage-dependent channels
 - II-1. Sodium channel
 - II-2. Calcium channel (dihydropyridine binding)
 - II-3. Potassium channel from *Drosophila*
- III. Ligand-gated channels
 - III-1. Nicotinic acetylcholine receptor
 - III-2. GABA_A receptor
 - III-3. Glycine receptor
 - III-4. Glutamate receptor (kainate subtype)
- IV. Are there two structural families?

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; GABA_A-R — receptor GABA, typu A; Glu-R — receptor glutaminianu; Gly-R — receptor glicyny; nACh-R — nikotynowy receptor acetylocholinowy.

I. Krótki rzut oka na historię badań

Już przed 40 laty zaczęto łączyć proces pobudzenia nerwowego ze zmianami przepuszczalności błony dla jonów. Pojawiły się przypuszczenia, że istnieją specjalne białka błonowe, tworzące kanały, selektywnie przewodzące jony. Przez blisko 20 lat udział takich białek był raczej przedmiotem spekulacji niż konkretnych badań. Za pomocą metod biofizycznych uzyskano natomiast wiele informacji o cechach charakteryzujących przewodnictwo i o elektrofizjologicznych aspek-

tach zjawiska. Dane te wskazywały na występowanie dwu typów kanałów o odmiennym mechanizmie „bramkowania”: napięciowo-zależnych (zależnych od potencjału błonowego — voltage-gated) oraz „bramkowanych” przez ligandy (zależnych od neurotransmiterów i hormonów — ligand-gated). Właściwe biochemiczne badania kanałów czekały jednak na znalezienie nowych technik. Przewrót w tej dziedzinie zapoczątkowało znalezienie selektywnych inhibitorów kanałów: tetrodotoksyny, wiążącej się z kanałem sodowym oraz α -bungarotoksyny — z nikotynowym receptorem cholinergicznym. Za ich pomocą wydzielono, oczyszczono, a następnie zcharakteryzowano oba te białka. Ustalono ich skład podjednostkowy i sekwencję fragmentów łańcuchów polipeptydowych. Metody stosowane w tych badaniach są bardzo żmudne i pracochłonne, a ilość uzyskiwanego białka — znikoma. Błyskawiczny postęp w badaniach strukturalnych datuje się od 1982 r., kiedy to do badania kanału sodowego zastosowano techniki biologii molekularnej. Znajomość sekwencji aminokwasowej fragmentów łańcucha polipeptydowego jednej z podjednostek umożliwiła syntezę polinukleotydowych znaczników segregujących, a za ich pomocą — wydzielenie mRNA, uzyskanie cDNA i klonowanie go. Analiza sekwencji cDNA pozwoliła na wydedukowanie sekwencji aminokwasów w białku. Produkty transkrypcji klonowanych genów reagowały z przeciwciałami przeciw oczyszczonym podjednostkom kanału sodowego. Za pomocą metod klonowania zbadano następnie i oznaczono budowę kilku innych kanałów jonowych. Profile hydropatyczne i przewidywane struktury II-rzędowe tych białek, sporządzane na podstawie sekwencji aminokwasowej dały wgląd w topografię kanałów w błonie, pozwoliły określić kolejność regionów hydrofilnych i hydrofobowych oraz położenie fragmentów transmembranowych. Wprowadzając cDNA lub mRNA do komórek nie posiadających danego kanału uzyskiwano dowody na to, że istotnie kodują funkcjonujące kanały jonowe. Zazwyczaj używa się do tego celu oocytów *Xenopus*. W ten sposób udało się m. in. ustalić, które podjednostki są niezbędne dla funkcji kanału. W miarę coraz lepszego poznawania struktury

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

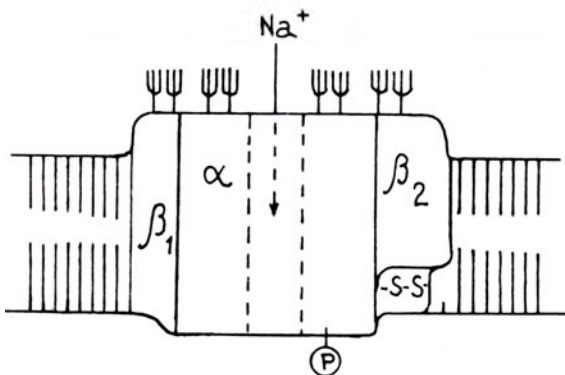
i topologii kanałów wyłoniła się koncepcja, zgodnie z którą podział na kanały napięciowo-zależne i ligan-do-zależne nosi nie tylko funkcjonalny, ale i strukturalny charakter. Każdy z tych dwu typów kanałów miałby tworzyć rodzinę (podrodzinę) strukturalną, kodowaną przez geny wywodzące się od wspólnego genu-przodka [1-4].

II. Kanały zależne od potencjału (napięciowo-zależne)

Kanały te cechuje wyraźna zależność przewodnictwa od potencjału błonowego, wysoka selektywność względem jonów oraz przewodnictwo pojedynczego kanału rzędu 10^7 jonów/sek.

II-1. Kanał sodowy

Oczyszczone i dobrze zdefiniowane preparaty kanałów sodowych otrzymano z organów elektrycznych *Torpedo* i *Electrophorus electricus*, z mięśni różnych gatunków ssaków, z mózgu wołu i szczura. Kanał z organu elektrycznego zbudowany jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 250 kDa. W skład kanału z mięśni wchodzi podjednostki α o M_r około 260 kDa i β_1 (MW = 38 kDa). Kanał z mózgu jest heterotrimerem, składa się z podjednostek α (260 kDa), β_1 (36 kDa) i β_2 (33 kDa) [5-7]. Badania rekonstrukcyjne wykazują, że dla przewodnictwa jonów we wszystkich wymienionych kanałach wystarcza jedna podjednostka (w kanale z mięśni i mózgu — α). Tworzy ona ściany pory jonowej. Pozostałym podjednostkom przypisuje się rolę modulatoryjną i regulatorową, przy czym β_2 z mózgu zdaje się mało istotna dla przewodnictwa [8, 9]. Pozakomórkowe regiony białek kanału są obficie glikozylowane, a zawartość reszt cukrowych dochodzi w niektórych przypadkach do 30% masy cząsteczki. Cytoplazmatyczne kinazy białkowe A katalizują fosforylację wewnątrzcząsteczkowych regionów podjednostki α .



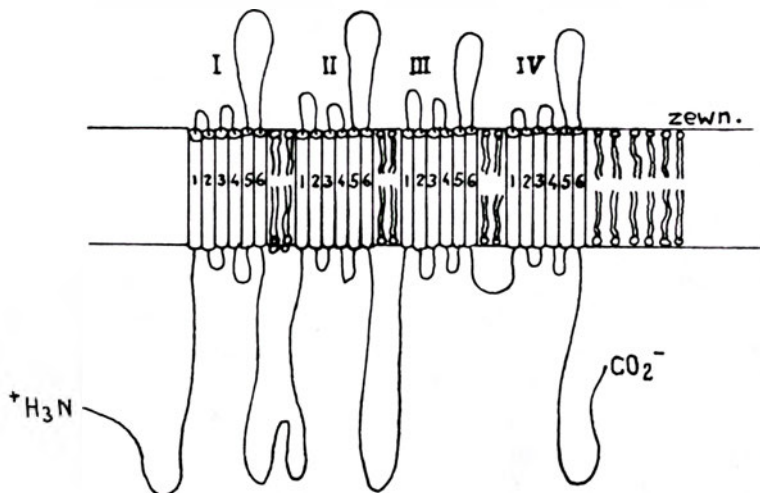
Ryc. 1. Budowa podjednostkowa kanału sodowego. Ψ — miejsca glikozylacji, \textcircled{P} — miejsce fosforylacji (w/g [7])

Ryc. 2. Budowa podjednostki α kanału sodowego. Cyframi arabskimi oznaczono segmenty transmembranowe, rzymskimi — domeny.

Określenie obszarów glikozylacji i fosforylacji oraz badania immunologiczne pozwoliły na zaproponowanie modelu ułożenia podjednostek w błonie (patrz Ryc. 1).

Na podstawie sekwencjonowania cDNA, kodującego funkcjonalny kanał sodowy poznano pełną sekwencję aminokwasową kanału z organu elektrycznego (1832 reszty) oraz trzech typów podjednostek α z mózgu szczura (2008-2012 reszt) [10]. Dane te poddano analizie pod względem profilu hydropatyczności, przewidywanej struktury II-rzędowej i zachowania określonych sekwencji w różnych regionach cząsteczki. Na tej podstawie skonstruowano model podjednostki α . Występują w niej 4 domeny o wysokiej homologii wewnętrznej (tzw. powtarzające się regiony). Pora kanału znajduje się w centrum pseudosymetrycznej osi tych domen. W każdej domenie mieści się 6 hydrofobowych, α -helikalnych segmentów, dostatecznie długich, by tworzyć odcinki transmembranowe, zwane S1.....S6. S1, S2 i S3 zawierają aminokwasy o ujemnym ładunku, zaś S4 są bogate w reszty zasadowe. Jak widać na Ryc. 2, N- i C-końce cząsteczki, pętle między domenami oraz odcinki hydrofilne łączące segmenty S2 z S3 oraz S4 z S5 leżą po cytoplazmatycznej stronie błony, a odcinki między S1 i S2 oraz S5 i S6 — po jej stronie zewnętrznej. W podjednostce α z mózgu pętle łączące domenę I i II są dłuższe niż w białku z narządu elektrycznego [11-14]. Model ten uzyskuje coraz więcej dowodów doświadczalnych.

Porę przewodzącą Na^+ wyścielają segmenty S4 wszystkich 4 domen. Jak otwiera się kanał sodowy? Uważa się, że reszty Arg w segmencie S4 tworzą spiralną wstęgę dodatnich ładunków wokół rdzenia helisy. Reszty te są stabilizowane dzięki powstawaniu par jonowych pomiędzy dodatnimi ładunkami S4, a ujemnymi ładunkami reszt segmentów S1, S2 i S3. Oddziaływania te są trwałe, gdy potencjał błonowy wynosi około — 80 mV. Kanał jest wtedy zamknięty. Przy depolaryzacji błony następuje poślizg S4 wzdłuż spirali i obrót o 60° . Tworzą się nowe pary jonowe, co inicjuje kolejne zmiany konformacyjne we wszystkich domenach. Prowadzi to do przemieszczenia conajmniej 4 ładunków reszt aminokwasowych przez błonę,



a następnie otwarcia kanału. Taki sekwencyjny model wydaje się zgodny z kinetyką aktywacji kanału: przeniesienie ładunków odbywa się natychmiast po depolaryzacji błony, a przepływ jonów dopiero po pewnym czasie [2, 7]. Po ustaniu depolaryzacji kanały Na^+ spontanicznie przechodzą w stan zamknięty, co z kolei ułatwia repolaryzację błony. Przypuszcza się, że fragment łańcucha, charakteryzujący się wrażliwością na wewnątrzkomórkowe proteazy, a więc leżący po stronie cytoplazmatycznej zamyka kanał. Istotnie, przeciwciała skierowane przeciw krótkiemu fragmentowi łańcucha (tzw. SP19), leżącemu po wewnętrznej stronie błony hamuje zamykanie kanału. Wysunięto koncepcję „tetrahedrycznej cząstki blokującej”: w czasie otwierania kanału po jego wewnętrznej stronie odsłania się ujemnie naładowana reszta aminokwasowa. Przy zamykaniu kanału fragment SP19, obdarzony dodatnim ładunkiem oddziałuje z tą resztą, blokując kanał [4, 15, 16].

II-2. Kanał wapniowy (wiązący dihydropirydynę)

Kanał ten należy do tzw. typu 2 kanałów wapniowych L, generujących prądy o długich czasach trwania, występującego w tkankach kurczliwych. Dihydropirydyna, która jest inhibitorem tego kanału, wiąże się z nim po zewnętrznej stronie błony. Wykorzystując swoistość tego wiązania, wydzielono kanał z mięśni szkieletowych ssaków. Kanał Ca^{2+} jest pentamerem, składa się z dwu dużych podjednostek: α_1 (175 kDa) i α_2 (143 kDa), oraz trzech małych: β (54 kDa), γ (30 kDa) i δ (27 kDa). Duże podjednostki oraz γ mają charakter hydrofobowy i ułożone są transmembranowo. Podjednostka β połączona jest z α_1 i ułożona na stronie cytoplazmatycznej, a δ łącząca się z α_2 — po stronie zewnętrznej błony. Podjednostki α_2 , γ i δ ulegają glikozylacji, a α_1 i β — fosforylacji. Kinazy białkowe A aktywują przepływ Ca^{2+} . Pora przewodząca jony mieści się w podjednostce α_1 . Oczyszczona i wbudowana w liposomy podjednostka ta tworzy aktywny kanał [17, 18]. Model budowy podjednostkowej kanału Ca^{2+} pokazano na Ryc. 3.

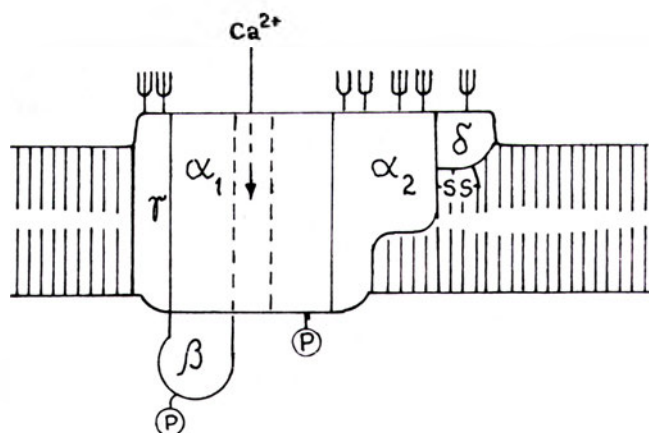
I-rzędową strukturę dużych podjednostek poznano na podstawie sekwencji cDNA. α_1 składa się z 2005 reszt aminokwasowych, z tego 29% identycznych, a dalszych 36% — chemicznych analogów reszt podjednostki kanału sodowego. W α_1 kanału Ca^{2+} występują 4 powtarzające się domeny, a w każdej z nich — 6 segmentów transmembranowych. Model skonstruowany na podstawie profili hydropatycznych wykazuje zdumiewające podobieństwo do kanału Na^+ . Ułożenie N- i C-końców oraz hydrofilnych pętli łączących domeny i segmenty wewnątrz domen jest identyczne w obu kanałach, jedynie C-końcowa hydrofilna domena kanału Ca^{2+} jest większa niż w kanale Na^+ . Porę kanału wyścielają segmenty S4. Przypuszczalnie mechanizm otwierania i zamykania kanału jest podobny do kanału Na^+ [7, 19, 20].

II-3. Kanał potasowy z *Drosophila*

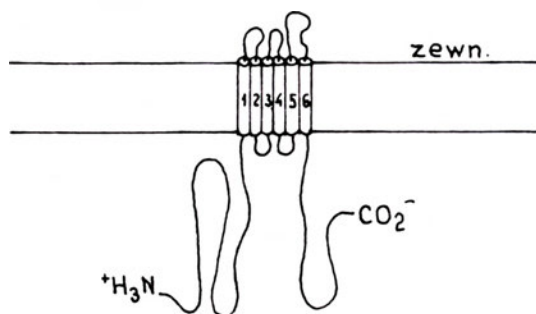
Kanał ten, generujący w neuronach *Drosophila* szybki, hamujący prąd potasowy o właściwościach prądów A, zbudowany jest z kilku stosunkowo niewielkich, przypuszczalnie homologicznych podjednostek [21]. Klony cDNA z jednego locus genetycznego tworzą co najmniej 7 mRNA, można więc sądzić, że istnieją różne podtypy kanału K^+ . Białko, kodowane przez jeden z podtypów mRNA składa się z 616 reszt aminokwasowych, z czego 27% jest identycznych, a dalszych 20% chemicznie podobnych do reszt domeny IV kanału Na^+ z narządu elektrycznego *Torpedo*. Profile hydropatyczne kanału K^+ wskazują na obecność 6 lub 7 segmentów transmembranowych, o ułożeniu i sposobie połączenia pętliami hydrofilnymi przypominającymi kanały Na^+ i Ca^{2+} (patrz Ryc. 4). Porę przewodzącą jony K^+ tworzą przypuszczalnie segmenty S4 kilku podjednostek. Sekwencja tego segmentu odznacza się wysoką homologią z S4 podjednostek α kanałów sodowych i wapniowych [7, 22].

III. Kanały „bramkowane” przez ligandy

Kanały „bramkowane” przez ligandy (neurotransmitery) są zarazem ich receptorami. Przyłączenie liganda powoduje otwarcie kanału i przepływ jonów. Nie-



Ryc. 3. Budowa podjednostkowa kanału wapniowego. Ψ — miejsca glikozylacji, Ⓟ — miejsca fosforylacji (w/g [7]).



Ryc. 4. Budowa kanału potasowego z *Drosophila*. Cyframi oznaczono segmenty transmembranowe.

które z tych kanałów, jak np. receptor glutaminianu, podtyp NMDA, wymagają dla swej funkcji, oprócz przyłączenia liganda także depolaryzacji błony.

Informacja od neurotransmitera do kanałów może być też przekazywana pośrednio: za pośrednictwem białek G (np. z muskarynowego receptora cholinergicznego na kanał potasowy serca, z receptora β -adrenergicznego na kanał Ca^{2+} serca), lub przekaźników wtórnych i kinaz białkowych (np. z receptora β_1 noradrenergicznego i H_1 histaminowego za pomocą cAMP, z α -adrenergicznego — za pomocą cGMP na kanały kationowe [23]). Obecnie znamy budowę dwu kanałów kationowych „bramkowanych” przez ligandy: nikotynowego receptora acetylocholiny (nACh-R) i receptora glutaminianu (Glu-R) oraz dwu kanałów anionowych: receptora GABA typu A- (GABA_A -R) i receptora glicyny -(Gly-R).

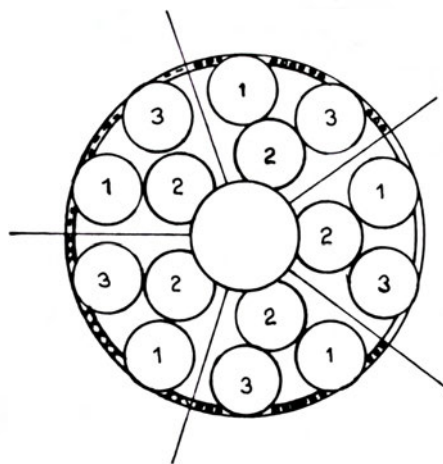
III-1. Nikotynowy receptor acetylocholiny

Ten najwcześniej i najlepiej poznany z kanałów „bramkowanych” przez ligandy został wydzielony z narządu elektrycznego *Torpedo* i *Electrophorus* oraz z mięśni i mózgu ptaków i ssaków. W każdym przypadku nACh-R jest pentamerem, zbudowanym z 4 rodzajów podjednostek: α , β , δ i γ lub ϵ , o MW 50-60 kDa każda. Są one kodowane przez odrębne geny. W rodzimym receptorze występują dwie podjednostki α i po jednej z pozostałych. Wprowadzając mRNA podjednostek do oocytów *Xenopus* przekonano się, że aktywny kanał musi zawierać 4 rodzaje podjednostek. Ma on budowę $\alpha_2 \beta \delta \gamma$ lub $\alpha_2 \beta \delta \epsilon$ [24, 25]. Sądząc z badań krystalograficznych, podjednostki układają się w błonie na podobieństwo klepek w beczce. Kanał wystaje o około 5,5 nm nad zewnętrzną i 2,5 nm nad cytoplazmatyczną powierzchnią błony. Podjednostka β leży między dwiema α [26].

Badając odmiany podjednostek, uzyskane drogą ukierunkowanej mutagenyzy cDNA wysnuto przypuszczenie, że miejsce wiążące acetylocholiny (ACh) mieści się na podjednostce α . Autorzy zastrzegają się jednak, że utrata zdolności wiązania ACh przez kanały zawierające mutanty α może być też, następstwem zmiany oddziaływań między α , a właściwą domeną wiążącą. Podjednostce δ przypisuje się wpływ na czas trwania otwarcia kanału. Kanały wydzielone z *Torpedo* i te z mięśni cieląt wykazują bardzo podobne przewodnictwo pojedynczego kanału i stechiometrię wiązania ACh, ale różnią się czasem przepływu prądu. Przy $1 \mu\text{M}$ stężeniu ACh czas ten wynosi 0,6 msek w kanale z *Torpedo* i 7,6 msek dla kanału z mięśnia cielęcigo. Wprowadzając do oocytów *Xenopus* mRNA podjednostek z obu źródeł w różnych kombinacjach przekonano się, że nACh-R składający się z podjednostek $\alpha \beta \gamma$ z *Torpedo* i δ z mięśni wykazuje taki sam czas przepływu, jak kanał z mięśnia cielęcigo. Za różnicę okresu przepływu jest przypuszczalnie odpowiedzialny 20-aminokwasowy odcinek łańcucha polipeptydowe-

go, którym różnią się podjednostki δ z obu źródeł [27]. Podjednostka ϵ występuje w receptorze z mięśni dorosłych zwierząt, zaś γ — w mięśniach rozwijających się i po odnerwieniu. Receptory $\alpha_2 \beta \delta \epsilon$ występują prawie wyłącznie w płytce końcowej, mają większe przewodnictwo pojedynczego kanału i krótszy czas otwarcia niż receptory $\alpha_2 \beta \delta \gamma$ rozsiane po całej powierzchni komórek w rozwijających się mięśniach [28, 29].

Pierwszorzędową strukturę podjednostki α z *Torpedo* określono na podstawie sekwencji cDNA w 1982 r. W ślad za tym poznano budowę pozostałych podjednostek nACh-R z *Torpedo*, mięśni i mózgu ssaków oraz γ i δ z mięśni ptaków [30-32]. Wszystkie podjednostki wykazują znaczną homologię sekwencyjną. Na podstawie profili hydropatycznych uzyskano następujący obraz topografii cząsteczek: N-końiec leży po zewnętrznej, a C-końiec po cytoplazmatycznej stronie błony. Przy N-końcu mieści się duża, hydrofilna, glikozylowana domena, następnie grupa trzech blisko siebie położonych segmentów transmembranowych M1, M2 i M3, połączonych za pomocą dużej, hydrofilnej, cytoplazmatycznej pętli z hydrofobowym segmentem M4 przy C-końcu. Nie potwierdziły się przypuszczenia o istnieniu M5 [19, 33]. Przypuszcza się, że obszar wiązania ACh mieści się w N-końcowej domenie. We wszystkich podjednostkach znajduje się w niej odcinek o bardzo konserwatywnej budowie: 2 reszty Cys oddalone od siebie o 14 reszt (w α są to Cys-128 i Cys-142), a między nimi, w określonych odległościach reszty Pro i Asp [10, 34]. Uważano, że te właśnie reszty Cys uczestniczą w wiązaniu ACh, ale późniejsze doświadczenia z bramoacetylocholiny wskazują raczej na udział Cys-192 i Cys-193 w wiązaniu liganda [35]. Transmembranowe domeny M1, M2 i M3 wszystkich podjednostek ułożone są pseudosymetrycznie wokół centralnej osi i tworzą porę jonową. Wyścielają ją segmenty M2. M4 nie uczestniczą bezpośrednio w budowie pory [36]. Schemat przekroju kanału pokazano na Ryc. 5.

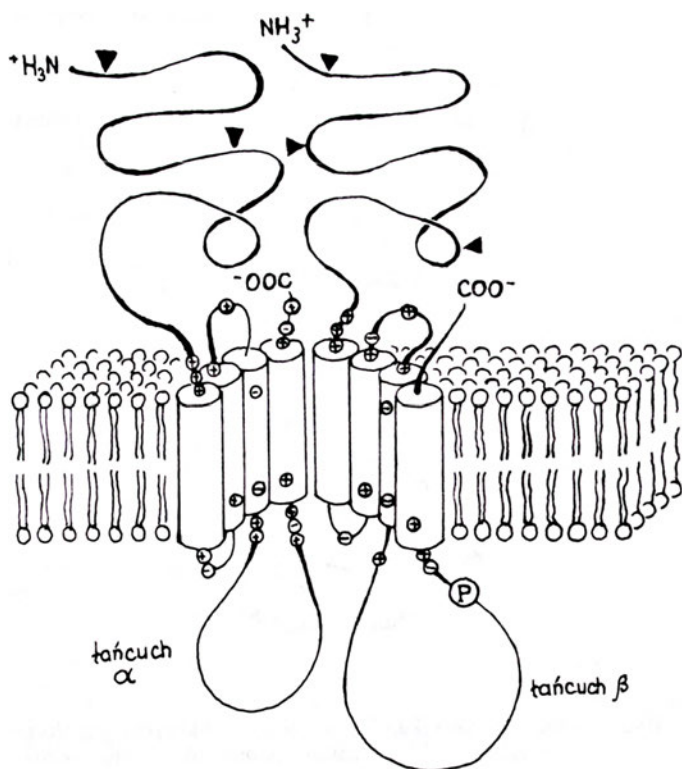


Ryc. 5. Model budowy kanału jonowego w nikotynowym receptorze acetylocholiny (przekrój poprzeczny). Cyframi oznaczono transmembranowe segmenty poszczególnych podjednostek.

Istotną rolę w przewodnictwie kationów przypisuje się ujemnym ładunkom reszt Glu i Asp w pobliżu M2. Wprowadzając transkrypty genów, poddanych ukierunkowanym mutacjom do oocytów wykazano, że usunięcie tych reszt redukuje przewodnictwo kanału proporcjonalnie do liczby usuniętych ładunków. Na tej podstawie Imoto i współautorzy [37] zaproponowali model pory jonowej. Zgodnie z nim, reszty karboksylowe tworzą wokół pory trzy pierścienie ujemnych ładunków. Wchodzące jony muszą przejść przez te pierścienie. Pierścienie u zewnętrznych i wewnętrznych wrót kanału pełnią funkcję filtrów blokujących jony dwuwartościowe, a środkowy - filtru selektywnego właściwych kationów. Hydrofilna domena między M3 i M4, leżąca po stronie cytoplazmatycznej może ulegać fosforylacji. Fosforylacja tej pętli w podjednostkach δ i γ przyspiesza utratę wrażliwości na ligand i odwrócenie receptora [4].

III-2. Receptor GABA_A

Receptor ten wybiórczo wiąże benzodiazepinę, którą wykorzystano dla jego izolacji. GABA_A-R jest tetramerem o budowie $\alpha_2\beta_2$. Oba typy podjednostek są konieczne dla funkcji. Podjednostka α (53 kDa) zawiera 456 reszt aminokwasowych, a β (57 kDa) — 474 reszty. Stopień homologii i substytucji strukturalnej obu podjednostek wynosi ponad 50%. W obu podjednostkach duże, hydrofilne domeny N-końcowe leżą pozakomórkowo. W podjednostce α , wiążącej benzodiazepinę domena ta ma dwa, a w podjednostce β , wiążącej GABA — trzy obszary glikozylacji. W obu podjednostkach są po cztery domeny transmembranowe M1...M4. Pętla łącząca M3 z M4 w β ulega



Ryc. 6. Budowa dimeru receptora GABA_A. ▼ — miejsca glikozylacji.

fosforylacji. Zgodnie z modelem pokazanym na Ryc. 6 domeny transmembranowe wszystkich podjednostek stanowią ściany pory jonowej, przewodzącej Cl⁻. Światło pory wynosi 5,6 Å. Krystalograficzne badania przemawiają jednak za tym, że tylko M1, M2 i M3 uczestniczą w budowie pory, zaś M4 leży na powierzchni błony. Dodatkowo naładowane reszty aminokwasowe, znajdujące się przy końcach segmentów transmembranowych tworzą wewnętrzne i zewnętrzne filtry anionów. Przypuszcza się, że przyłączenie GABA tak zmienia konformację podjednostki β i α , że dodatnie reszty stają się bardziej eksponowane, domena M1 przesuwa się, umożliwiając otwarcie kanału. Obecność reszt Pro w M1, warunkująca giętkość tego segmentu przemawia za tą możliwością [38].

III-3. Receptor glicynowy

Wydzielono go z mózgu kilku gatunków ssaków. Gly-R jest glikoproteiną, składa się z trzech łańcuchów polipeptydowych o M_r równych 48 000, 58 000 i 93 000. Podjednostka 48 K wiąże glicynę. 48 K i 58 K są ułożone transmembranowo i to one tworzą rdzeń kanału, wewnątrz którego mieści się pora jonowa. Prawdopodobnie podjednostki te powstały z wspólnego genu-przodka. 93 K jest białkiem peryferyjnym, leży po cytoplazmatycznej stronie błony. Topografia 48 K wykazuje duże podobieństwo do podjednostek nACh-R i GABA_A-R. Duża, N-końcowa domena leży na zewnętrznej stronie błony, cząsteczka ma cztery domeny hydrofobowe, wykazujące około 60% homologii strukturalnej z odpowiednimi domenami GABA_A-R. Duże fragmenty N-końcowej domeny wykazują także duże podobieństwo do receptorów GABA_A i nACh. Dotyczy to szczególnie odcinków łańcucha wokół „konserwatywnych” reszt Cys. W Gly-R są to Cys-140 i Cys-154. Przypuszcza się, że tworzą one mostki S-S, istotne dla zachowania III-rzędowej struktury regionu N-końcowego. Wewnętrzną, hydrofilną ścianę kanału tworzą M1, M2 i M3, bogate w reszty polarne. Dla przepływu jonów szczególne znaczenie mają M1 i M2. Reszty Pro, znajdujące się w M1 nadają temu segmentowi giętkość strukturalną. Przekrój kanału, podobnie jak cechy przewodnictwa anionów wykazują duże podobieństwa do receptora GABA_A. Ogólna homologia sekwencyjna obu kanałów przekracza 50%. W stosunku do nACh-R sięga ona jedynie 27%-29%, ale w niektórych odcinkach łańcucha jest znacznie wyższa. Topografia Gly-R jest analogiczna jak w GABA_A-R i nACh-R [39].

III-4. Receptor glutaminianu (podtyp „kainianowy”)

Transkrypt cDNA, otrzymanego z neuronów, wprowadzony do oocytów daje czynny kanał kationowy o farmakologicznych właściwościach receptora glutaminianu, należącego do podtypu „wiążącego kainian” (nowe dane opisują ten receptor jako receptor typu AMPA).

W odróżnieniu od innych kanałów wiążących ligandy, dla pełnienia funkcji wystarczy mu jeden typ podjednostki. Jej MW wynosi 99 769 Da, co czyni ją największym z dotychczas poznanych łańcuchów polipeptydowych budujących kanały „bramkowane” przez ligandy [40]. Przypuszcza się, że *in vivo* kanał jest homooligomerem. Nie jest jednak wykluczone, że w neuronach występuje on w połączeniu z innymi podjednostkami, które jednak nie są niezbędne dla funkcji. Przeciwciała przeciw białku wiążącemu kainian z mózdzku kurczęcia, o MW = 49 000, rozpoznają białko z mózgu o M_r 92 500. Być może te dwie podjednostki uczestniczą w budowie kanału. Przeciwciała przeciw białku 48 K z mózgu żaby reagują z białkiem 99 K z mózgu szczura [41].

Sekwencja aminokwasowa Glu-R, otrzymana na podstawie budowy cDNA z mózgu szczura, wykazuje zaskakująco niską homologię z podjednostką α nACh-R, α -receptora GABA_A i 48 K — Gly-R. W N-końcowej domenie Glu-R brak odcinka o konserwatywnej budowie, tak charakterystycznego dla pozostałych kanałów. Jest w nim tylko jedna reszta Cys, a reszty Pro i Asp występują w innych pozycjach. Wyższy stopień homologii da się zauważyć w domenach transmembranowych. Jest ich cztery: TMD1, TMD2 i TMD3, zawierające po około 20 reszt aminokwasowych leżą blisko siebie. W TMD1 reszta proliny zajmuje 12 pozycję, identycznie jak w M1 kationowego kanału nACh-R (w obu chlorkowych — 8-mą). W TMD2 15 reszt ma identyczne położenie jak w M2 conajmniej jednej podjednostki pozostałych poznanych kanałów „bramkowych” przez ligandy. Podobnie jak w tych ostatnich, TMD4 Glu-R leży przy C-końcu. Podobieństwa strukturalne TMD1 i TMD2 do M1 i M2 pozostałych kanałów pozwalają przypuszczać, że pełnią one podobną rolę w funkcji kanału [40].

IV. Czy istotnie dwie rodziny strukturalne?

Większość badaczy przychyliła się do koncepcji głoszącej, że istnieją dwie rodziny strukturalne kanałów jonowych, z których każda wywodzić się może z wspólnego genu-przodka. Kanały napięciowo-zależne wykazują znaczną homologię sekwencyjną, szczególnie wysoką w segmentach wyścielających porę jonową. Dla funkcji tych kanałów wystarcza jeden typ podjednostki nawet w białkach oligomerycznych. Ma ona charakterystyczną topografię: N- i C-końce łańcucha, oraz pętle łączące transmembranowe segmenty ułożone są jednakowo we wszystkich kanałach. Każda ma 6 domen transmembranowych tworzących 1 motyw na podjednostkę, jak w kanale K⁺ lub 4 powtarzające się motywy, jak w kanałach Na⁺ i Ca²⁺. Przypuszcza się, że pierwotny jest gen kodujący kanał potasowy, występujący już w drożdżach, podczas gdy kanał wapniowy pojawia się dopiero u wyższych protozoa, a sodowy jest obecny jedynie w organizmach wielo-

komórkowych. Te dwa ostatnie kanały mogą więc być produktami genów, powstałych drogą duplikacji pierwotnego genu kanału K⁺ [7].

Kanały „bramkowane” przez ligandy charakteryzuje obecność dużej N-końcowej domeny na powierzchni błony, trzech blisko siebie położonych segmentów transmembranowych, tworzących porę jonową, oraz dużej pętli cytoplazmatycznej, łączącej te segmenty z czwartą domeną hydrofobową u C-końca. W tej grupie kanałów, homologia sekwencyjna w obrębie kanałów kationowych oraz kanałów anionowych jest wyższa, niż między nimi.

Ostatnio niektórzy autorzy zalecają ostrożniejsze podejście do koncepcji rodzin strukturalnych. Niska homologia Glu-R w stosunku do pozostałych kanałów „bramkowych” przez ligandy, oraz małe podobieństwo sekwencyjne kanałów kationowych do anionowych stawia pod znakiem zapytania pochodzenie kanałów wiążących ligandy od wspólnego genu-przodka. Uważa się też, że występowanie określonej liczby domen transmembranowych (6 — w kanałach napięciowo-zależnych, 3 — w „bramkowych” przez ligandy) budujących porę jonową może być wyrazem istnienia wzorców strukturalnych o bardziej podstawowym znaczeniu niż specjalizacja funkcjonalna. Być może obecność 3, 4, czy 6 domen stanowi minimalny wymóg zakotwiczenia białek w błonie, zapewniający właściwy współczynnik dyfuzji lateralnej i oddziaływanie z innymi składnikami błony [42].

Zapewne zbadanie większej liczby kanałów obu typów przyniesie odpowiedź na te wątpliwości. Jakkolwiek byłoby jednak podłoże podobieństw, zgodzić się należy, że kanały napięciowo-zależne oraz „bramkowane” przez ligandy wykazują dwa charakterystyczne, odmienne od siebie wzorce topograficzne ułożenia w błonie, cechujące wszystkie kanały w obrębie danej grupy.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1991 r.

Zaakceptowano do druku 11 lipca 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Sakmann B., Neher E., (1983), Single Channel Recording, Plenum, New York.
2. Hille B., (1984), Ionic Channels of Excitable Membranes, Sinauer Assoc. Sunderland, Mass.
3. Talvenheimo J.A., (1985), *J. Membr. Biol.* 87: 77-91.
4. Krueger B.K., (1989), *FASEB J.* 3: 1906-1914.
5. Miller J.A., Agnew W.S., Levinson S.R., (1983), *Biochemistry* 22: 462-470.
6. Caterall W.A., (1986), *Ann. Rev. Biochem.* 55: 953-985.
7. Caterall W.A., (1988), *Science* 242: 50-61.
8. Wollner D.A., Messne D.J., Caterall W.A., (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 14709-14715.
9. Schmidt J.W., Caterall W.A., (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 13713-13723.
10. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y., Hirose T., Asai M., Inayama S., Miyata T., Numa S., (1982), *Nature* 299: 793-797.
11. Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M., Numa S., (1986), *Nature* 322: 826-828.
12. Noda M., Shimizu S., Tanabe T., Takai T., Kayano T., Ikeda T., Takahashi H., Nakayama H.,

- Kanaoka Y., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Raftery M.A., Hirose T., Inayama S., Hayashida H., Miyata T., Numa S., (1984), *Nature* **312**: 121-127.
13. Kamb A., Iverson L.E., Tanouye M.A., (1987), *Cell* **50**: 405-413.
 14. Baumann A., Krah-Jentgens I., Müller R., Müller-Holtkamp F., Seidel R., Keckemethy N., Casal J., Ferrus A., Pongs O., (1987), *EMBO J.* **6**: 3419-3429.
 15. Vassilev P.M., Scheuer T., Caterall W.A., (1988), *Science* **241**: 1658-1661.
 16. Armstrong C.M., Bezanilla F., (1977), *J. Gen. Physiol.* **70**: 567-590.
 17. Caterall W.A., Seagar M.J., Takahashi M., (1988), *J. Biol. Chem.* **263**: 3535-3538.
 18. Campbell K.P., Leung A.T., Sharp A.H., (1988), *Trends Neurosci.* **11**: 425-430.
 19. Stevens Ch.F., (1987), *Nature* **328**: 198-199.
 20. Flockerzi V., Oeken H.J., Hofmann F., Pelzer D., Cavalie A., Trautwein W., (1986), *Nature* **323**: 66-68.
 21. Papazian D.M., Schwarz T.L., Tempel B.I., Jan Y.N., Jan L.Y., (1987), *Science* **237**: 749-753.
 22. Papazian D.M., Schwarz T.L., Tempel B.I., Timpe L.C., Jan L.Y., (1988), *Ann. Rev. Physiol.* **50**: 379-394.
 23. Nicoll R.A., (1988), *Science* **241**: 545-551.
 24. McCarthy M.P., Earnest J.P., Young E.F., Choe S., Stroud R.M., (1986), *Ann. Rev. Neurosci.* **9**: 383-413.
 25. Mishina M., Kurosaki T., Tobimatsu T., Morimoto Y., Noda M., Yamamoto T., Terao M., Lindstrom J., Takahashi T., Kuno M., Numa S., (1984), *Nature* **307**: 604-608.
 26. Kubalek R., Ralston S., Lindstrom J., Unwin N., (1987), *J. Cell. Biol.* **105**: 9-18.
 27. Sakmann B., Methfessel C., Mishina M., Takahashi T., Takai T., Kurasaki M., Fukuda K., Numa S., (1985), *Nature* **318**: 538-543.
 28. Gu Y., Hall Z.W., (1988), *Neuron* **1**: 117-125.
 29. Mishina M., Takai T., Imoto K., Noda M., Takahashi T., Numa S., Methfessel C., Sakmann B., (1986), *Nature* **321**: 406-411.
 30. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Furutani Y., Hirose T., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S., (1983), *Nature* **302**: 528-532.
 31. Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Kikyotani S., Hirose T., Asai M., Takashima H., Inayama S., Miyata T., Numa S., (1983), *Nature* **301**: 251-255.
 32. Noda M., Ikeda T., Kayano T., Suzuki H., Takashima H., Kurasaki M., Takahashi H., Numa S., (1986), *Nature* **320**: 188-192.
 33. Ratnam M., Le Nguyen D.L., Rivier J., Sargent P.B., Lindstrom J., (1986), *Biochemistry* **25**: 2633-2649.
 34. Kosower E.M., (1987), *Eur. J. Biochem.* **168**: 431-449.
 35. Karlin A., Kao P.N., DiPola M., (1986), *Trends Pharmacol. Sci.* **7**: 304-308.
 36. Sanchez J.A., Bani J.A., Siemen D., Hille B., (1986), *J. Gen. Physiol.* **87**: 985-1001.
 37. Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Konno T., Nakai J., Bujo H., Mori Y., Fukuda K., Numa S., (1988), *Nature* **335**: 645-648.
 38. Shofield P.R., Darlinson M.G., Fujita N., Burt D.R., Stephenson F.A., Rodrigue H., Rhee L.M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T.A., Seeburg P.H., Barnard F.A., (1987), *Nature* **328**: 221-227.
 39. Grenningloh G., Rienitz A., Schmitt B., Methfessel C., Zensen M., Beyreuther K., Gundelfinger E.D., Betz H., (1987), *Nature* **328**: 215-220.
 40. Hollmann M., O'Shea-Greenfield A., Rogers S.W., Heinemann S., (1989), *Nature* **324**: 643-648.
 41. Hampson D.R., Wheaton K.D., Dechesne C.J., Wenthold R.J., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 13329-13335.
 42. Maelicke A., (1988), *Trends Biochem. Sci.* **13**: 199-202.

Nobel '91 dla neurobiologów

Tegoroczną Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii przyznano dwóm uczonym niemieckim (pracującym w Niemczech) Erwinowi Neherowi i Bertowi Sakmannowi. Istota ich odkrycia zawarta jest w ustępie pracy opublikowanej przez nich w 1976 r. (*Nature* Vol. 260 April 29 1976): „*We report on a more sensitive method of conductance measurement which, in appropriate conditions, reveals discrete changes in conductance that show many of the features that have been postulated for single ionic channels*”. Sens i znaczenie tej niesłychanie trudnej techniki postaram się w bardzo ogólnej formie przedstawić poniżej.

Błona komórki pobudliwej jest spolaryzowana elektrycznie. W sytuacji „bez bodźca” napięcie w poprzek błony jest stałe (spoczynkowy potencjał błony), a jego poziom zależy od równowagi pomiędzy jej przewodnością dla odpowiednich jonów, a tych jonów aktywnym transportem. Zmiany w poziomie napięcia błonowego (hiper- lub depolaryzacja) są konsekwencją zmian przewodności błony komórkowej; te zaś są możliwe ze względu na obecność w niej rozmaitych kanałów jonowych, zarówno, tych napięciowo-zależnych jak i regulowanych przez receptory. Zmiany przewodności błony komórkowej dla określonych jonów są więc najbardziej pierwotną formą odpowiedzi komórki na działający bodziec.

Pomiar zmian przewodności był, rzecz jasna, możliwy na długo przed odkryciem wyskokozłej metody rejestracji przez tegorocznych laureatów Nobla, lecz ograniczony co do rozdzielczości. Zmiany te monitorowano wprowadzając szklaną elektrodę do wnętrza komórki i mierząc wartość prądu jaką trzeba do niej „wstrzyknąć”, w wyniku działania bodźca, aby utrzymać stały potencjał błony. W tych warunkach można otrzymać wypadkowy profil

zmian w natężeniu prądu płynącego przez wszystkie aktywowane bodźcem kanały jonowe badanej komórki. Wysoki poziom szumu w stosunku do rejestrowanego sygnału nie pozwalał jednak na uzyskanie rozdzielczości na poziomie pojedynczego kanału jonowego.

Generalnie rzecz biorąc Neherowi i Sakmannowi przyznano Nagrodę Nobla za opracowanie techniki poprawiającej stosunek sygnału do szumu, a w konsekwencji rozdzielczości na tyle, że stał się możliwy pomiar wartości prądu płynącego przez pojedynczy kanał jonowy. Technika ta w swojej pierwotnej formie polegała na elektrycznej izolacji małego obszaru błony komórkowej przy pomocy specjalnie przygotowanej szklanej elektrody (tzw. *patch clamp*) i pomiarze prądu płynącego przez *patch*, klasyczną opisaną już wyżej metodą.

Technikę tę znacznie usprawniono w ciągu minionych 15 lat wprowadzając między innymi (Neher 1981) konfigurację znaną pod nazwą *giga-seal* co oznacza, że wartość oporności kontaktu elektrody i błony zawiera się w przedziale gigaomów. Trzeba dodać, że właśnie od oporności tego kontaktu zależy rozdzielczość metody. Możliwe stało się również zastosowanie tej techniki w skawkach oraz *in vivo*. Oprócz niesłychanie dużej rozdzielczości (natężenie prądu jonowego płynącego przez pojedynczy kanał jonowy nie jest większe do kilku pikoamperów) technika ta umożliwia znacznie łatwiejszą i dokładniejszą niż w przypadku klasycznych technik elektrofizjologicznych kontrolę środowiska wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego.

Technika *patch-clamp* w swojej nowoczesnej postaci umożliwia bardzo precyzyjne pomiary transmisji synaptycznej i jej kwantyfikację oraz badanie mechanizmów działania leków na poziomie pojedynczych kanałów jonowych zarówno na zewnętrznej jak i wewnętrznej powierzchni błony komórkowej.

WARSZAWA 12.10.1991 r.

STANISŁAW GŁAZEWSKI
INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
im. M. NENCKIEGO PAN w WARSZAWIE

Indukowany przez substancje sygnałowe rozpad fosfatydylocholine a przekazywanie informacji w komórce***

Receptor-mediated phosphatidylcholine breakdown in intracellular signaling

JOLANTA BARAŃSKA¹
MAŁGORZATA CZARNY²

Wykaz stosowanych skrótów: Ch — cholina; DG — diacyloglicerol; IP₃ — inozytolo-1,4,5-trisfosforan, nazwa potoczna trisfosfoinozytol; PA — kwas fosfatydowy; PC — fosfatydylocholina; PCh — fosfocholina; PIP₂ — fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforan.

Wtórne przekaźniki informacji: diacyloglicerol (DG) i trisfosfoinozytol (IP₃) powstające w komórce w wyniku hydrolizy fosfolipidów inozytolowych są od kilku lat w centrum uwagi badaczy. W ostatnim czasie pojawiły się doniesienia wskazujące, że nie tylko te fosfolipidy są źródłem wtórnych przekaźników informacji. Za taki fosfolipid jest obecnie także uważana fosfatydylocholina (PC) [1-3].

Znaczenie IP₃ i DG w układach przetwarzania informacji, mechanizm ich działania, jak również czynniki pobudzające hydrolizę fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu (PIP₂) są omówione dokładnie w licznych artykułach dostępnych zarówno w obcojęzycznej [4, 5] jak i polskiej prasie naukowej¹⁾. Powszechnie zatem wiadomo, że związki te powstają w wyniku interakcji substancji sygnałowych ze swoistymi receptorami znajdującymi się na zewnętrznej powierzchni błon plazmatycznych. Sygnał odbierany przez receptor jest przekazywany poprzez białka wiążące GTP (białka G)²⁾ na określony efektor. W przypadku fosfolipidów inozytolowych jest nim specyficzna fosfolipaza C działająca hydrolitycznie na PIP₂. Powstały w wyniku hydrolizy DG pozostaje w błonie

plazmatycznej aktywując kinazę białkową C³⁾. Natomiast IP₃ przechodzi do cytoplazmy i jest odpowiedzialny za wewnątrzkomórkową mobilizację jonów Ca²⁺. IP₃ i DG ulegają ponadto licznym przekształceniom metabolicznym. Nasz poprzedni artykuł⁴⁾ dotyczył metabolicznych przekształceń polifosfoinozytoli, a także oddziaływania IP₃ ze specyficznym receptorem znajdującym się w błonie endoplazmatycznego retikulum.

Odkrycie, że pod wpływem substancji sygnałowych następuje nie tylko hydroliza PIP₂, lecz również hydroliza PC, zawdzięczamy między innymi stwierdzeniu, że ilość uwolnionego DG przewyższa wielokrotnie zawartość znajdującego się w komórce PIP₂ [6]. Należało zatem oczekiwać, że powstający pod wpływem substancji sygnałowych DG pochodzi także z hydrolizy innych niż PIP₂ fosfolipidów. Przypuszczano początkowo, że takimi związkami mogłyby być inne fosfolipidy inozytolowe [6]. Przeprowadzona analiza składu kwasów tłuszczowych występujących w cząsteczce DG wykazała jednak największe podobieństwo do kwasów tłuszczowych występujących w cząsteczce PC [2, 7]. Materiałem do badań w tych doświadczeniach były między innymi stymulowane cholinergicznie komórki trzustki [8], oraz hepatocyty poddawane działaniu wazopresyny [9]. Badając rodzaje molekularne DG powstające w komórkach tucznych, fibroblastach i hepatocytach stymulowanych różnymi agonistami wykazano również, że po-

¹⁾ doc. dr hab., ²⁾ mgr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

*** Poniższy tekst stanowi treść wykładu wygłoszonego na Sympozjum „Błony biologiczne”, zorganizowanym przez Katedrę Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego w czerwcu 1991 roku.

¹⁾ patrz: Kwiatkowska J. (1986), *Post. Biochem.* **32**: 329-334; Nowak JZ (1988), *Kosmos* **37**: 339-378; Wiekł H, Strosznajder J (1988), *Post. Biol. Kom.* **15**: 1-23

²⁾ patrz: Kwiatkowska J (1988), *Post. Biochem.* **34**: 123-130

³⁾ patrz: Kwiatkowska J (1988), *Post. Biochem.* **35**: 253-263

⁴⁾ patrz: Poddana H, Barańska J (1991), *Post. Biochem.* **37**: 2-5

chodzą one z innych źródeł niż PIP_2 — najprawdopodobniej z rozpadu PC [2].

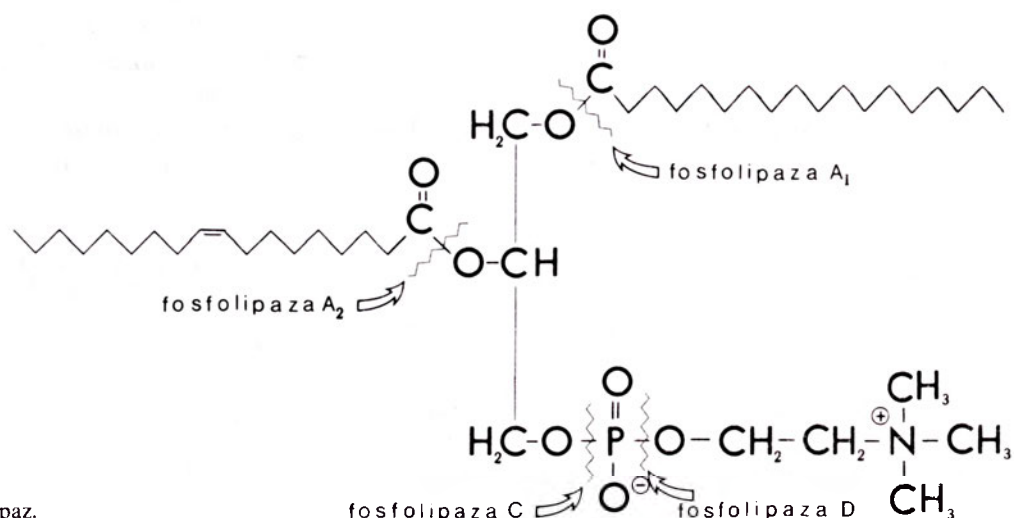
Bezpośrednie dowody świadczące o hydrolizie PC pod wpływem substancji sygnałowych pochodzą z doświadczeń, w których granulocyty HL-60, leukocyty i hepatocyty inkubowano z $[^3H]$ alkyl-2-lizo-glicero-3-fosfocholimą [10-12]. Związek ten łatwo wnika do wnętrza komórek, gdzie ulega acylacji poprzez endogenne kwasy tłuszczowe tworząc PC z radioaktywnym kwasem tłuszczowym związanym z cząsteczką glicerolu wiązaniem eterowym. Pod wpływem peptydów chemotaktycznych, wazopresyny, angiotensyny II, czy jonoforu A23187, w komórkach pojawiał się radioaktywny kwas fosfatydowy (PA) i radioaktywny DG, pochodzące z hydrolizy uprzednio utworzonego, radioaktywnego PC. W innych doświadczeniach inkubowano różne rodzaje komórek z $[^3H]$ cholimą co prowadziło do syntezy radioaktywnej PC, a następnie komórki poddawano działaniu określonych substancji sygnałowych [2]. Dodatek agonisty powodował rozpad PC i uwolnienie $[^3H]$ choliny i $[^3H]$ fosfocholiny. Powyższe dane doświadczenia świadczyły o hydrolizie PC i sugerowały, że zachodzi ona zarówno pod wpływem fosfolipazy C, jak i fosfolipazy D.

Rycina 1-sza przedstawia schemat cząsteczki PC i działające na nią fosfolipazy. Fosfolipazy A odszczepiają kwasy tłuszczowe; fosfolipaza A_1 — nasycone, a fosfolipaza A_2 — nienasycone kwasy tłuszczowe, w tym kwas arachidonowy — prekursor prostaglandyn. Fosfolipaza C powodująca hydrolizę PC różni się szeregiem właściwości od tej działającej na PIP_2 . Wykazano, że w różnych tkankach ssaków, a także w pojedynczej komórce, znajduje się wiele izoenzymów fosfolipazy C [2, 13]. Działanie hydrolityczne tego enzymu na cząsteczkę PC prowadzi do powstania DG i fosfocholiny (PCh), podczas gdy fosfolipaza D powoduje powstanie PA i choliny (Ch). DG może przy udziale kinazy diacyloglicerolowej i ATP ulegać fosforylacji do PA, a ten pod wpływem fosfohydrolazy

ulega defosforylacji, co prowadzi z powrotem do powstania DG.

Występowanie w komórkach zwierzęcych fosfolipazy C jest znane od dawna. Natomiast fosfolipaza D przez długie lata uważana była za enzym nie występujący w świecie zwierząt. W latach 70-tych, Kanfer i współautorzy [14] wykazali jednak jego obecność w mikrosomach wielu badanych tkanek, a doniesienia ostatnich lat wskazują, że enzym ten występuje powszechnie w błonach plazmatycznych komórek ssaków [3]. Znajdująca się w błonach fosfolipaza D działa głównie na PC. Enzym ten charakteryzuje się ponadto jemu tylko przypisywaną zdolnością do prowadzenia tzw. reakcji transfosfatydylacji. W reakcji tej, w obecności etanolu, czy innych prostych alkoholi, następuje wymiana zasady azotowej fosfolipidu (PC) na alkohol i powstają fosfatydyloalkohole. Ponieważ związki te normalnie w komórkach zwierzęcych nie występują, ich utworzenie świadczy niezbicie o aktywności fosfolipazy D. Dlatego, w prowadzonych w ostatnim okresie doświadczeniach, inkubowano różne rodzaje komórek z substancjami sygnałowymi i etanolem [3]. Obserwowano nie tylko wyraźne zmniejszenie zawartości PC i zwiększenie PA, lecz także pojawienie się nowego związku — fosfatydyloetanolu. Wyniki tych badań nie pozostawiają wątpliwości, że fosfolipaza D oddziałuje na znajdujący się w komórkach PC. Lista substancji sygnałowych indukujących działanie fosfolipazy D jest obszerna [3]. Między innymi znajdują się na niej peptydy chemotaktyczne, ATP i jonofory wapniowe, czynniki wzrostowe, wazopresyna i adrenalina, oraz syntetyczne diacyloglicerole i estry forbolu.

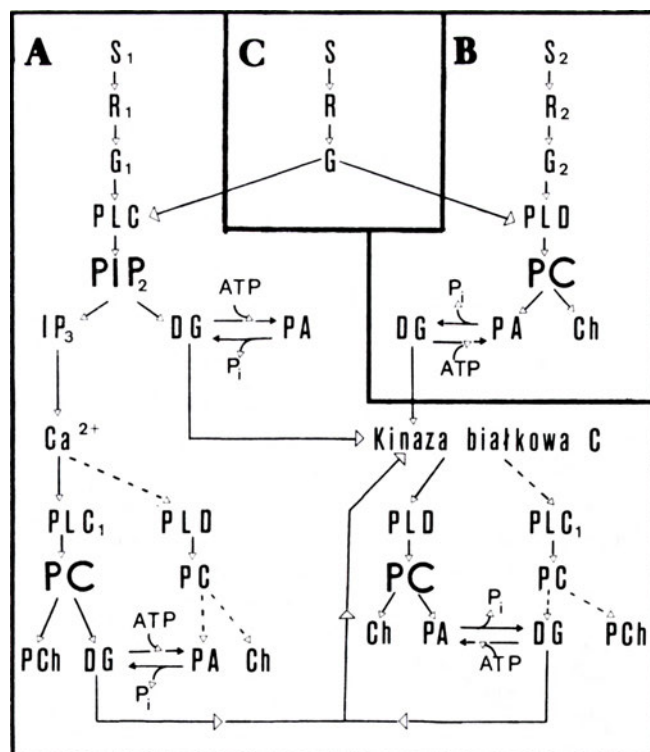
Syntetyczne DG wnikają do komórki i tak jak endogenne DG aktywują kinazę białkową C. Podobnie działają estry forbolu, będące analogami DG, znane jako stymulatory procesu nowotworowego. Oddziaływanie tych związków na PC, a także agonistów mobilizujących wewnątrzkomórkowy Ca^{2+} , pozwala przypuszczać, że proces hydrolizy tego fosfolipidu jest włączony w układ przetwarzania infor-



Ryc. 1. Schemat cząsteczki PC i działających na nią fosfolipaz.

macji związany z hydrolizą fosfolipidów inozytolo-
wych. Rycina 2A przedstawia prawdopodobną kolej-
ność wydarzeń prowadzących do rozpadu PC przez
fosfolipazę aktywowane przez kinazę białkową C i jo-
ny Ca^{2+} . Proces hydrolizy PC byłby zatem wtórny
wobec hydrolizy PIP_2 . Istotnie, w fibroblastach
REF52 [15] poddawanych działaniu wazopresyny
obserwowano rozpad PIP_2 do IP_3 i DG w ciągu kilku
sekund od podania agonisty i równie szybki powrót
poziomu DG do kontrolnego. Następnie pojawiał się
PA i znowu DG. Podwyższony poziom DG utrzyma-
wał się teraz przez okres znacznie dłuższy, trwający od
kilku do kilkunastu minut. To dwufazowe pojawia-
nie się DG w komórce odpowiada zatem dwóm procesom
hydrolitycznym następującym po sobie — hydrolizie
 PIP_2 , a potem PC. Uważa się, że utrzymujący się przez
dłuższy okres wzrost poziomu DG jest spowodowany
aktywacją przez ten związek kinazy białkowej C, która
następnie aktywuje fosfolipazę działającą na PC (Ryc.
2A). Świadczą o tym obserwacje uzyskane w bada-
niach, w których hepatocyty [7], czy pierwotną hodo-
wę astrocytów [16] poddawano działaniu estrów
forbolu. Wykazano także, że inhibitory kinazy biał-
kowej C — staurosporyna i związek H7 powodowały
zahamowanie uwalniania PA, a w obecności etanolu,
zahamowanie powstawania fosfatydyloetanolu [15,
16]. Dokładne badania nad produktami degradacji PC
w komórkach astrocytoma [17] i fibroblastach REF52
[15], stymulowanych karbacholem, wazopresyną i es-
tarami forbolu, pozwalają przypuszczać, że kinaza biał-
kowa C aktywuje fosfolipazę D, podczas gdy wzrost
stężenia jonów Ca^{2+} aktywuje fosfolipazę C (Ryc. 2A).

Inne badania wskazują, że hydroliza PC może
zachodzić nie tylko na powyższej drodze pośredniej,
lecz także bezpośrednio, t.j. z ominięciem hydrolizy
 PIP_2 (Ryc. 2B). W doświadczeniach prowadzonych na
licznych rodzajach hodowli komórkowych wykazano
bowiem, że nie ulegający hydrolizie analog GTP działa
stymulująco na rozpad PC [2]. Analog GTP aktywuje
białko G. Wydaje się, że białka te mogą oddziaływać
bezpośrednio na fosfolipazę D hydrolizującą PC (Ryc.
2B). Przekonywujące doświadczenia świadczące o tym
mechanizmie wykonano używając błon plazmatycz-
nych hepatocytów [7]. Błony te inkubowano z analogiem
GTP i [^{32}P]ATP, a następnie badano radioaktywność
powstającego PA i wykazano, że związek ten
nie był radioaktywny. Oznaczało to, że PA nie powstał
z PIP_2 , ani z innych fosfolipidów z udziałem fos-
folipazy C. Jednocześnie, jedyne zmiany w składzie
fosfolipidów błon dotyczyły zmniejszenia zawartości
PC, podczas gdy zawartość PIP_2 pozostawała nie
zmieniona. Podobny brak odpowiedzi PIP_2 , a rozpad
PC obserwowano w limfocytach T i fibroblastach IIC9
pod wpływem interleukiny I i naskórkowego czynnika
wzrostowego [2]. Powstały w wyniku tego procesu
DG aktywuje także kinazę białkową C (Ryc. 2B).
Aktywacja ta następuje bez jednoczesnej mobilizacji
jonów Ca^{2+} .



Ryc. 2. Hipotetyczne mechanizmy aktywacji fosfolipaz działających hydrolitycznie na PC.

A. Mechanizm pośredni włączający aktywację specyficznej fosfolipazy C (PLC) hydrolizującej PIP_2 do DG i IP_3 . Substancja sygnałowa (S_1) reaguje z receptorem (R_1) przekazując informację na białko G (G_1) będące bezpośrednim aktywatorem PLC. W wyniku hydrolizy PIP_2 powstaje IP_3 , który aktywuje kinazę białkową C, a IP_3 zwiększa stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie uwalnając go z wewnątrzkomórkowych magazynów. Kinaza białkowa C aktywuje głównie fosfolipazę D (PLD), a jony Ca^{2+} fosfolipazę C (PLC_1) będącą innym izoenzymem niż ten działający na PIP_2 . PLC_1 powoduje rozpad PC do DG i PCh, podczas gdy PLD hydrolizuje PC do PA i Ch. Reakcja fosforylacji przekształca DG w PA i jest odwracalna.

B. Mechanizm bezpośredni wyłączający hydrolizę PIP_2 . Substancja sygnałowa (S_2) oddziałuje na receptor (R_2), który poprzez białko G (G_2), działa aktywująco na fosfolipazę D (PLD) hydrolizującą PC.

C. Mechanizm regulowany przez białko G. Sygnał (S) z receptora (R) przechodzi poprzez białko(a) G bądź na PLC działającą na PIP_2 , bądź na PLD hydrolizującą PC.

Powstałe we wszystkich reakcjach DG aktywują kinazę białkową C.

Działanie fosfolipazy C na PIP_2 i fosfolipazy D na PC prowadzi do powstania tych samych wtórnych przekazywaczy: DG i PA. Powoduje to, że między omawianymi układami przekazywania informacji istnieją współzależności [3]. Oba układy wydają się być regulowane przez kinazę białkową C i białko G. Jak już powiedziano powyżej, DG uwolniony z PC pod wpływem fosfolipazy D aktywuje kinazę białkową C, która następnie działa stymulująco na tę fosfolipazę — wytwarza się więc dodatnie sprzężenie zwrotne. Natomiast w przypadku hydrolizy PIP_2 powstaje ujemne sprzężenie zwrotne [2]. DG pochodzące z PIP_2 aktywuje kinazę białkową C, ta jednak działa hamująco na fosfolipazę C hydrolizującą fosfolipid inozytolo-
wy. Oddziaływanie regulujące białek G na obydwa układy informacji nie jest jeszcze wyjaśnione.

Gdyby białka G pełniły jednak, jak należy przypuszczać, tę funkcję, to kolejność wydarzeń byłaby następująca (Ryc. 2C): określona substancja sygnałowa działa na receptor, a sygnał z receptora przekazywany jest poprzez białko (a) G bądź na fosfolipazę C hydrolizującą PIP₂, bądź na fosfolipazę D hydrolizującą PC [3]. Można przypuszczać, że w niedługiej przyszłości będzie już możliwe dokładne poznanie mechanizmu tej regulacji.

Efekty fizjologiczne wywołane przez wtórne przekazywanie informacji powstające z PC są szerokie. Znaczenie choliny jako przekaźnika jest jednak jak narazie słabo udokumentowane, choć w ośrodkowym układzie nerwowym jest ona ważnym substratem dla produkcji neurotransmitera — acetylocholiny. Natomiast PA [2, 3] stymuluje rozpad PIP₂ do IP₃, działa zatem jako przekaźnik powodujący mobilizację Ca²⁺ w komórce. Ponadto działa hamująco na cyklazę adenylową, a aktywująco na fosfolipazę A₂, a więc odpowiada za uwalnianie kwasu arachidonowego. PA ułatwia, w nieznanym jeszcze sposób, wnikanie Ca²⁺ do wnętrza komórki. Egzogenny PA działa na komórki mitogenicznie. Pośród wszystkich funkcji PA najważniejszą jednak wydaje się być produkcja DG w reakcji: PC → PA → DG. W niektórych komórkach, takich jak neutrofile, czy komórki tuczne, droga ta stanowi główną odpowiedź komórki na sygnał [18]. Uwolnienie DG z PIP₂ ma charakter przemijający, podczas

gdym DG powstały z PC, via PA, utrzymuje się dłużej czas na podwyższonym poziomie. Ponieważ główną funkcją DG (bez względu na jego pochodzenie, a więc skład kwasów tłuszczowych) jest aktywacja kinazy białkowej C (Ryc. 2), można sądzić, że DG pochodzący z PC jest włączony w takie wydarzenia, które wymagają przedłużonego działania kinazy białkowej C. Mogą do nich należeć procesy związane ze wzrostem i proliferacją komórek, zmiany w neuronie związane z pamięcią, czy kontrola aktywności kanałów jonowych w błonie plazmatycznej. Być może, różne rodzaje molekularne DG wywierają różne działanie na różne formy izomeryczne kinazy białkowej C. Gdyby tak było, to DG pochodzący z hydrolizy PC mógłby powodować inne następstwa niż DG powstały z PIP₂. Godną uwagi jest także obserwacja, że w niektórych stanach chorobowych następują zmiany w aktywności fosfolipazy D (np. w chorobie Alzheimera następuje jej spadek) [3].

Przy rozważaniu fizjologicznego znaczenia produktów hydrolizy PC indukowanej przez substancje sygnałowe, należy zwrócić uwagę na zasadniczy fakt, którym jest zawartość PC w błonach komórek [1]. Otóż w komórkach organizmów eukariotycznych PC stanowi około 50% wszystkich fosfolipidów błon. Choćby z tego względu, produkty hydrolizy tego fosfolipidu muszą mieć istotne znaczenie w procesach metabolicznych.

Artykuł otrzymano 6 czerwca 1991 r.

Zaakceptowano do druku 27 czerwca 1991 r.

EMBO

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION

SHORT TERM FELLOWSHIPS in molecular biology

The European Molecular Biology Organization awards, to scientists working in Europe and Israel in the field of molecular biology and allied disciplines, short term fellowships of one week up to three months duration. The fellowships are to support collaborative research between laboratories in different countries and provide a travel grant and subsistence allowance. Applications may be made at any time and are decided upon soon after the receipt of application.

Applications for exchanges between laboratories within any one country cannot be considered. Inquiries should be accompanied by a self-addressed adhesive label.

Application forms and further details may be obtained from Dr J. Tooze, Executive Secretary, European Molecular Biology Organization, 69 Heidelberg 1, Postfach 1022. 40, F. R. G.

Piśmiennictwo

1. Pelech S.L., Vance D.E., (1989), *TIBS* **14**: 28-30.
2. Exton J.H., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 1-4.
3. Shukla S.D., Halenda S.P., (1991), *Life Science* **48**: 851-866.
4. Berridge M.J., (1987), *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 159-194.
5. Berridge M.J., Irvine R.F., (1989), *Nature* **341**: 197-205.
6. Majerus P.W., Wilson D.B., Connolly T.H., Bross T.E., Neufeld E.J., (1985), *TIBS* **10**: 168-171.
7. Bocckino S.B., Blackmore P.F., Wilson P.B., Exton J.H., (1987), *J. Biol. Chem.* **262**: 15309-15315.
8. Banschbach M.W., Geison R.L., Hokin-Neaverson M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta* **663**: 34-35.
9. Bocckino S.B., Blackmore P.F., Exton J.H., (1985), *J. Biol. Chem.* **260**: 14201-14207.
10. Pai J.K., Siegel M.J., Egan R.W., Billah M.M., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**: 355-364.
11. Agwu D.E., McPhail L.C., Chabot M.C., Daniel L.W., Wykle R.L., McCall C.E., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 1405-1413.
12. Augert G., Bocckino S.B., Blackmore P.F., Exton J.H., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 21689-21698.
13. Ribec S.G., Suh P.G., Ryu S.H., Lee S.Y., (1989), *Science* **244**: 546-550.
14. Kanfer J.N., (1980), *Can. J. Biochem.* **58**: 1370-1380.
15. Huang C., Cabot M.C., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 17468-17473.
16. Gustavsson L., Hansson E., (1990), *J. Neurochem.* **54**: 737-742.
17. Martinson E.A., Goldstein D., Brown J.H., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 14748-14754.
18. Nozawa Y., Nakashima S., Nagata K., (1991), *Biochim. Biophys. Acta* **1082**: 219-228.

Synapsyny – endogenne substraty kinaz białkowych mózgowia

Synapsins – endogenous substrates for protein kinases of brain

ZBIGNIEW HRABEC¹
LILLA LACHOWICZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Transkrypcja i translacja genów synapsyn
- III. Cechy strukturalne cząsteczek synapsyn
 - III-1. Struktura pierwszorzędowa synapsyn
- IV. Rozmieszczenie synapsyn w neuronie
- V. Fosforylacja synapsyn
 - V-1. Rola synapsyn w ośrodkowym układzie nerwowym

Contents:

- I. Introduction
- II. Transcription and translation of synapsins genes
- III. Structural features of synapsins molecules
 - III-1. Primary level of synapsins organization
- IV. Localization of synapsins in neuron
- V. Phosphorylation of synapsins
 - V-1. Signification of synapsins in the central nervous system

Wykaz stosowanych skrótów:

kb — tysiąc zasad; kDa — kilodalton; PK-A — kinaza białkowa zależna od cAMP; PK-CAM/Ca I — kinaza białkowa II zależna od jonów wapniowych i kalmoduliny; PK-CAM/Ca II — kinaza białkowa II zależna od jonów wapniowych i kalmoduliny; PK-C — kinaza białkowa C.

I. Wstęp

W ośrodkowym układzie nerwowym synapsyny są jedynymi z głównych substratów kinaz białkowych. Białka te stanowią cztery spokrewnione polipeptydy (Ia, Ib, IIa, IIb) o podobnych masach cząsteczkowych (86 kDa, 80 kDa, 74 kDa, 55 kDa) i wykazują zbliżoną sekwencję aminokwasową. Synapsyny będące białkami powierzchniowymi głównie małych pęcherzyków synaptycznych są specyficzne dla zakończeń presynaptycznych komórek nerwowych. Synapsyna I stanowi około 0.4%, a synapsyna II 0.2% całej zawartości białka tych komórek. Synapsyna II do niedawna określana była jako białko III mózgowia (IIIa i IIIb)

[1]. Ilościowy skład synapsyn sugeruje, że są one jedynymi z głównych białek komórek mózgowia [2, 3].

Synapsyny są asymetrycznymi białkami składającymi się z dwóch domen: globularnego, opornego na trawienie kolagenazą regionu N-końcowego, oraz silnie wydłużonej, zawierającej dużą ilość reszt proliny domeny C-końcowej, która jest wrażliwa na trawienie kolagenazą [4].

II. Transkrypcja i translacja genów synapsyny

W roku 1985 wykazano istnienie dwóch rodzajów mRNA kodujących synapsynę I. Początkowo określono ich wielkość na 4.5 kb i 5.8 kb [5]. Zastosowanie dokładniejszych wzorców pozwoliło uściślić te wartości i określić je na 3.4 kb i 4.5 kb [6]. Gen synapsyny I zlokalizowano w roku 1986. U myszy i człowieka znajduje się on na chromosomie X w postaci pojedynczej kopii, a zatem dwa rodzaje dojrzałego mRNA powstają w wyniku alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu [7]. Badania ilościowe obu rodzajów mRNA wykazały, że mRNA o wielkości 4.5 kb występuje praktycznie od momentu urodzenia do 10 dnia po urodzeniu, po czym jego poziom spada poniżej granicy detekcji; natomiast ilość mRNA o wielkości 3.4 kb zwiększa się pięciokrotnie pomiędzy 7 a 20 dniem po urodzeniu. Biologiczne znaczenie alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu jest niejasne. Możliwe, że jeden z rodzajów mRNA jest formą występującą w życiu płodowym osobnika, a drugi jest charakterystyczny dla organizmów dojrzałych. Możliwe jest też, że transkrypty te pojawiają się w różnych stosunkach ilościowych w zależności od rodzaju neuronu. Obie hipotezy wymagają jednak potwierdzenia doświadczalnego [6].

Początkowo sądzono, że każdy z typów mRNA koduje jeden rodzaj synapsyny I tzn. Ia lub Ib [5]. Jednak eksperymentalnie stwierdzono, że jedynie transkrypt o wielkości 3.4 kb jest wytwarzany w sposób ciągły od momentu urodzenia aż do okresu

¹ Mgr, ² prof. dr hab., II Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.

dojrzałego. Natomiast oba rodzaje synapsyny (Ia i Ib) występują w stałym stosunku molowym wynoszącym 1:2 podczas wszystkich okresów rozwojowych mózgowia [8]. Fakty te skłoniły do przyjęcia hipotezy, że obie synapsyny są produktami translacji mRNA o wielkości 3.4 kb (3.4 kb mRNA). Zjawisko to można wyjaśnić w następujący sposób: 3.4 kb mRNA w rzeczywistości składa się z dwu rodzajów mRNA nierozróżnialnych eksperymentalnie (elektroforeza w żelu agarozowym) z powodu bardzo nieznacznej różnicy długości. mRNA synapsyny Ia jest zaledwie o 38 nukleotydów dłuższy niż mRNA synapsyny Ib. Insercja ta powoduje zmianę fazy odczytu mRNA i w związku z tym cząsteczka synapsyny Ia jest o 36 aminokwasów dłuższa od cząsteczki synapsyny Ib, a ich C-końcowe odcinki mają zupełnie różne sekwencje aminokwasowe [9, 10].

Wzrost ilości 3.4 kb mRNA w komórkach ziarnistych mózdzku jest skorelowany z synaptogenezą zachodzącą w aksonach tych komórek [11]. Podobne obserwacje dotyczą ilości synapsyny — jej zawartość osiąga maksimum podczas synaptogenezy zachodzącej w mózgowiu [8, 12]. Poziomą syntezę synapsyny jest wysoki podczas całego życia organizmu, co potwierdza hipotezę, w myśl której połączenia synaptyczne ulegają stałym zmianom [13].

Gen synapsyny II u człowieka znajduje się na chromosomie 3, a wyniku jego transkrypcji oraz obróbki potranskrypcyjnej, podobnie jak w przypadku synapsyny I powstają dwa rodzaje dojrzałego mRNA. Na ich matrycy syntetyzowane są dwa rodzaje synapsyny (IIa i IIb). Różnice sekwencji aminokwasów pomiędzy formą IIa i IIb wynikają z alternatywnego użycia dwóch różnych eksonów podczas przekształcania pierwotnego transkryptu w dojrzały mRNA [9].

III. Cechy strukturalne cząsteczek synapsyny

III.1. Struktura pierwszorzędowa synapsyny

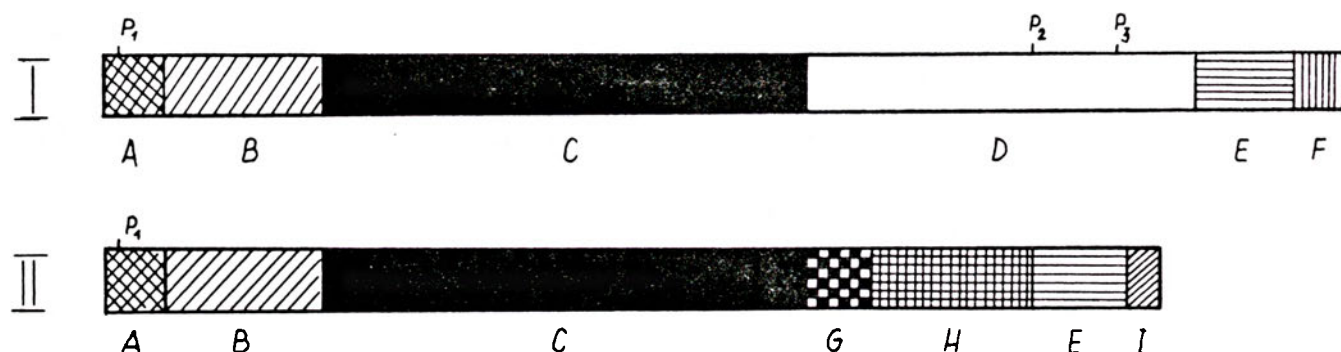
Porównanie sekwencji aminokwasów synapsyny I i synapsyny II pozwala stwierdzić, że białka te

wykazują znaczne podobieństwo. Dotyczy ono około połowy długości cząsteczki. Ponadto, analizując sekwencje aminokwasów synapsyny I i II u różnych organizmów, wykazano że białka te są bardzo konserwatywne, bowiem pomiędzy synapsyną I człowieka i synapsyną I bydła domowego istnieje aż 96% homologii [9].

Schemat budowy białek należących do rodziny synapsyn przedstawiono na rycinie 1. Domeny A, B i C występują we wszystkich synapsynach. Domena A zawiera jedno miejsce fosforylacji (tzw. miejsce I, Ser⁹ w cząsteczce synapsyny I, a Ser¹⁰ w cząsteczce synapsyny II). Domeny A i C są najbardziej podobnymi sekwencyjnie regionami cząsteczki we wszystkich synapsynach. Najmniejszy stopień homologii (w obrębie domen wspólnych dla wszystkich typów synapsyny) wykazuje domena B. W domenie D występującej tylko w synapsynie I, znajdują się dwa miejsca fosforylacji (tzw. miejsce II i III, Ser⁵⁵⁶ i Ser⁶⁰³). Domena ta charakteryzuje się dużą zawartością aminokwasów zasadowych i niezwykle małą ilością aminokwasów kwaśnych, a z powodu dużej zawartości proliny i glicyny znajduje się tu wiele miejsc rozpoznawanych przez kolagenazę [EC 3.4.24.3] [9].

Kolagenaza wykazuje dość dużą specyficzność w stosunku do wiązań peptydowych. Przecina ona wiązanie X-Gli, leżące w obrębie sekwencji X-Gli-Pro. Degradacja synapsyny I pod wpływem kolagenazy zachodzi stopniowo; początkowo powstaje peptyd o masie cząsteczkowej 68 kDa, następnie peptydy o masach 62 kDa i 52 kDa. Ostateczny produkt trawienia ma masę cząsteczkową 46 kDa i odpowiada domenom A-C. Ten oporny na trawienie kolagenazą segment określany jest niekiedy jako „głowa” cząsteczki, a wrażliwy na trawienie kolagenazą C-końcowy odcinek synapsyny I (domeny D i E lub F) nazywany jest „ogonem” [4]. Domeny E oraz F w synapsynie są wynikiem alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu, w związku z tym nie wykazują one podobieństwa [9].

Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczek synapsyny. I — schemat synapsyny I. II — schemat synapsyny II. Domeny oznaczono literami (A-I). Synapsyna Ia zawiera domeny — A, B, C, D i E, synapsyna Ib — A, B, C, D i F, synapsyna IIa — A, B, C, G, H i E, synapsyna IIb — A, B, C, G i I. Część stała (domeny A-C) odpowiada regionowi opornemu na trawienie kolagenazą („głowa”), a część zmienna regionowi wrażliwemu na trawienie kolagenazą („ogon”). P₁, P₂, P₃ — miejsca fosforylacji cząsteczek.



W cząsteczce synapsyny II, domena C graniczy z krótką, zawierającą znaczną ilość proliny domeną G. Podobnie jak w przypadku domen E i F w cząsteczce synapsyny I, domeny H i I w synapsynie II powstają w wyniku alternatywnej obróbki pierwotnego transkryptu. Żaden z typów synapsyny nie wykazuje homologii sekwencyjnej z żadnym zbadanym do tej pory białkiem [9].

IV. Rozmieszczenie synapsyn w neuronie

Synapsyny obecne są w komórkach nerwowych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego. Nie występują natomiast w zauważalnych ilościach w komórkach pozaneuronalnych. Ekspresja tych białek zachodzi wyłącznie w neuronach co wykazano przy pomocy wielu metod analitycznych (immunocytochemicznych, immunoblottingu, *Northern blot analysis* [9, 14]. Natomiast śladowe ilości synapsyn znaleziono w normalnych komórkach endokrynnych [14, 15].

Jedynymi komórkami zaliczanymi do komórek nerwowych, w których nie wykryto synapsyn są komórki zmysłów, takie jak: komórki fotoreceptorowe i dwubiegunowe siatkówki, komórki włoskowate ucha wewnętrznego i komórki smakowe [16, 17, 18].

W obrębie neuronów synapsyny skoncentrowane są w zakończeniach synaptycznych. Znaleziono je we wszystkich zakończeniach aksonalnych neuronów ośrodkowego układu nerwowego kręgowców, układu współczulnego oraz zakończeniach neuronów części nerwowej przysadki [9].

Metodami immunocytochemicznymi wykazano, że w obrębie zakończeń synaptycznych synapsyny nagromadzone są w regionach zawierających znaczną ilość pęcherzyków synaptycznych [19]. Po dokonaniu lizy zakończeń synaptycznych, wszystkie rodzaje synapsyny skupione są na powierzchni pęcherzyków synaptycznych. Nawet podczas otrzymywania frakcji pęcherzyków synaptycznych — metodą ultrawierwienia, synapsyny pozostają związane z nimi. Procedura taka powoduje kilkunastokrotne wzbogacenie preparatu w synapsyny w stosunku do materiału wyjściowego (homogenatu). Stopień oczyszczenia synapsyn jest porównywalny ze stopniem oczyszczenia takich integralnych białek błonowych jak synaptofizyna czy synaptofobryna [20, 21, 22].

Synapsyny związane są tylko z błonami pęcherzyków synaptycznych, co stwierdzono przy użyciu metod immunochemicznych. Przeciwciała skierowane przeciwko poszczególnym rodzajom synapsyny lub przeciwko niektórym epitopom tych białek, reagowały tylko z pęcherzykami synaptycznymi. Wszystkie pozostałe struktury błonowe takie jak: błony zakończeń presynaptycznych, błony siateczki śródplazmatycznej, błony mitochondrialne i błony dużych pęcherzyków o gęstym rdzeniu (*large dense core-vesicles*), nie wiązały się z przeciwciałami [9].

Fakt, że błony pęcherzyków o gęstym rdzeniu nie zawierają synapsyn ma duże znaczenie. Zarówno pęcherzyki synaptyczne jak i pęcherzyki o gęstym rdzeniu są organellami spełniającymi funkcje wydzielnicze, lecz magazynują one różne rodzaje neurotransmiterów. Pęcherzyki synaptyczne zawierają wyłącznie klasyczne neurotransmitery, podczas gdy te drugie uwalniają neuropeptydy. Ponadto różnią się one innymi cechami takimi jak: sposób ich powstawania, lokalizacja miejsc fuzji z błoną presynaptyczną, regulacja uwalniania ich zawartości oraz mechanizm recyklicacji [23]. Można więc uważać je za organelle należące do dwóch różnych szlaków wydzielniczych neuronu.

V. Fosforylacja synapsyn

Synapsyna I jest substratem kinazy białkowej zależnej od cAMP (PK-A), kinazy białkowej I zależnej od jonów wapniowych i kalmoduliny (PK-CAM/Ca I) i kinazy białkowej II zależnej od jonów wapniowych i kalmoduliny (PK-CAM/Ca II). Enzymy te fosforylują reszty serylowe synapsyny. PK-A fosforyluje synapsynę I w obrębie domeny odpornej na trawienie kolagenazą. Domena ta zawiera także miejsce fosforylowane przez PK-CAM/Ca I [21, 24]. W istocie enzymy te fosforylują tę samą resztę serylową (miejsce I, Ser⁹). Synapsyna I jest doskonałym substratem tych kinaz, wykazując do nich wysokie powinowactwo ($K_m = 2 \mu M$). Bardzo duże są także szybkości początkowe tych reakcji [25, 26]. Sekwencja aminokwasów poprzedzająca miejsce I (Arg-Arg-Leu-SerP) jest zgodna z sekwencją aminokwasów rozpoznawaną przez PK-A, w wielu innych substratach [27].

PK-CAM/CA II modyfikuje cząsteczkę synapsyny I w dwóch miejscach (Ser⁵⁶⁶, Ser⁶⁰³), leżących w domenie wrażliwej na kolagenazę. Określane są one jako, miejsce II i III [9, 24]. Sekwencja aminokwasów poprzedzająca oba te miejsca (Arg-Gln-Ala-SerP) jest zgodna z sekwencją rozpoznawaną przez PK-CAM/CA II (Arg-X-Y-SerP/TreP) [27]. Synapsyna I jest najlepszym znanym substratem tej kinazy; stała Michaelisa reakcji fosforylacji tego białka wynosi około $0.4 \mu M$ [21]. Synapsyna I jest wyjątkowo dogodnym substratem wszystkich trzech wymienionych kinaz białkowych, a o jej bardzo dużym powinowactwie do tych enzymów, poza zgodnością sekwencji wokół miejsca fosforylacji, decydują też inne czynniki (struktura drugo- i trzeciorzędowa).

Synapsyna I fosforylowana jest także przez kinazę białkową zależną od czynnika wzrostu nerwu (PK-NGF) w komórkach linii PC 12 (linia komórkowa wywodząca się z pheochromocytomy szczura [28, 29]. W układach bezkomórkowych synapsyna I ulega fosforylacji również pod wpływem kinazy białkowej C (PK-C), jednakże biologiczne znaczenie tego typu fosforylacji jest nieznane [30, 31].

Synapsyna II fosforylowana jest przez PK-A i PK-CAM/CA I. Ma tylko jedno miejsce fosforylacji, znajdujące się w odcinku N-końcowym (Ser¹⁰) [32].

Powinowactwo tych enzymów do synapsyny II jest zbliżone do powinowactwa jakie wykazują one w stosunku do synapsyny I [9, 26]. Synapsyna II nie stanowi substratu dla PK-CAM/Ca II, gdyż jej sekwencja aminokwasowa nie zawiera miejsca rozpoznawanego przez ten enzym [9].

Jak wspomniano powyżej synapsyna I ma trzy miejsca fosforylowane przez kinazy białkowe, a synapsyna II tylko jedno. Stwierdzono, że wstrzyknięcie do zakończenia presynaptycznego nieufosforylowanej formy synapsyny I powoduje gwałtowne zmniejszenie amplitudy i prędkości narastania potencjału postsynaptycznego [33]. Fosforylacja miejsca II i III w cząsteczce synapsyny I (przez PK-CAM/Ca II), powoduje ustąpienie tego efektu, a fosforylacja miejsca I (przez PK-A lub PK-CAM/Ca I) osłabia ten efekt. Biorąc pod uwagę fakt, że jony Ca^{2+} wpływają na fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną, a ponadto modulują uwalnianie ich zawartości do szczeliny synaptycznej [34, 35], można by wyobrazić sobie, że wywołane depolaryzacją błony komórkowej otwarcie kanałów wapniowych i wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , powoduje aktywację PK-CAM/Ca II. Uaktywniona PK-CAM/Ca II fosforyluje cząsteczki synapsyny I (miejsce II i III), co z kolei powoduje zmniejszenie powinowactwa synapsyny I do białek cytoszkieletu i pęcherzyków synaptycznych i pociąga za sobą natychmiastową fuzję pęcherzyków synaptycznych z błoną presynaptyczną. Jednakże, bezpośredni wpływ fosforylacji synapsyny I na wydzielanie neurotransmiterów jest mało prawdopodobny z tego względu, że od momentu otwarcia kanałów wapniowych do uwolnienia zawartości pęcherzyków synaptycznych do szczeliny synaptycznej, upływa zaledwie 200 μs i jest to czas zbyt krótki by mogła zajść enzymatyczna fosforylacja synapsyny I [34]. Synapsyna I w istocie spełnia rolę łącznika pomiędzy białkami cytoszkieletu i pęcherzykami synaptycznymi, a stopień fosforylacji cząsteczki decyduje o trwałości tego połączenia [3]. Wydaje się, że fosforylacja synapsyny I powoduje tylko zwiększenie liczby pęcherzyków synaptycznych zdolnych do natychmiastowego połączenia się z błoną presynaptyczną, natomiast nie wpływa prawdopodobnie na sam proces fuzji.

Funkcjonalne znaczenie PK-A i PK-CAM/Ca I w regulacji uwalniania neurotransmiterów nie zostało w pełni wyjaśnione. Kinazy te fosforylują miejsce „pierwsze” synapsyny I oraz jedyne miejsce fosforylowane w cząsteczce synapsyny II. Fosforylacja tego miejsca powoduje efekty jakościowo podobne do obserwowanych w wyniku fosforylacji miejsca II i III, lecz mniej gwałtowne. Problem ten jest o tyle istotny, że jak wyżej wspomniano miejsce to jest jedynym fosforylowanym miejscem w cząsteczce synapsyny II. W chwili obecnej brak jednakże przekonujących danych dotyczących udziału fosforylacji synapsyny II w procesie uwalniania neurotransmiterów.

V-1. Rola synapsyn w ośrodkowym układzie nerwowym

Funkcjonalne znaczenie synapsyn w neuronie, mimo dużego zainteresowania tymi białkami jest nadal nie w pełni wyjaśnione. Nie ulega wątpliwości, że funkcje ich są ściśle powiązane z procesami fosforylacji. Synapsynie I przypisuje się znaczącą rolę w regulacji uwalniania neuroprzekazników, a mechanizm ten polegać ma na interakcji między synapsyną rozmieszczoną na błonie pęcherzyków synaptycznych a elementami cytoszkieletu [36, 37]. Szczególnie silnie podkreśla się wiązanie synapsyny I z mikrotubulami i F-aktyną [37].

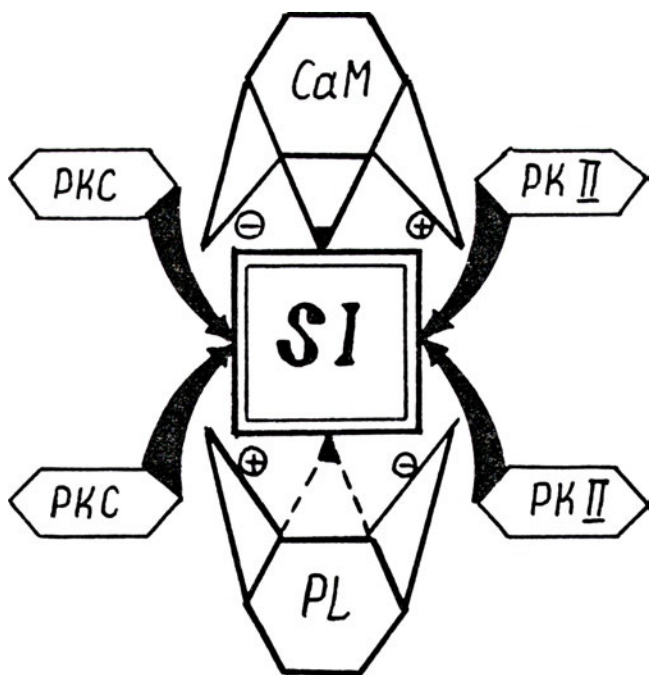
Wykazano również, że białko to reguluje poruszanie się pęcherzyków synaptycznych w aksoplazmie, a efekt ten jest z kolei regulowany fosforylacją synapsyny I przez kinazę białkową II zależną od wapnia i kalmoduliny [38].

Nie wyklucza się jednakże, możliwości fosforylacji synapsyny I przez kinazę białkową C, wykazującą szczególnie wysoką aktywność w komórkach nerwowych. Zakłada się następujący ciąg wydarzeń. Aktywacja szlaku fofatydyloinozytowego prowadzi do przemijającej fosforylacji synapsyny I przez kinazę C oraz do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia wapnia; w efekcie następuje aktywacja kalmoduliny i wzrost fosforylacji zależnej od Ca/kalmoduliny, a równocześnie zahamowanie zależnej od fosfolipidów fosforylacji synapsyny I. W związku z tym zakłada się, że fosforylacja synapsyny I przez PK-C wywiera efekt „wyzwalający” neurosekrecję (*triggering effect*), natomiast fosforylacja katalizowana przez PK CAM/Ca II służy do utrzymania procesu neurosekrecji (Ryc. 2) [30,39].

Badania przeprowadzone na ludzkim mózgowiu potwierdziły, że aktywatory PK-C takie jak kwasy tłuszczowe i kwaśne fosfolipidy hamują wyraźnie aktywność PK CAM/Ca II, podczas gdy stymulator PK CAM/Ca II — kalmodulina — tłumii fosforylację synapsyny I zależną od PK-C [39].

Wydaje się wysoce prawdopodobne, że fosforylacja synapsyny I przez PK-C może być alternatywną drogą regulacji neurosekrecji możliwe, że za pośrednictwem białek G i fosfolipazy A_2 [30].

Ostatnie badania nad wiązaniem synapsyny I z małymi pęcherzykami synaptycznymi wykazały obecność dwóch różnych miejsc interakcji. N-końcowa domena synapsyny I penetruje do warstwy lipidowej błony i współdziała z lipidami, natomiast C-końcowa domena (część „ogonowa”) wydaje się wiązać z komponentą białkową błony pęcherzyków. W badaniach nad subkomórkowym rozmieszczeniem synapsyny I i II wykazano, że N-koniec synapsyny II posiada przynajmniej jedno miejsce wiązania pęcherzyków synaptycznych, które okazało się wrażliwe na działanie trypsyny. Przemawia to za hipotezą, że synapsyna II współdziała z komponentą białkową błony pęcherzyków [22].



Ryc. 2. Wpływ mediatorów komórkowych na fosforylację synapsyny I katalizowaną przez kinazy białkowe zależne od jonów wapniowych. SI — synapsyna I, CaM — kalmodulina, PK II — kinaza białkowa II zależna od jonów wapniowych i kalmoduliny, PKC — kinaza białkowa C, PL — fosfolipidy.

Odkrycie, że fosforylacja synapsyny I przez PK CAM/Ca II obniża powinowactwo synapsyny I do błony pęcherzyków pozwala na wysunięcie hipotezy próbującej wyjaśnić współdziałanie synapsyny I z błoną pęcherzyków; zasadowy „ogon” synapsyny I, który zawiera dwa miejsca fosforylacji przez PK CAM/Ca II, jest w kontakcie z błoną pęcherzyków, podczas gdy globularna „głowa” współdziała z fosfolipidami różnych elementów cytoszkieletu [22].

Synapsyna I może zatem regulować ilość pęcherzyków zdolnych do uwolnienia się i fuzji z błoną presynaptyczną przez odizolowanie ich od cytoszkieletu.

Ostatnio poszerzyły się informacje dotyczące roli synapsyny II. W opublikowanej w roku 1991 pracy Han i współautorzy [40] zamieścili dane dotyczące wpływu synapsyny IIb na różnicowanie się komórki nerwowej. Dokonali oni transfekcji komórek linii NG-105-15 (hybrydowe komórki powstałe po fuzji komórek glejaka i nerwiaka), wektorem ekspresyjnym zawierającym wstawkę (*insert*) kodującą całkowitą sekwencję synapsyny IIb. Nietransfekowane komórki NG-105-15 wykazują bardzo mały stopień ekspresji synapsyny IIb. Komórki zawierające wektor ekspresyjny wraz z cDNA kodującym synapsynę IIb, porównywano następnie z komórkami zawierającymi tylko wektor ekspresyjny (pcDNA1). Na podstawie wykonanych elektronogramów stwierdzono, że komórki do których wprowadzono gen synapsyny IIb, różniły się znacznie pod względem morfologicznym od komórek nietransfekowanych. Zawierały one znacznie wię-

cej małych pęcherzyków, pęcherzyków opłaszczonych oraz dużych pęcherzyków o gęstym (elektronowo) rdzeniu. Zaobserwowano także obecność większej liczby mitochondriów i struktur błonowych przypominających gładką siateczkę śródplazmatyczną. Komórki do których wprowadzono gen synapsyny IIb wytworzyły także znacznie więcej żyłakowatości (*varicosities*) znajdujących się na zakończeniach neuronów. Większa była także ilość połączeń pomiędzy tymi zgrubieniami a komórkami sąsiednimi. Na podstawie tych danych stwierdzono, że komórki do których sztucznie wprowadzono gen synapsyny IIb, wykazywały więcej cech charakterystycznych dla różnicowanej komórki nerwowej i synaptogeneza była w nich bardziej zaawansowana niż w komórkach kontrolnych. Poza zwiększoną ilością synapsyny IIb, komórki te zawierały znacznie większe ilości pozostałych synapsyn (Ia, Ib i IIa) oraz synaptofizyny (integralne białko błony pęcherzyków synaptycznych) [40]. Kwestią otwartą pozostaje problem w jaki sposób podwyższony poziom synapsyny IIb powoduje zwiększenie ilości pozostałych białek oraz jaki jest mechanizm promocji synaptogenezy wywołanej zwiększonym poziomem synapsyny IIb.

Artykuł otrzymano 27 sierpnia 1991 r.

Zaakceptowano do druku 10 października 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Walaas S.J., Browning M.D., Greengard P., (1988), *J. Neurochem.*, **51**, 1214-1220.
2. Kelly R. B., (1991), *Nature*, **349**, 650-651.
3. Nestler E.J., Greengard P., (1986), w *Progress in Brain Research*, t. 69 (red. Gispen W. H., Routtenberg A.), str. 323-339, Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York.
4. Ueda T., Greengard P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5155-5163.
5. Killiman H. W., DeGennaro L. J., (1985), *EMBO J.*, **4**, 1997-2002.
6. Haas C. A., DeGennaro L. J., (1988), *J. Cell Biol.*, **106**, 195-203.
7. Yang-Feng T. L., DeGennaro L. J., Francke U., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8679-8683.
8. DeGennaro L. J., Kanazir S. D., Wallace W. C., Lewis R. M., Greengard P., (1984), *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, **48**, 337-345.
9. Südhof T. C., Czernik A. J., Kao H.-T., Takei K., Johnston P. A., (1989), *Science*, **245**, 1474-1480.
10. Südhof T. C., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 7843-7852.
11. Altman J., (1972), *J. Comp. Neurol.*, **145**, 465-513.
12. Lohmann S. H., Ueda T., Greengard P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3035-3039.
13. Cotman C. W., Nieto-Sampedro M., (1984), *Science*, **225**, 1287-1294.
14. Browning M. D., Huang C.-K., Greengard P., (1987), *J. Neurosci.*, **7**, 847-853.
15. Bähler M., Greengard P., (1987), *Nature*, **326**, 704-707.
16. Favre D., Scarfone E., Di Gioia G., De Camilli P., Dememes D., (1986), *J. Neurosci.*, **8**, 1625-1631.
17. Finger T. E., Womble M., Kinnamon J. C., Ueda T., (1990), *Comp. Neurol.*, **292**, 283-290.
18. Mandell J. W., Townes-Anderson E., Czernik A. J., Cameron R., Greengard P., De Camilli P., (1990), *Neuron*, **5**, 19-33.
19. Valtorta F., Villa A., Jahn R., De Camilli P., Greengard P., Ceccarelli B., (1988), *Neuroscience*, **24**, 593-603.

20. Jahn R., Scheibler W., Quimet C., Greengard P., (1985), *J. Cell Biol.*, **96**, 1374-1388.
21. Huttner W.B., DeGennaro L.J., Greengard P., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1482-1488.
22. Thiel G., Südhof T.C., Greengard P., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 16527-16533.
23. De Camilli P., Jahn R., (1990), *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 625-645.
24. Kennedy M.B., Greengard P., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1293-1297.
25. Huttner W.B., Scheibler W., Greengard P., De Camilli P., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4137-4141.
26. Nairn A.C., Greengard P., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1209-1211.
27. Czernik A.J., Pang D.T., Greengard P., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7518-7522.
28. Hall F.L., Mitchell J.P., Vulliet P.R., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 8183-8189.
29. Romano C., Nichols R.A., Greengard P., (1987), *J. Neurosci.*, **7**, 1300-1306.
30. Severin S.E., Moskvitina E.L., Bykova E.V., Lutzenko S.V., Svets V.J., (1989), *FEBS Lett.*, **258**, 223-226.
31. Wang J.K.T., Walaas S.J., Greengard P., (1988), *J. Neurosci.*, **8**, 282-288.
32. Huang C.-K., Browning M.D., Greengard P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **217**, 6524-6528.
33. Llinas R., McGuinness T.L., Leonard C.S., Sugimori M., Greengard P., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3035-3039.
34. Llinas R., Steinberg I.Z., Walton K., (1981), *Biophys. J.*, **33**, 323-351.
35. Smith S., Augustine G.J., (1988), *Trends Neurosci.*, **11**, 458-465.
36. DeGennaro L.J., McCaffery C.A., Kirschgesner C.U., Yang-Feng T.L., Francke U., (1987), *Brain Dev.*, **9**, 469-474.
37. Aubert-Foucher E., Deleage G., Fout B., (1990), *Biochem. Int.*, **22**, 821-827.
38. Parfitt K.D., Hoffer B.J., Browning M.D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2361-2365.
39. Severin S.E., Moskvitina E.L., (1991), *FEBS Lett.*, **282**, 217-219.
40. Han H.-Q., Nichols R.A., Rubin M.R., Bähler M., Greengard P., (1991), *Nature*, **349**, 697-700.

UWAGA

Uniwersytet „Bostoński” (USA) ogłasza możliwość przyjęcia na studia pomagisterskie i udzielenie stypendiów pewnej liczbie kandydatów z krajów Europy Środkowej i Wschodniej.

BOSTON UNIVERSITY School of Medicine

DEPARTMENT OF PHYSIOLOGY FACULTY AND RESEARCH INTERESTS

CELLULAR AND MOLECULAR PHYSIOLOGY

The research activities can be divided into the following broad categories:

1. Membrane organization and transport mechanisms.
2. Neuronal mechanisms; electrical properties of cells and specific ion channels; neuronal interactions and chemical mediators.
3. Photoreceptor mechanisms particularly in terms of photo-chemical-electrical transduction.
4. Molecular mechanisms and regulation of intracellular motility and muscle contraction.
5. The role of calcium, calcium channels and calcium modulating and storage proteins in cells.
6. Ionic channels and intracellular Ca in regulation of cellular secretion.
7. Membrane receptors and signal transduction.
8. Protein-ligand and protein-protein interactions (structural studies) in cellular regulation.

Students interested in the Ph. D. training program of this Department, please write to:

Chairman of Graduate Program
Department of Physiology
Boston University School of Medicine
80 East Concord Street
Boston, MA 02118 U.S.A

Inhibitory aktywatorów plazminogenu

Plasminogen-activator inhibitors

MARIA ŚWIĄTKOWSKA¹
MAŁGORZATA WILCZYŃSKA²
CZESŁAW S. CIERNIEWSKI³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Inhibitor aktywatorów plazminogenu z komórek nabłonkowych naczyń krwionośnych (tzw. inhibitor typu 1, PAI-1)
 - II-1. Występowanie PAI-1
 - II-2. Budowa i właściwości fizyko-chemiczne PAI-1
 - II-2.1. Struktura genu i cząsteczki PAI-1
 - II-2.2. Forma aktywna i „utajona” PAI-1
 - II-2.3. Wpływ utleniania na aktywność PAI-1
 - II-3. Oddziaływanie PAI-1 z aktywatorami plazminogenu
 - II-4. Funkcja PAI-1 wbudowanego w międzykomórkową substancję macierzystą (ECM)
 - II-5. Inaktywacja PAI-1 *in vivo* w osoczu
 - II-6. Regulacja uwalniania PAI-1 z komórek w warunkach fizjologicznych i patologicznych
- III. Inhibitor aktywatorów plazminogenu z łożyska (tzw. inhibitor typu 2, PAI-2)
 - III-1. Występowanie PAI-2
 - III-2. Struktura genu i cząsteczki PAI-2
 - III-3. PAI-2 jako inhibitor aktywatorów plazminogenu
- IV. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Endothelial cell type plasminogen-activator inhibitor (PAI-1)
 - II-1. Distribution of PAI-1 in different tissues
 - II-2. Structure and physico-chemical properties of PAI-1
 - II-2.1. Structure of PAI-1 gene and molecule
 - II-2.2. Active and „latent” forms of PAI-1
 - II-2.3. The effect of oxidation on PAI-1 activity
 - II-3. Interaction of PAI-1 with enzymes
 - II-4. The function of PAI-1 in extracellular matrix
 - II-5. Inactivation of PAI-1 *in vivo*
 - II-6. Regulation of the release of PAI-1 from cells
- III. Placental type plasminogen-activator inhibitor (PAI-2)
 - III-1. Distribution of PAI-2 in tissues
 - III-2. Structure of PAI-2 gene and molecule
 - III-3. PAI-2 as an inhibitor of plasminogen activators
- IV. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: PAI-1 — inhibitor aktywatora plazminogenu Typ 1 (z komórek nabłonkowych; PAI-2 — inhibitor aktywatora plazminogenu Typ 2 (z łożyska); SDS — siarczan dodecylu sodu; serpiny — inhibitory proteaz serynowych; u-PA — urokinaza- aktywator plazminogenu; t-PA — tkankowy aktywator plazminogenu; ECM — międzykomórkowa substancja macierzysta.

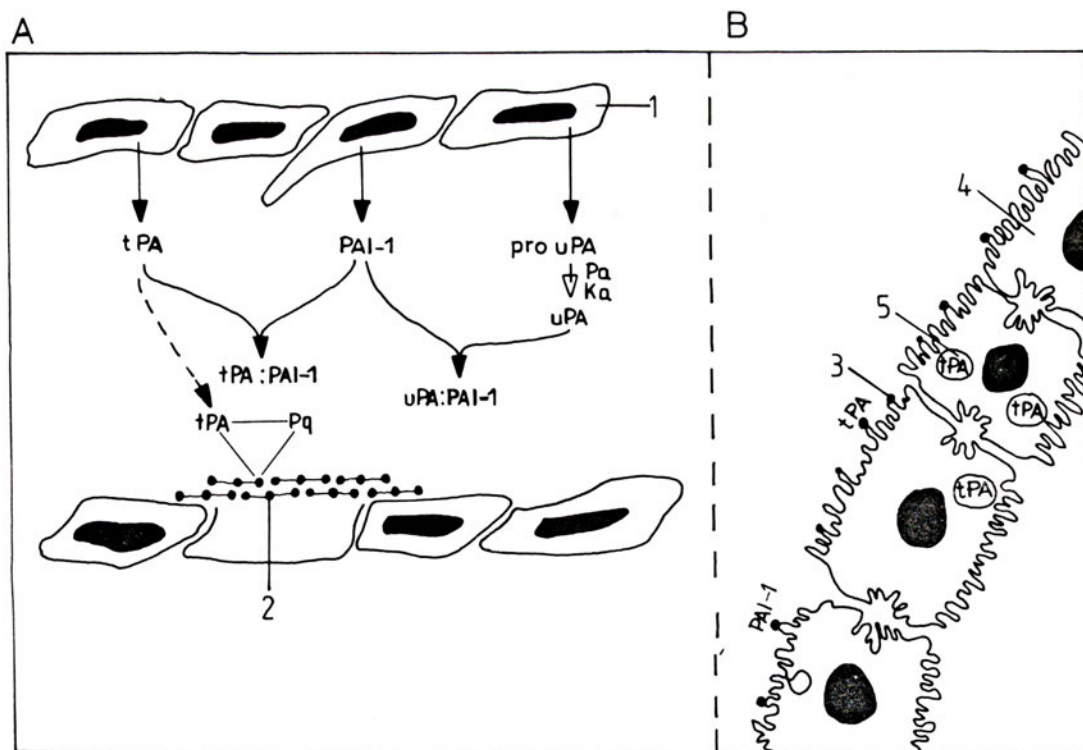
I. Wprowadzenie

Plazmina, enzymatycznie aktywna postać plazminogenu, jest nie tylko podstawowym enzymem fibrynolitycznym, ale też uczestniczy w takich procesach jak owulacja, migracja komórek oraz inwazja nowotworowa. Dla właściwego przebiegu wielu procesów bardzo ważna jest więc regulacja aktywacji plazminogenu, kontrolowana obecnością swoistych aktywatorów i inhibitorów. Podstawowymi fizjologicznymi enzymami katalizującymi aktywację plazminogenu są: tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) i urokinaza (u-PA). Mechanizm regulacji (Ryc. 1) działania aktywatorów plazminogenu w organizmie zależy od:

- a) tempa uwalniania aktywatorów z komórek,
- b) efektywności ich wiązania z błoną komórkową hepatocytów oraz endocytozy,
- c) oddziaływania t-PA z włóknikiem,
- d) konwersji jednołańcuchowej formy aktywatora plazminogenu typu urokinazowego do dwułańcuchowej i obecności jonów Zn^{+2} ,
- e) oddziaływania aktywatorów plazminogenu ze specyficznymi inhibitorami.

Do chwili obecnej wykryto w osoczu krwi dwa inhibitory swoiste dla aktywatorów plazminogenu: inhibitor pochodzący z komórek nabłonkowych ścian naczyń krwionośnych (PAI-1) oraz inhibitor z łożyska (PAI-2). PAI-1, stale obecny w osoczu krwi, jest głównym i szybko działającym inhibitorem aktywatorów plazminogenu. Aktywność PAI-1 podlega złożonym procesom regulacyjnym, a ich zaburzenia związane są z wieloma stanami chorobowymi układu naczyn-

¹mgr, ²dr, ³prof. dr hab., Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź.



Ryc. 1. Schemat mechanizmów regulacji aktywności fibrynolitycznej

A. Główne procesy regulujące aktywność aktywatorów plazminogenu w osoczu. Komórki nabłonkowe (1) uwalniają do osocza dwa rodzaje aktywatorów plazminogenu: tkankowy aktywator (t-PA) i prourokinazę (pro-u-PA). Tkankowy aktywator plazminogenu może reagować ze specyficznym inhibitorem (PAI-1) uwalnianym przez komórki nabłonkowe lub, w miejscach uszkodzenia ścian naczyń krwionośnych, wiązać się ze złogami włóknika (2). Utworzenie kompleksu między włóknikiem, plazminogenu (Pg) i aktywatorem tkankowym powoduje znaczne przyspieszenie i lokalizację procesu fibrynolizy. Prourokinaza, przy udziale plazminy (Pa) lub kalikreiny (Ka), może być aktywowana do aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (u-PA), a ten ostatni jest inaktywowany przez PAI-1. B. Usuwanie aktywatorów z krwiobiegu. Cyklujące w osoczu aktywatory plazminogenu i PAI-1 wiążą się w wątrobie ze specyficznymi receptorami (3) na powierzchni błon hepatocytów (4). Następstwem tej interakcji jest utworzenie pęcherzyków pinocytarnych (5) i hydroliza aktywatorów przez hydrolazy obecne w pęcherzykach.

niowego. PAI-2 pojawia się w osoczu tylko w okresie ciąży. Aktywatory plazminogenu mogą być hamowane *in vitro* przez inne inhibitory proteaz serynowych (alfa₁-antytrypsynę, alfa₂-antyplazminę oraz proteazową neksynę), ale reakcje te przebiegają wolno i nie mają znaczenia w warunkach *in vivo*.

II. Inhibitor aktywatorów plazminogenu z komórek nabłonkowych naczyń krwionośnych (tzw. inhibitor typu 1, PAI-1)

II-1. Występowanie PAI-1

PAI-1 syntetyzowany jest przez komórki: endotelialne ścian naczyń krwionośnych [1-3], wątroby, ziarniny [4] i mięśni gładkich naczyń krwionośnych [5]. Występuje on też w płytkach krwi i makrofagach [6, 7].

PAI-1 w komórkach endotelialnych zlokalizowany jest zarówno w cytozolu (70% komórkowego PAI-1) jak i w błonie komórkowej (30%). Z komórek endotelialnych PAI-1 uwalniany jest do osocza i do międzykomórkowej substancji macierzystej (ECM) [8]. W osoczu ubogopłytkowym ilość PAI-1 pochodzącego z komórek endotelialnych wynosi od 0 do 3 + 1 jedn./ml (tj. do około 1.3 nM/L) [9], co stanowi 20% inhibitora znajdującego się w pełnej krwi. Pozostałe 80% PAI-1 zlokalizowane jest w alfa-ziarnistościach płytek krwi, skąd uwalniany jest on do osocza w czasie aktywacji płytek powodowanej przez trombinę, kolagen czy ADP. Aktywność PAI-1 w osoczu bogatopłytkowym, po agregacji płytek krwi i uwolnieniu z nich inhibitora, wynosi około 7 + 1 jedn./ml [6-8]. Duża ilość aktywowanych płytek w zakrzepach naczyńowych przyczynia się do lokalnego wzrostu stężenia PAI-1, który szybko reagując z aktywatorami plazminogenu chroni włóknik przed lizą przez plazminę. Stopniowa inaktywacja PAI-1 przez trombinę i aktywne białko C powoduje usuwanie inhibitora z obszaru zakrzepu i zapoczątkowuje tym samym hydrolizę włóknika.

II-2. Budowa i właściwości fizyko-chemiczne PAI-1

II-2.1. Budowa genu i cząsteczki PAI-1

Gen PAI-1 zlokalizowany jest w chromosomie 7. Całkowita sekwencja DNA kodująca PAI-1 zawiera 15867 par zasad, które zgrupowane są w 9 eksonach rozdzielonych przez 8 intronów. Intryny stanowią 74% sekwencji nukleotydowej PAI-1. Gen struktury kodującej aminokwasy składa się z 1206 par zasad [10]. Badania porównawcze pozwoliły zaklasyfikować

PAI-1 do grupy inhibitorów proteaz serynowych, tzw. serpin, które wyodrębniły się 500 mln lat temu ze wspólnego prągu i są dziś białkami regulatorowymi procesów fibrylizacji, krzepnięcia krwi i aktywacji dopełniacza [11]. Ewolucja serpin i proteaz serynowych przebiegała równolegle. Szczególnie intensywnym zmianom ulegał region miejsca reaktywnego serpin, co umożliwiło powstanie inhibitorów o dużej specyficzności wobec poszczególnych enzymów.

Na podstawie pierwszorzędowej struktury cDNA odtworzono kolejność aminokwasów w cząsteczce inhibitora PAI-1. Syntetyzowany w komórkach w formie prekursorowej PAI-1 zawiera 402 aminokwasy i N-końcowy fragment sygnałny (23 reszty aminokwasowe) [10]. Dojrzały PAI-1 jest jednolącuchową glikoproteiną zbudowaną z 379 aminokwasów, o masie cząsteczkowej około 50 000. Punkt izoelektryczny PAI-1 przypada w pH 4,5-5,0 [12]. W cząsteczce PAI-1 znajdują się trzy potencjalne miejsca glikozylacji (Ryc. 2) [10]. Cechą charakterystyczną struktury pierwszorzędowej PAI-1 jest brak reszt cysteinowych [13, 14]. Na podstawie analizy sekwencji aminokwasowej przypuszczać można, że tylko połowa łańcucha polipeptydowego PAI-1 wykazuje uporządkowaną strukturę drugorzędową: 19% aminokwasów tworzy alfa-helisę, a 31% strukturę beta (Ryc. 2). Charakterystyczną cechą budowy serpin jest pętla utworzona w C-końcowym fragmencie cząsteczki, która zawiera wiązanie peptydowe rozpoznawane specyficznie przez proteazy serynowe jako pseudosubstrat (tzw. miejsce reaktywne inhibitora). Miejsce reaktywne PAI-1 znajduje się

Ryc. 2. Schemat struktury drugorzędowej PAI-1 i PAI-2. Obszary występowania alfa-helisy i struktury beta wyznaczono na podstawie analizy komputerowej wykorzystując do tego celu parametry podane przez Chou i współautorów [73].

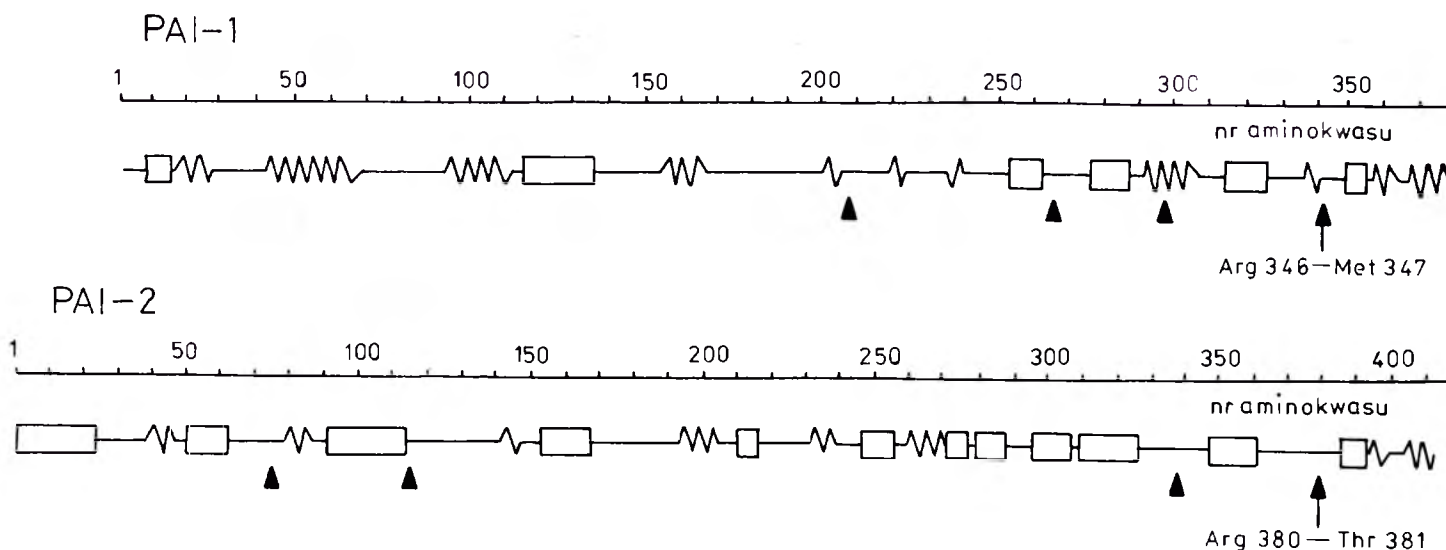
Objaśnienia: linia prosta — struktura nieuporządkowana; linia łamana — struktura beta; prostokąty — struktura alfa-helikalna; trójkąty — potencjalne miejsca glikozylacji; strzałki — wiązanie peptydowe tworzące centrum reaktywne inhibitora. Na osiach zaznaczono kolejne numery reszt aminokwasowych.

między Arg₃₄₆ i Met₃₄₇ [13, 15-17]. Sekwencja łańcucha PAI-1 od 328 do 355 aminokwasu, zawierająca miejsce reaktywne inhibitora, wykazuje dużą homologię z antytrombiną III (55% homologii), PAI-2 (41%), alfa 2-antypłazminą (39%), inhibitorem esteraazy dopełniacza C₁ (32%) i alfa 2-antyptrypsyną (21%) [18].

II-2.2. Forma czynna i „utajona” („latent”) PAI-1

PAI-1 syntetyzowany jest w komórkach w formie czynnej, ale ma zdolność do samorzutnego przekształcenia się w formę „utajoną” („latent”) [19]. Zjawisko to, obserwowane *in vivo* i *in vitro*, wynika ze zmian konformacyjnych cząsteczki PAI-1, co związane jest z brakiem wiązań dwusiarczkowych usztywniających cząsteczkę [12, 20, 21]. „Utajony” PAI-1 nie reaguje z aktywatorami plazminogenu i nie jest wbudowywany w ECM (międzykomórkową substancję macierzystą). Nie jest on też, w przeciwieństwie do formy czynnej inhibitora, degradowany przez trombinę czy aktywne białko C [22]. Forma „utajona” PAI-1 odzyskuje wszystkie cechy charakterystyczne dla czynnej formy inhibitora w obecności czynników denaturujących (SDS, KSCN, chlorowodorek guanidyny lub mocznik) [23]. Pierwotnie aktywny jak i aktywowany denaturantami „utajony” PAI-1 mają jednakową strukturę oraz właściwości biologiczne [22].

W warunkach fizjologicznych zdolność aktywowania formy „utajonej” PAI-1 mają prawdopodobnie fosfolipidy noszące ładunek ujemny (np. fosfatydyloseryna) [24]. W osoczu krwi występuje białko, które tworzy z czynną formą PAI-1 odwracalny kompleks o masie cząsteczkowej 250 000-300 000, stabilizując konformację inhibitora i uniemożliwiając przekształcenie się w formę „utajoną” [25, 26]. Wzajemne przekształcanie się formy czynnej i „utajonej” PAI-1 może reprezentować nowy mechanizm regulacyjny procesu fibrylizacji *in vivo*, a „utajona” forma PAI-1 jest stabilną rezerwą potencjalnej aktywności inhibitorowej.



II-2.3. Wpływ utleniania na aktywność PAI-1

Nieodwracalna inaktywacja PAI-1 przez nadtlenek wodoru, chloraminę T i reduktazę sulfometioninową, jest wynikiem utlenienia reszt metionylowych PAI-1, w tym również i tej, która współtworzy wiązanie peptydowe centrum reaktywnego [12, 27]. Przypuszcza się, że inaktywacja PAI-1 przez utlenianie ma też miejsce *in vivo* w ogniskach zapalnych: gromadzące się w nich leukocyty wydzielają nadtlenek wodoru utleniający reszty metionylowe PAI-1. Efektem wtórnym tych reakcji jest uszkodzenie tkanki przez plazminę powstałą z plazminogenu pod wpływem jego aktywatorów [28]. Podobnie stopniowy zanik aktywności PAI-1 w osoczu *in vitro* lub oczyszczonych preparatach tego inhibitora, tłumaczy się utlenianiem cząsteczek inhibitora przez tlen atmosferyczny [6, 29].

II-3. Oddziaływanie PAI-1 z aktywatorami plazminogenu

PAI-1 reaguje specyficznym z fizjologicznymi aktywatorami plazminogenu, tj. jedno- i dwułańcuchowym tPA oraz urokinazą (u-PA) [30-33]. Szybkość inhibicji tych aktywatorów przez PAI-1 jest bardzo duża, o czym świadczy wartość stałej szybkości reakcji drugiego rzędu ($10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [32, 34].

Oddziaływanie PAI-1 z aktywatorami plazminogenu przebiega dwuetapowo. Podobnie jak w wypadkach innych serpin, początkowo cząsteczki PAI-1 i aktywatora tworzą niestabilny kompleks w stosunku molowym 1:1. Nie wiadomo dotąd, które regiony cząsteczek aktywatorów plazminogenu i PAI-1 bezpośrednio ze sobą oddziałują podczas reakcji inhibicji. Wykluczono jednak udział struktur „kringle” aktywatorów i składników cukrowych [13, 15-17]. W następnym etapie wiązanie peptydowe miejsca reaktywnego PAI-1 (Arg₃₄₆ – Met₃₄₇) zostaje rozpoznane przez aktywator plazminogenu i ulega hydrolizie. Uwolniona wówczas grupa karboksylowa Arg₃₄₆ PAI-1 reaguje z grupą hydroksylową seryny znajdującej się w centrum aktywnym enzymu, a C-końcowy fragment cząsteczki PAI-1 zbudowany z 22 aminokwasów (Met₃₄₇ – Pro₃₇₉) zostaje odłączony. Utworzone wiązanie estrowe między cząsteczkami PAI-1 i aktywatora plazminogenu stabilizuje kompleks obu tych białek (stała dysocjacji 10^{-13} M/L) [35]. Skompleksowanie t-PA z PAI-1, oprócz zablokowania centrum aktywnego t-PA, powoduje też zahamowanie wiązania t-PA do włókniaka. Proces ten może mieć znaczenie w regulacji procesu fibrylizacji *in vivo* [36].

II-4. Funkcja PAI-1 wbudowanego w międzykomórkową substancję macierzystą (ECM)

Międzykomórkowa substancja macierzysta zbudowana jest z sieci kolagenu, elastyny, trombospondyny, witronektyny i fibronektyny. Przynajmniej dwa z tych białek (trombospondyna i fibronektyna) mają zdol-

ność wiązania t-PA i plazminogenu. W powstającym w ten sposób trójskładnikowym kompleksie indukowana jest plazmina, która hydrolizuje białka ECM, niszcząc tym samym ciągłość tkanki. Proces ten ma miejsce w stanach fizjologicznych (jajczkowanie, migracja komórek) oraz patologicznych (tworzenie się przerzutów nowotworowych) i regulowany jest przez inhibitory wbudowane w ECM, tj. przez alfa₂-antypłazminę i PAI-1 [22]. Białka strukturalne ECM (prawdopodobnie witronektyna) wiążą specyficznie i odwracalnie czynną formę PAI-1 stabilizując w ten sposób jego cząsteczkę. Przeciwdziałają w ten sposób spontanicznemu przekształcaniu się PAI-1 w formę „utajoną” a tym samym inaktywacji inhibitora. Wiązanie PAI-1 z ECM jest istotne nie tylko ze względu na ochronę cząsteczek inhibitora przed proteolizą czy też stabilizację cząsteczki PAI-1, ale także stwarza możliwość umiejscowienia aktywnej formy PAI-1 w tkankach i zahamowania degradacji ECM.

II-5. Inaktywacja PAI-1 *in vivo* w osoczu

Cechą odróżniającą PAI-1 od innych inhibitorów proteaz serynowych jest jego bardzo krótki okres półtrwania w osoczu (około 7 min) [14, 15]. W usuwaniu PAI-1 z krwiobiegu biorą udział hepatocyty, na powierzchni których stwierdzono obecność receptorów specyficznych dla PAI-1 [37]. Dodatkowym mechanizmem regulującym aktywność PAI-1 jest jego oddziaływanie z proteazami osocza. Enzymy inaktywujące PAI-1 podzielić można na dwie grupy: a) takie, które tworzą kompleks z PAI-1 oraz b) te, które rozpoznają PAI-1 jako substrat. Pierwszą grupę prote-

IX International Symposium on

DRUGS AFFECTING LIPID METABOLISM

Florence (Italy),
May 13-16, 1992

Organizing Secretariat:
XI DALM
FONDAZIONE GIOVANNI LORENZINI
Via Monte Napoleone, 23
20121 MILAN (Italy)
Phone: (02) 76002267 - 783868
Telefax: (02) 781511

az stanowią aktywatory plazminogenu i aktywne białko C. Białko C jest zymogenem, którego synteza zależy od witaminy K. Stężenia aktywnego białka C i PAI-1 w osoczu są porównywalne [38]. Inaktywacja PAI-1 *in vitro* przez aktywne białko C przebiega wolno, lecz ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności fosfolipidów i białka S jako kofaktora. Aktywne białko C tworzy z PAI-1 kompleks w stosunku stechiometrycznym 1:1 i może hydrolizować wiązanie centrum reaktywnego inhibitora [39, 40]. Interakcja aktywnego białka C z PAI-1 stanowi kolejne ogniwo łączące układ krzepnięcia i fibrynolizy.

Do proteaz rozpoznających PAI-1 jako substrat zaliczamy trombinę, plazminę, elastazę i inne enzymy np. enzymy bakteryjne które hydrolizują wiązania peptydowe inhibitora w pobliżu jego centrum reaktywnego. Uwalniany jest wówczas C-końcowy fragment PAI-1 a pozostała część cząsteczki inhibitora nie ma powinowactwa do aktywatorów plazminogenu. Plazmina np. odcepią od cząsteczki PAI-1 najpierw fragment o masie 4000, a następnie jeszcze dwa fragmenty (20 000 i 24 000) [41].

II-6. Regulacja uwalniania PAI-1 z komórek nabłonkowych w warunkach fizjologicznych i patologicznych

Ilość aktywnego PAI-1 w osoczu regulowana jest nie tylko przez wątrobę, działanie osoczowych proteaz czy konwersję inhibitora do formy „utajonej” ale też przez syntezę i uwalnianie PAI-1 z komórek. W warunkach fizjologicznych ekspresję PAI-1 w komórkach regulują głównie hormony glukokortykoidowe i cykliczne nukleotydy. Potwierdzono to badaniami z syntetycznym glukokortykoidem, deksametazonem, który powoduje wzrost syntezy mRNA i PAI-1 oraz uwalnianie tego ostatniego z komórek nabłonkowych, fibroblastów i komórek nowotworowych (fibrosarkoma, hepatoma) [42]. Aktywność fibrynolityczną osocza moduluje również trombina, która w stężeniu fizjologicznym stymuluje uwalnianie z komórek nabłonkowych PAI-1 i t-PA (z ilościową przewagą inhibitora) [41]. Innym czynnikiem stymulującym zarówno syntezę mRNA i PAI-1 oraz uwalnianie inhibitora do osocza jest transformujący czynnik wzrostowy β (beta), polipeptyd obecny w fibroblastach, łożysku i płytkach krwi [8, 43, 44]. Powoduje on jednocześnie syntezę fibronektyny i prokolagenu oraz zwiększone ich wbudowywanie w ECM [45-47]. Geny dla prokolagenu i PAI-1 znajdują się w tym samym lokus chromosomu. Przypuszczać więc można, że pod wpływem transformującego czynnika wzrostowego β (beta) następuje skorelowana synteza białek ECM i inhibitora osłaniającego je przed proteolizą [48]. Ilość PAI-1 i t-PA zmienia się u człowieka wraz z wiekiem, przy czym wypadkowa aktywność fibrynolityczna maleje, co tłumaczy częstsze tworzenie się zakrzepów żylnych u osób starszych [49]. Wzrost aktywności PAI-1 obserwowany u osób

z nadwagą może przyczyniać się do zwiększonej zapałalności na arteriosklerozę [50]. Podwyższony poziom PAI-1 w osoczu związany jest z chorobami nowotworowymi, infekcjami bakteryjnymi, ostrymi stanami zapalnymi (np. wątroby i trzustki) i chorobą zakrzepową żył [51-53]. Aktywność PAI-1 wzrasta też gwałtownie po zabiegach chirurgicznych [54]. W przypadku chorób bakteryjnych stymulujący wpływ na ilość osoczowego PAI-1 mają endotoksyny bakteryjne [55-57]. Zwiększona aktywność PAI-1 może prowadzić do powstania mikrozakrzepów w naczyniach krwionośnych, które obserwowano w nerkach chorych na żółtaczkę lub w płucach osób dorosłych z zespołem niewydolności oddechowej. Konsekwencją powstania mikrozakrzepów jest niewydolność lub uszkodzenia narządów [58, 59]. Czynnikiem patologicznym powodującym wzrost wydzielania PAI-1 z komórek nabłonkowych są cytokiny uwalniane z komórek zapalnych, reprezentantem których jest interleukina-1. Powoduje ona, podobnie jak endotoksyny bakteryjne, wzrost uwalniania PAI-1 poprzedzony zwiększoną syntezą mRNA. Antyfibrynolityczne działanie interleukiny-1 wzmocnione jest jej hamującym wpływem na syntezę i uwalnianie tkankowego aktywatora plazminogenu. Podobny wpływ na komórki nabłonkowe ma czynnik martwicy nowotworów (*tumor necrosis factor*) [60, 61]. Zmniejszenie aktywności fibrynolitycznej przez wzrost syntezy i uwalniania PAI-1 może hamować rozwój stanu zapalnego (pod wpływem cytokin) lub inwazję nowotworową (gdy stymulatorem jest czynnik martwicy nowotworów).

III. Inhibitor aktywatorów plazminogenu z łożyska (tzw. inhibitor typu 2, PAI-2)

III-1. Występowanie PAI-2

Antyfibrynolityczną aktywność ekstraktów ludzkiego łożyska zauważono po raz pierwszy w 1968 r., ale dopiero osiemnaście lat później wyizolowano białko odpowiadające za tę właściwość. Inhibitor ten, tzw. PAI-2, posiadający zdolność hamowania aktywności enzymatycznej aktywatorów plazminogenu, zlokalizowany w epitelium trofoblastu i monocytach jest immunologicznie odrębny od PAI-1 [62-64]. W warunkach fizjologicznych PAI-2 pojawia się tylko w osoczu kobiet w okresie ciąży osiągając maksymalne stężenie w trzecim trymestrze. Zbyt wysoka aktywność PAI-2 przyczynia się do powstawania zakrzepów i zawału łożyska, co może powodować wewnątrzmaciczną śmierć płodu [65]. W stanach patologicznych obecność PAI-2 w osoczu związana jest z chorobami nowotworowymi [52]. Niekodujący region od 3' końca cDNA PAI-2 zawiera fragment bogaty w pary AT, charakterystyczny dla innych białek znanych ze swego regulującego wpływu na wzrost komórki, jak tkankowy czynnik martwicy, interleukina 1 czy interferony. Na podstawie podobieństwa struktury cDNA

przypuszczać można, że biologiczna aktywność PAI-2 przyczynia się do hamowania transformacji nowotworowej [66].

III-2. Struktura genu i cząsteczki PAI-2

Gen ludzkiego PAI-2 zawiera 16.5 tysiąca par zasad zgrupowanych w 8 egzonów. Struktury genów PAI-2 i PAI-1 różnią się znacznie mimo wspólnej proteazowej specyficzności. Gen PAI-2 jest natomiast podobny do genu owoalbuminy [66], czego konsekwencją jest podobieństwo w pierwszorzędowej strukturze tych białek i hormonalnym mechanizmie regulacji wydzielania z komórek. Możliwe, że gen owoalbuminy uległ mutacji czy rekombinacji z genami innych serpin, w wyniku czego powstała nowa forma białka z inhibitorową aktywnością.

Strukturę pierwszorzędową PAI-2 ustalono w oparciu o analizę sekwencji zasad cDNA dla tego białka. PAI-2 zbudowany jest z jednego łańcucha polipeptydowego utworzonego z 415 reszt aminokwasowych, wśród których, w odróżnieniu od PAI-1, znajdują się reszty cysteinowe. Centrum reaktywne PAI-2 zlokalizowane jest w C-końcu cząsteczki i utworzone przez wiązanie peptydowe Arg₃₈₀ – Thr₃₈₁ [67, 68]. Prekursorowy PAI-2 obecny w komórkach, w przeciwieństwie do innych serpin, nie ma w N-końcu hydrofobowego fragmentu warunkującego uwalnianie tych białek z komórki [69]. Peptyd sygnałowy, podobnie jak w przypadku owoalbuminy, znajduje się w środkowej części łańcucha polipeptydowego tego inhibitora. PAI-2 syntetyzowany w komórkach ma masę cząsteczkową 40 000 i pozbawiony jest składnika cukrowego. Przed uwolnieniem z komórki inhibitor ulega posttranslacyjnej glikozylacji a jego masa cząsteczkowa wzrasta do 60 000-70 000. W cząsteczce PAI-2 są trzy potencjalne miejsca glikozylacji (Ryc. 2). N- i O-glikozylacja nie wpływa na aktywność inhibitorową PAI-2, ale jest konieczna do wydzielania PAI-2 z komórek [70, 71]. W porównaniu z PAI-1, PAI-2 zawiera w swej strukturze drugorzędowej znacznie więcej struktury alfa-helikalne (40% reszt aminokwasowych) a mniej struktury beta (15% reszt aminokwasowych) (Ryc. 2).

III-3. PAI-2 jako inhibitor aktywatorów plazminogenu

PAI-2 jest specyficznym inhibitorem aktywatorów plazminogenu (t-PA i urokinazy) i tworzy z nimi kompleksy w stosunku stechiometrycznym 1:1. Mechanizm inhibicji aktywatorów plazminogenu przez PAI-2 jest taki sam jak w przypadku PAI-1 [71-73]. PAI-2, syntetyzowany przez łożysko, ma większe powinowactwo do urokinazy, która jest głównym aktywatorem plazminogenu w łożysku, niż do tkankowego aktywatora plazminogenu [74]. PAI-2 jest wolniej działającym inhibitorem niż PAI-1. Ze względu na budowę cząsteczki jak i mechanizm reakcji inhibicji zaliczono PAI-2 do rodziny serpin.

IV. Podsumowanie

Stany chorobowe podczas, których obserwowano powstawanie zakrzepów w układzie naczyniowym lub destrukcję ECM wiązano do niedawna ze wzrostem lub spadkiem ilości aktywatorów plazminogenu. Obecnie wiadomo, że powyższe zaburzenia mogą występować przy normalnym stężeniu aktywatorów plazminogenu, a czynnikiem patogennym jest zmieniony, w porównaniu z fizjologicznym, poziom inhibitorów PAI-1 i PAI-2. Podlegają one różnorodnej i wzajemnie niezależnej regulacji wydzielania. PAI-1 wydzielany z płytek i komórek endotelialnych, szybko inaktywuje tPA i urokinazę, odgrywając ważną rolę głównie w fibrynolizie wewnątrznaczyniowej, podczas gdy PAI-2 jest ważnym zewnątrznaczyniowym regulatorem fibrynolizy. Aktywność fibrynolityczna w osoczu czy przestrzeni międzykomórkowej jest wypadkową działania aktywatorów plazminogenu i ich inhibitorów. Wynika stąd zainteresowanie badaczy budową, mechanizmem działania i regulacją uwalniania PAI-1 i PAI-2 z ich komórek macierzystych.

* *

Dziękujemy panu Markowi Wilczyńskiemu za napisanie programu umożliwiającego komputerową analizę struktury drugorzędowej białek.

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1991 r.
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1991 r.

Piśmiennictwo

1. Booth N.A., MacGregor I.R., Hunter N.R., Bennett B., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **165**, 595-600.
2. Booth N.A., MacGregor I.R., Hunter N.R., Bennett B., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 444, abstr. 1637.
3. Philips M., Juul A.G., Thorsen S., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 99-110.
4. Ny T., Bjersing L., Hsuek A.J.W., Loskutoff D.J., (1985), *Endocrinology*, **116**, 1666-1668.
5. Lang W.E., (1985), *Thromb. Haemost.*, **20**, 165-169.
6. Sprengers E.D., Akkerman J.W.N., Jansen B.G., (1986), *Thromb. Haemost.*, **55**, 325-329.
7. Booth N.A., Anderson J.A., Bennett B., (1985), *J. Clin. Pathol.*, **38**, 825-830.
8. Kruihof E.K.O., Tran-Thang C., Bachmann F., (1986), *Thromb. Haemost.*, **55**, 201-205.
9. Ny T., Sawdey M., Lawrence D., Millan J.L., Loskutoff D.J., (1986), **86**, 6776-6780.
10. Zonneveld J., Scott A.C., Loskutoff D.J., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5525-5529.
11. Lindahl T.L., Ohlsson P.I., Wiman B., (1990), *Biochem. J.*, **265**, 109-113.
12. Loskutoff D.J., (1985), *Thromb. Haemost.*, **54**, 118, abstr. S699.
13. Ny T., Sawdey M., Lawrence D., Millan J.L., Loskutoff D.J., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6776-6780.
14. Ginsburg D., Zeheb R., Yang A.Y., Rafferty U.M., Andreasen P.A., Nielsen L., Dano K., Lebo R.V., Gelehrter T.D., (1986), *J. Clin. Invest.*, **78**, 1673-1680.
15. Andreasen P.A., Riccio A., Lund R.L., Welinder K.G., Blasi F., Dano K., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 3, abstr. 11.
16. Nielsen L.S., Andreasen P.A., Grondahl-Hansen J., Skriver L., (1986), *FEBS*, **196**, 269-272.

17. Andreasen P.A., Riccio A., Welinder K.G., Douglas R., Sartorio R., Nielsen L.S., Oppenheimer C., Blasi F., Dano K., (1986), *FEBS*, **209**, 213-218.
18. Bachmann F., (1987), w Verstraete M., Vermeylen J., Lijnen R., Arnout J., *Thrombosis and Haemostasis 1987*, Leuven University Press, str. 227-265.
19. Sprengers E.D., Kluft C., (1987), *Blood*, **69**, 381-387.
20. Erickson L.A., Hekman C.M., Loskutoff D.J., (1986), *Blood*, **68**, 1298-1305.
21. Philips M., Juul A.G., Thorsen S., Selmer J., Thim L., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 2, abstr. 7.
22. Mimuro J., Loskutoff D.J., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 5058-5063.
23. Hekman C.M., Loskutoff D.J., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11581-11587.
24. Lamberts J.W.J., Cammenga M., Konig B., Pannekoek H., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 2, abstr. 8.
25. Wiman B., Carlson T., Chmielewska J., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 15, abstr. 60.
26. Carlson T., Chmielewska J., Wiman B., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 444, abstr. 1635.
27. Lawrence D., Curriden S., Loskutoff D.J., (1985), *Thromb. Haemost.*, **54**, 229-233.
28. Carrel R.W., (1986), *J. Clin. Invest.*, **78**, 1427-1431.
29. Kluft C., Jie A.F.H., Sprengers E.D., Verheijen J.H., (1985), *FEBS Lett.*, **190**, 315-320.
30. Thorsen S., Philips M., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **802**, 111-118.
31. Kruithof E.K.O., Tran-Thang C., Bachmann F., (1986), *Thromb. Haemost.*, **55**, 65-69.
32. Andreasen P.A., Nielsen L.S., Kristensen P., Grondahl-Hansen J., Skrivel R., Dano K., (1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 7644-7651.
33. Haggroth L., Mattsson Ch., Felding P., Nilsson I.M., (1986), *Thromb. Res.*, **42**, 585-594.
34. Chmielewska J., Wiman B., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 3, abstr. 9.
35. Hekman C.M., Loskutoff D.J., (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**, 199-210.
36. Okada M., Sakata Y., Matsuda M., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 445, abstr. 1642.
37. Schwartz B.S., Bradshaw J.D., (1989), *Blood*, **74**, 1644-1650.
38. Heeb M.J., Griffin J.H., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 15813-15816.
39. D'Angelo A., Lockhart M.S., D'Angelo S.V., Taylor F.B., (1987), *Blood*, **69**, 231-237.
40. de Fouw N.J., Bertina R.M., Haverkate F., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 48, abstr. 162.
41. Levin E.G., (1983), *Biochem. J.*, **239**, 497-503.
42. Andreasen P.A., Pyke C., Riccio A., Kristensen P., Nielsen L.S., Lund R.L., Blasi F., Dano K., (1987), *Moll. Cel. Biol.*, **7**, 3021-3025.
43. Sakela O., Moscatelli D., Rifkin B.D., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 505, abstr. 1861.
44. Mimuro J., Loskutoff D.J., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 447, abstr. 1647.
45. Andreasen P.A., Riccio A., Lund L.R., Welinder K.G., Blasi F., Dano K., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 3, abstr. 11.
46. Lund L.R., Riccio A., Andreasen P.A., Nielsen L.S., Kristensen P., Laiho M., Sakela O., Blasi F., Dano K., (1987), *EMBO J.*, **6**, 1281-1286.
47. Andreasen P.A., Christensen T.H., Lielsen L.S., Huang J.Y., Dano K., (1986), *Mol. Cel. Endocr.*, **45**, 137-147.
48. Laiho M., Sakela O., Andreasen P.A., Keski-Oja J., (1986), *J. Cel. Biol.*, **105**, 2403-2410.
49. Hasimoto Y., Kobayashi A., Yamazaki N., Sugawara Y., Takada Y., Takada A., (1987), *Thromb. Res.*, **46**, 625-633.
50. Juhan - Vague I., Vague P., Alessi M.C., Atlan C., Valadier J., Badier C., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 449, abstr. 1657.
51. Kruithof E.K.O., Nicoloso G., Gudinchet A., Bachmann F., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 3, abstr. 12.
52. Paramo J.A., Colucci M., Collen D., van de Werf F., (1985), *Brit. Med. J.*, **291**, 573-574.
53. Almer L.O., Ohlin H., (1987), *Thromb. Res.*, **47**, 335-339.
54. Kluft C., Verheijen J.H., Jie A.F.H., Rijken D.C., Preston F.E., Sue-Ling H.M., Jespersen J., Assen A.O., (1985), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **45**, 605-610.
55. van de Berg E.A., Sprengers E., Jaye M., Burgess W., van Hinsberg V.W.M., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 15, abstr. 57.
56. Krishnamurti C., Barr C.F., Young G.D., Alving B.M., (1987), *Blood*, **69**, 798-803.
57. Hanss M., Collen D., (1986), *J. Lab. Clin. Med.*, **87**, 97-104.
58. Colucci M., Altomare D., Chetta G., Cavallo L.G., Semeraro N., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 449, abstr. 1658.
59. Saldeen T., Moalli R., Hasan F.M., Carvalho A., Ericsson M., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 446, abstr. 1646.
60. Loskutoff D.J., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 17, abstr. 65.
61. Schaub R.G., Dunn C.J., Tracey D.E., Fleming W.E., Budrick M.D., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 16, abstr. 61.
62. Weeb A.C., Collins K.L., Synder S.E., Alexander S.J., Rosenwasser L.J., Eddy R.L., Shows T.B., Auron P.E., (1987), *J. Exp. Med.*, **166**, 74-79.
63. Lecander T., Astedt B.A., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 450, abstr. 1659.
64. Astedt B.A., Hagerstrand I., Lecander I., (1986), *Thromb. Haemost.*, **56**, 63-65.
65. Kruithof E.K.O., Tran-Thang C., Gudinchet A., Hauert J., Nicoloso G., Genton C., Welti H., Bachmann F., (1987), *Blood*, **69**, 460-466.
66. Ye R.D., Ahern S.M., Le Beau M.M., Lebo R.V., Sadler J.E., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 5495-5502.
67. Ny T., Hansson L., Astedt B., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 14, abstr. 56.
68. Ye R.D., Wun T-Ch., Sadler J.E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3718-3725.
69. Ye R.D., Wun T-Ch., Sadler J.E., (1989), *J. Biol. Chem.*, **263**, 4869-4875.
70. Kruithof E.K.O., Schleuning W.D., Bachmann F., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 451, abstr. 1965.
71. Genton C., Kruithof E.K.O., Schleuning W.D., (1987), *J. Cel. Biol.*, **104**, 705-712.
72. Wun T.C., Reich E., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 3646-3653.
73. Kiso U., Kaudewitz H., Henschen A., Astedt B.A., Kruithof E.K.O., Bachmann F.F., (1987), *Thromb. Haemost.*, **58**, 3, abstr. 10.
74. Astedt B., Lecander I., Brodin T., Lundblad A., Low K., (1985), *Thromb. Haemost.*, **53**, 122-125.

Zarząd Główny ustanowił status członka-studenta i młodego pracownika. Członkostwo trwa 6 lat, a ubiegający się o przynależność jest wprowadzany do Towarzystwa na swój wniosek poręczony przez opiekuna pracy czy koła, lub przełożonego. Członek-student ma prawo podjęcia działalności społecznej w Towarzystwie, korzystania z ulgowych opłat oraz udziału w Walnym Zabraniu, lecz bez prawa czynnego czy biernego uczestnictwa. Składka w bieżącym roku dla tej grupy członków została ustalona w wysokości 10 000 zł.

Śluz i mucyna – problem biochemiczny i medyczny

Mucus and mucin – a biochemical and medical problem

ANDRZEJ GINDZIENSKI¹
KRZYSZTOF ZWIERZ²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Składniki śluzu ssaków
- III. Struktura cząsteczkowa mucyn
- IV. Łańcuchy oligosacharydowe mucyn
- V. Polipeptydowe rdzenie mucyn
- VI. Potranslacyjne modyfikacje mucyn
- VII. Śluz i zwłóknienie torbielowate

Contents:

- I. Introduction
- II. Composition of mammalian mucus
- III. Molecular structure of mucins
- IV. Mucin oligosaccharides
- V. Polypeptide cores of mucins
- VI. Post-translational modifications of mucins
- VII. Mucus and cystic fibrosis

I. Wstęp

Śluz jest półpłynną wydzieliną komórek nabłonkowych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego.¹ Stanowi bezpośrednią pokrywę komórek błony śluzowej i przez jego warstwę przechodzą substancje wydzielane przez komórki błony śluzowej (np. enzymy) i wchłaniane są produkty wewnątrz-jelitowego trawienia. Wydzielający się ciągle śluz zmywa z powierzchni błony śluzowej zanieczyszczenia mechaniczne (np. kurz w drogach oddechowych) i złuszczone komórki. W żołądku śluz oddziela komórki błony śluzowej od kwaśnej zawartości. Zależnie od miejsca pochodzenia wydzielina śluzowa różni się nieco swoimi właściwościami. Glikoproteinowe składniki śliny wydzielane są bardzo intensywnie i w małym stężeniu, a struktura ich łańcuchów cukrowych jest odmienna niż w mucynach z innych odcinków przewodu pokarmowego [1]. Śluz oskrzelowy zawiera mały procent wody, a masa cząsteczkowa jego glikoproteiny po zredukowaniu wiązań dwusiarczkowych ulega tylko niewielkiej zmianie [2, 3]. W cho-

robie znanej pod nazwą mukowiscydoza lub zwłóknienie torbielowate, zmienione właściwości śluzu stanowią poważny problem medyczny. Rozmiar zaburzeń w funkcjonowaniu organizmu jest tak wielki, że przeciętny okres życia tych chorych nie przekracza 18 lat.

II. Składniki śluzu ssaków

Zasadniczym składnikiem każdej wydzieliny śluzowej jest wielkocząsteczkowa glikoproteina (mucyna), warunkująca fizykochemiczne właściwości śluzu. Prócz niej w skład śluzu wchodzi zasocjowane lipidy, białka i kwasy nukleinowe¹, przy czym niektóre z tych składników wydają się pełnić określone funkcje. Wykazano na przykład, że mucyna wiąże bakterie [4, 5, 6, 7, 8], prawdopodobnie przy udziale N-acetyloglukozoaminy i kwasu N-acetylneuraminowego, często ulegając przy tym degradacji wskutek działania bakteryjnych glikozydaz i proteaz [9, 10]. Może to wynikać z podobieństwa struktur cukrowych mucyny do odpowiednich struktur glikolipidów błon komórkowych [7], które również wiążą bakterie. Mucyna ma powinowactwo do kationów dwu- i trójwartościowych metali [11], do leków o strukturze trzeciorzędowych amin [12], i wraz z lipidami wiąże wolne rodniki tlenowe i hydroksylowe [13, 14, 15, 16]. Wśród składników białkowych oprócz immunoglobulin¹, w śluzie oskrzelowym wykryto obecność inhibitora proteaz tkankowych, silnie hamującego aktywność elastazy i katepsyny G leukocytów, także aktywnego wobec trypsyny i chymotrypsyny [17, 18].

Co do pewnych składników śluzu nie ma zgodności poglądów. W śluzie żołądkowym człowieka Cl a m p i w s p ó ł a u t o r z y [16, 19] po reakcji β -eliminacji wykryli obecność nietypowego polisacharydu o m. cz. 300 kDa w 85% złożonego z galaktozy oraz N-acetyloglukozoaminy, glukozy i fukozy. Masa czas-

¹ doc. dr hab., Zakład Chemii Ogólnej i Organicznej, ² doc. dr hab., Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Instytut Chemii, Akademia Medyczna, 15-230 Białystok, ul. Mickiewicza 2.

¹ Szereg informacji na temat właściwości śluzu, jego roli, składu i powstawania żelu mucyny, można znaleźć w *Postępach Higieny i Medycyny Doświadczalnej*: Gindzieski A., Zwierz K., (1978), **23**: 265-275 i Gindzieski A., (1984), **38**: 323-334.

teczkowa polisacharydu jest ok. 200 razy większa od przeciętnego oligosacharydu typowego dla mucyny, stąd jego związek ze strukturą mucyny nie jest jasny [8, 20]. Podobny polisacharyd wyizolowano tą samą techniką z glikoproteiny z cysty jajnika [21].

Żywą dyskusję wzbudziły wyniki *Witasa i Słomianego* [22, 23], którzy wykryli w oczyszczonej glikoproteinie śluzu jelitowego znaczne ilości lipidów (ok. 26% suchej masy), w tym zasocjowane wolne kwasy tłuszczowe, glicerydy, glikolipidy, cholesterol i jego estry oraz kowalencyjnie związane kwasy tłuszczowe. Tak znaczna zawartość lipidów w oczyszczonej mucynie jest kwestionowana i nie została dotąd potwierdzona przez innych autorów [24, 25]. Nie mniej wykazano że w nieglikozylowanej części łańcucha polipeptydowego mucyna posiada hydrofobowe obszary, których liczba kilkakrotnie wzrasta po zredukowaniu wiązań dwusiarczkowych [26, 27, 28, 29, 30]. Problem udziału lipidów w strukturze mucyny jest wciąż dyskutowany, choć nie budzi wątpliwości ich obecność w śluzie. Ostatnio *Słomiany i współautorzy* wykazali zdolność komórek błony śluzowej do ko-translacyjnej acylacji mucyny [31, 32, 33, 34, 35].

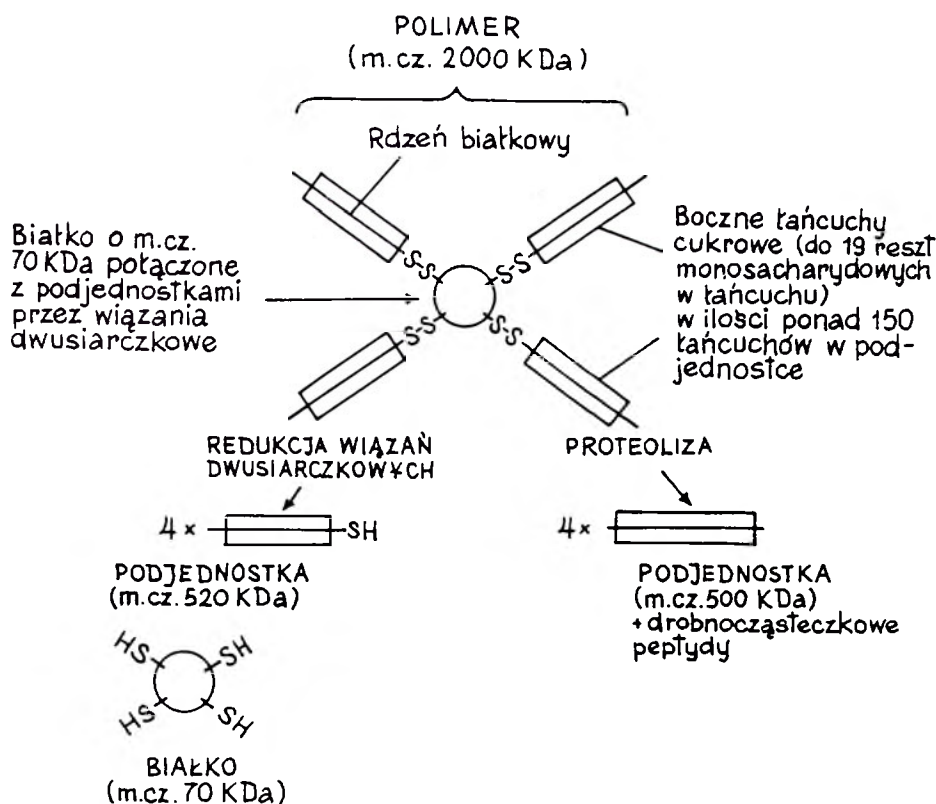
III. Struktura cząsteczkowa mucyny

W rozcieńczonych roztworach wodnych mucyna wytwarza luźno zwinięte, liniowe struktury, o masach cząsteczkowych w zakresie od 2000 kDa do 45000 kDa. Tak duży rozrzut wartości jest między innymi spowodowany technicznymi trudnościami oznaczania wielkich mas cząsteczkowych, ponieważ elastyczne, liniowe polimery nie wykazują proporcjonalnej zależ-

ności pomiędzy współczynnikiem sedymentacji a masą cząsteczkową [36]. Żel śluzu powstaje po przekroczeniu progowego stężenia mucyny wynoszącego około 25 mg mucyny w mililitrze. Mechanizm tworzenia żelu polega prawdopodobnie na niekowalencyjnym, wzajemnym oddziaływaniu cząsteczek mucyny z udziałem wiązań hydrofobowych, ponieważ żel śluzu rozpuszcza się łatwo w 1% roztworze SDS, a także w stężonych roztworach mocznika i chlorowodoru guanidyny [37].

Do niedawna powszechnie akceptowano schemat struktury cząsteczki mucyny zaproponowany w 1978 roku przez *Allena i współautorów* [38, 39], uzupełniony później o składniki lipidowe przez *Słomianego i współautorów* [23]. Wg koncepcji *Allena*, opracowanej dla mucyny żołądkowej, cząsteczka mucyny o masie 2000 kDa składa się z czterech podjednostek połączonych ze sobą na kształt skrzydeł wiatraka przez wiązania dwusiarczkowe i z udziałem białka łączącego podjednostki o m. cz. 70 kDa [39, 40] (Ryc. 1).

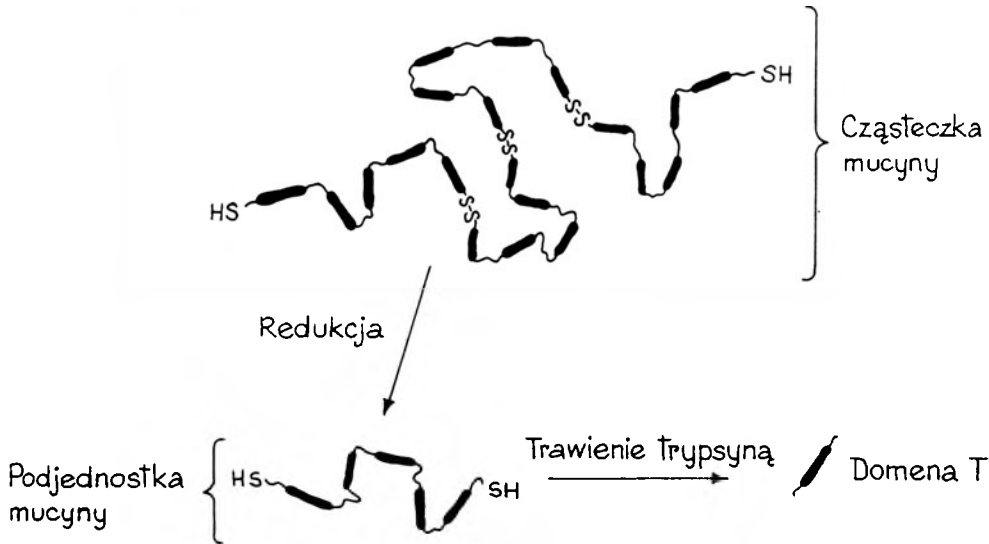
W 1983 roku *Carlstedt i współautorzy* [41] przedstawili inną koncepcję budowy cząsteczki mucyny, opartą na wynikach badań prowadzonych w warunkach minimalizujących degradację enzymatyczną i mechaniczną glikoproteiny podczas izolowania. Mucyny otrzymane ze śluzu szyjkowego, oskrzelowego i żołądkowego miały znacznie większą masę cząsteczkową, (10000-40000 kDa) [41] i w mikroskopie elektronowym dawały obraz poplątanych nitek o długości 200-4000 nm [42, 43]. Zdaniem *Sheehana i Carlstedta* [44, 45] mucyna tworzy nitkowate cząsteczki, które powstają drogą dwusiarczkowej polimeryzacji „koniec do końca” z podjednostek o m. cz.



Ryc. 1. Budowa cząsteczki mucyny śluzu żołądkowego wg *Allena i współautorów* [40].

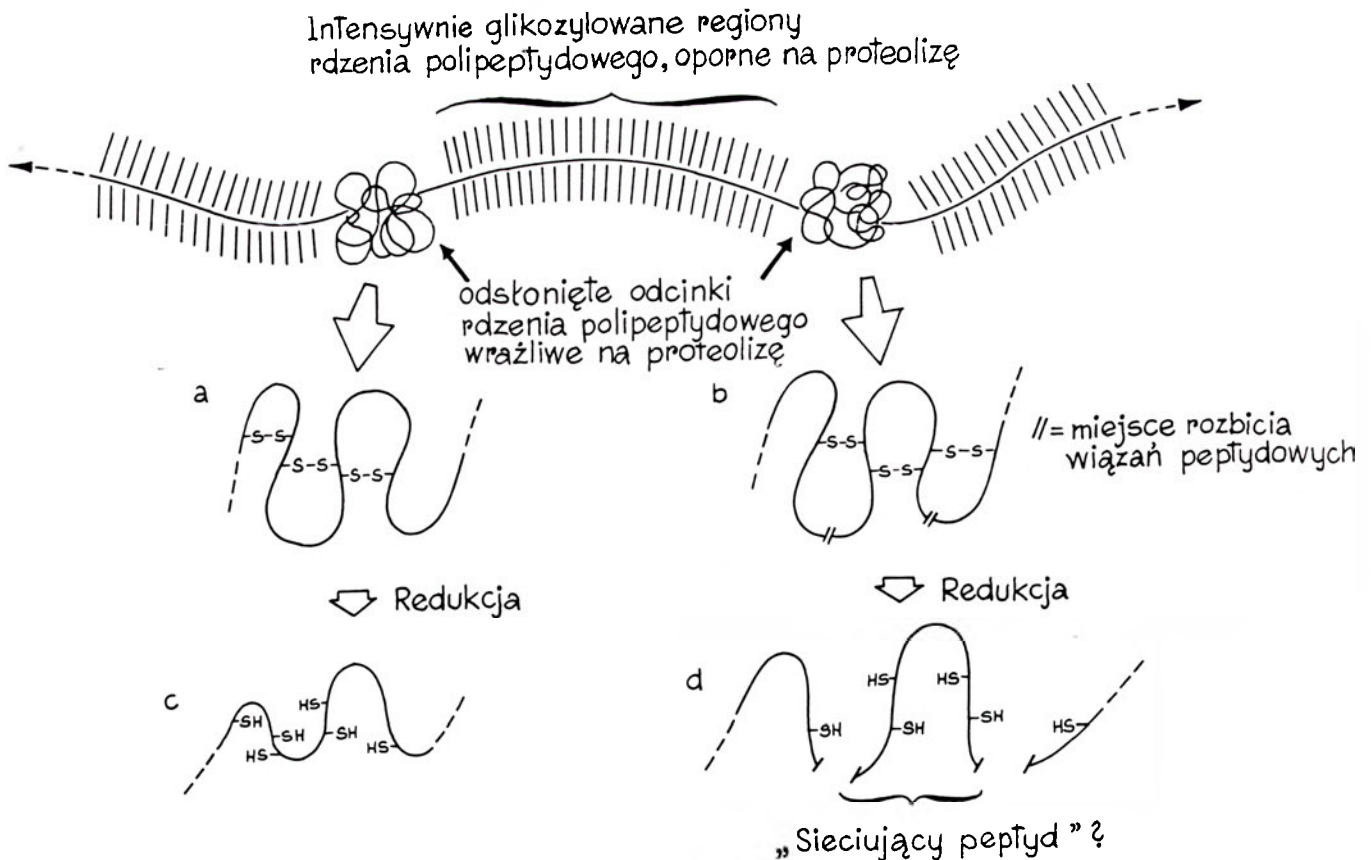
około 2000 kDa. W obrębie każdej podjednostki można wyróżnić cztery do pięciu podstawowych jednostek glikopeptydowych, t.j. gęsto glikozyzowanych fragmentów łańcucha polipeptydowego, poprzedzielanych krótkimi odcinkami nieglikozyzowanymi, silnie pofałdowanymi i prawdopodobnie usieciowanymi przez wiązania dwusiarczkowe (Ryc. 2) [46]. W takiej cząsteczce ograniczona proteoliza nie musi prowadzić do depolimeryzacji, ponieważ wielkocząsteczkowa struktura jest nadal utrzymywana przez wiązania dwusiarczkowe. Dopiero redukcja tych wiązań depolime-

ryzuje mucynę do glikopeptydów o m. cz. 380 kDa (tzw. domeny T, Ryc. 3) [46, 47, 48]. Koncepcja ta zdaje się wyjaśniać przyczynę, dla której masa cząsteczkowa mucyny oznaczona przez Allena i współautorów [38, 39] wynosi 2000 kDa, a masa cząsteczkowa jego podjednostek odpowiada w przybliżeniu m. cz. glikopeptydu T. Obecność wiązań dwusiarczkowych w nieglikozyzowanych obszarach cząsteczek mucyny potwierdzają ostatnie badania. Wykazano bowiem, że w odróżnieniu od natywnych nici mucyny, nici mucyny redukowanej wiąże koloidalne złoto w mniejszych



Ryc. 2. Produkty redukcji cząsteczki mucyny i późniejszego trawienia trypsyną wg Carlstedta i współautorów [46], rysunek zmodyfikowany wg [47].

Ryc. 3. Wpływ ograniczonej proteolizy na cząsteczkę mucyny wg Carlstedta i współautorów [46]. Na rysunku przedstawiono powiększony fragment nieglikozyzowanego białka łączącego podstawowe jednostki glikopeptydowe (a), produkt jego ograniczonego trawienia (b) lub redukcji (c), oraz produkt redukcji trawionego białka (d).



odstępach, odpowiadających w przybliżeniu długości domeny T [49]. Mucyny redukowane i nie redukowane mają, także odmienne właściwości antygenowe. Część białkowych determinant antygenowych jest wspólna, część ujawnia się dopiero po redukcji [50]. Wskazuje to na rolę wiązań dwusiarczkowych w pofałdowaniu cząsteczek mucyny i w stabilizowaniu jej trzeciorzędowej struktury.

Zdaniem Carlstedta i Sheehana [45] białka o m. cz. kilkudziesięciu tysięcy lub więcej daltonów, uwalniane podczas dwusiarczkowej depolimeryzacji, nie pełnią żadnej funkcji strukturalnej i są produktami przypadkowej proteolizy. Opinia ta jest jednak kwestionowana. Oprócz Pearsona i współautorów [40] białko uwalniające się po redukcji wiązań dwusiarczkowych (90 kDa) znaleziono w mucynie z jelita cienkiego świni [51], w mucynie oskrzelowej człowieka (65 kDa) [52, 53] i, mimo stosowania inhibitorów proteolizy, w mucynie jelitowej szczura (118 kDa) [54]. W 1989 roku opublikowano wyniki badań wykonanych w pięciu różnych laboratoriach i obejmujące ponad 50 próbek mucyny z różnych odcinków przewodu pokarmowego [55]. Mimo stosowania inhibitorów proteolizy i izolowania mucyny według różnych procedur, we wszystkich przypadkach redukcji mucyny towarzyszyło uwalnianie swobodnego białka o m. cz. 118 kDa. Białko to cechował podobny skład aminokwasowy i obecność kowalencyjnie związanych cukrów [55]. Przeciwciała przeciwko białku 118 kDa reagowały w teście ELISA z mucyną jelitową szczura, królika i świni z podobnym powinowactwem [56]. Białko 118 kDa uwalniano także z mucyny jelitowej szczura po 10 minutowej inkubacji z trypsyną [54]. Mimo tych faktów, funkcjonalny związek białka 118 kDa ze strukturą mucyny nie został dotąd udowodniony.

IV. Łańcuchy oligosacharydowe mucyn

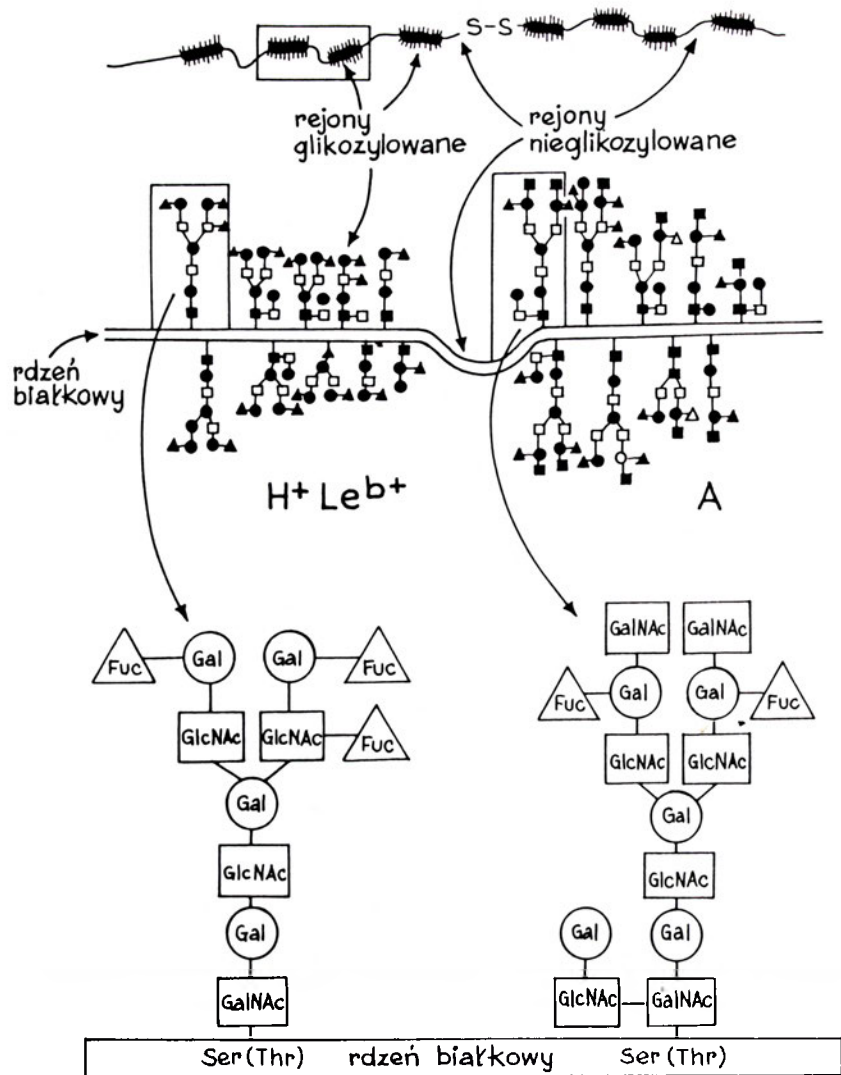
Mucyny są substancjami o znacznym stopniu heterogenności. Jedną z przyczyn heterogenności jest zmienna długość łańcuchów oligosacharydowych, innym powodem jest zmienna liczba podjednostek w cząsteczce. W pierwszym przypadku spektrum mas cząsteczkowych ma charakter ciągły, w drugim różnice mas mogą sięgać kilkuset kilodaltonów. Różnorodność budowy części cukrowej mucyn jest tak znaczna, że w jednym preparacie mucyny wykazywano obecność kilkunastu różnych łańcuchów oligosacharydowych [57, 58] często o różnym stopniu usiarczanowania [59, 60, 61]. Liczba odmiennych łańcuchów oligosacharydowych znajdujących w mucynach sięga kilkuset i wynika z różnych kombinacji pięciu monosacharydów tworzących łańcuchy proste i rozgałęzione, o różnej długości. Pewne wspólne właściwości pozwalają na wyodrębnienie z każdej oligosacharydo-

wej struktury mucyny części rdzeniowej, (połączonej wiązaniem α -O-glikozydowym z białkiem), części centralnej i części peryferyjnej [57, 58]. Inną wspólną cechą łańcuchów oligosacharydowych mucyn jest występowanie wiązań β -glikozydowych wewnątrz łańcuchów i α -glikozydowych w ich części obwodowej. O biologicznej roli łańcuchów oligosacharydowych, stanowiących ok. 80% składu glikioproteiny, pisano już we wcześniejszych artykułach przeglądowych³. Łańcuchy oligosacharydowe determinują fizyczne właściwości śluzu i zabezpieczają cząsteczki glikoproteiny przed proteolizą, a niektóre z łańcuchów na swym nieredukującym końcu posiadają antygenowe cechy grup krwi (Ryc. 4) [62]. Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość wzajemnych oddziaływań typu lektynowego pomiędzy częścią cukrową jednych cząsteczek mucyny a nieglikozylowaną częścią białkową innych, co może tłumaczyć fizyczne właściwości śluzu [63, 64, 65]. Istotne znaczenie mają także właściwości antygenowe oligosacharydów.

Właściwości antygenowe mucyn wzbudzają zainteresowanie z powodu możliwości wykorzystywania ich do celów diagnostycznych. Wykrycie odmienności w budowie łańcuchów oligosacharydowych w glikoproteinach błon komórek nowotworowych zasugerowało możliwość występowania podobnych odmienności w mucynie pochodzącej z takich tkanek. Charakterystyczna budowa mucyn powoduje, że w ich cząsteczkach wyeksponowane są obszary ze strukturą oligosacharydową. W odróżnieniu od dostępnej w niewielkim stopniu części polipeptydowej, struktura ta jest genetycznie produktem drugiego rzędu ponieważ zależy od ekspresji transferaz cukrowych. Brak niektórych lub ekspresja transferaz nietypowych dla danej tkanki zmieniają antygenowe cechy wydzieliny. Poszukiwania antygenów typowych dla choroby nowotworowej zakończyły się niepowodzeniem, wykryto natomiast nietypową ekspresję znanych już antygenów oligosacharydowych [58, 66], z pojawianiem się tych antygenów w surowicy krwi [67, 68, 69]. Wykorzystując przeciwciała monoklonalne, w surowicy chorych wykrywano antygeny mucynowe H typu 1 i 2, Le^a, Le^b, X, Y, i GICA (sialowana struktura Le^a) (70, 71, 72, 73, 74), a także antygeny o strukturze apomucyny [75]. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że nietypowe antygeny są to krótkie łańcuchy oligosacharydowe odpowiadające antygenom typu płodowego, które w dojrzałej formie zostają zamaskowane przez dobudowanie następnych reszt cukrowych [76, 77].

V. Polipeptydowe rdzenie mucyn

Do niedawna, wskutek niedostępności polipeptydowego rdzenia mucyny (na znacznym odcinku szczelnie osłoniętego łańcuchami oligosacharydowymi) informacje o jego strukturze zdobywano drogą pośrednią. Wprowadzenie techniki chemicznej deglikozylacji za



Ryc. 4. Budowa łańcuchów oligosacharydowych mucyny człowieka, wg [62].

pomocą bezwodnego fluorowodoru lub kwasu trójfluoro-metano-sulfonowego umożliwiło prawie całkowite odłączenie łańcuchów oligosacharydowych od polipeptydowego rdzenia [78, 79]. Rdzeń ten jest homogennym białkiem o m. cz. ok. 100 kDa, zbudowanym w przeważającej części z hydroksyaminokwasów (45 na 100 reszt aminokwasowych) [80, 81, 82]. Przeciwciała przeciwko temu białku (apomucynie) pozwoliły na dokonanie szeregu interesujących odkryć. Z ich pomocą apomucynę zlokalizowano w cytoplazmie komórek i w przestrzeni okołojądrowej [83, 84] jak również wykazano, że w RER syntetyzowane są dwa prekursorowe polipeptydy o m. cz. 41 i 46 kDa. W aparacie Golgiego masa prekursora wzrasta do 100 kDa a w ziarnistościach wydzielniczych osiąga 200 kDa [85], prawdopodobnie w wyniku częściowej glikozylacji i polimeryzacji dwusiarczkowej. Ponieważ antyśrodek przeciwko apomucynie nie reaguje z kompletną mucyną [86], można było zlokalizować w błonie śluzowej żołądka komórki syntetyzujące glikoproteinę (młodsze) i wydzielające śluz (starsze) [79]. Największe cząsteczki prekursora mucyny zdolne do reakcji z przeciwciałem przeciwko apomucynie miały masę w zakresie 200-400 kDa [87].

Dzięki rozwojowi biologii molekularnej i techniki klonowania DNA uzyskano szereg nowych informacji o apomucynie. I tak wykorzystując mRNA z gruczołów podszczękowych zsyntetyzowano w układzie bezkomórkowym polipeptyd o m. cz. 60 kDa reagujący z przeciwciałami przeciwko apomucynie [88]. Z wieprzowych ślinianek [89], ludzkiego gruczołu sutkowego [90, 91], z jelita cienkiego i grubego człowieka [92, 93] uzyskano preparaty komplementarnego DNA (cDNA) kodującego fragmenty struktury apomucyny. W różnych preparatach cDNA kod genetyczny zawierał wielokrotnie powtarzające się odcinki złożone z 51, 60, 69 i 270 par zasad, kodujące powtarzające się sekwencje polipeptydowe, bogate w treoninę, prolinę i serynę [93, 91, 92, 89], i reagujące z przeciwciałami przeciwko apomucynie. Dodatkowe informacje uzyskane z wyżej opisanych badań wskazują, że skład aminokwasowy różnych apomucyn nie jest jednakowy i może być zdeterminowany przez allele.

VI. Potranslacyjne modyfikacje mucyn

Ze składu aminokwasowego apomucyny, wydedukowanego w oparciu o strukturę cDNA można wnosić,

że w polipeptydowym rdzeniu mucyny znajdują się dwa miejsca, które mogą ulegać N-glikozylacji [92]. Dotychczas występowanie w preparatach mucyny niewielkich ilości mannozy, charakterystycznej dla oligosacharydów N-glikozydowych, traktowano jako zanieczyszczenie. Najnowsze doświadczenia typu impuls-wymywanie (*pulse-chase experiments*) z użyciem znakowanych substratów wyraźnie wskazują, że podczas translacji do białkowego prekursora mucyny z żołądka szczura o m. cz. 300 kDa dobudowują się N-glikozydowe oligosacharydy, a dopiero później galaktoza i siarczany [94, 95]. Dwusiarczkowa oligomeryzacja polipeptydowych prekursorów mucyny do dimerów i trimerów zachodzi w RER i wymaga wcześniejszej N-glikozylacji. O-glikozylacja i siarczanie zachodzą w aparacie Golgiego [95]. Acylacja apomucyny kwasami tłuszczowymi jest prawdopodobnie także wcześniejsza niż O-glikozylacja [31, 33].

VII. Śluz i zwłóknienie torbielowate

Zwłóknienie torbielowate jest najczęściej występującą chorobą uwarunkowaną genetycznie. Istota choroby polega na wydzielaniu gęstego śluzu przez gruczoły i nabłonek trzustki, wątroby, żołądka, jelit i dróg oddechowych. Śluz zatyka światło przewodów powodując ich rozdęcie i powstawanie torbieli. W konsekwencji dochodzi do zwłóknienia narządów i do infekcji bakteryjnych, którym towarzyszą niedobór enzymów trawiennych i zaburzenia wchłaniania.

Czynione są liczne próby ustalenia przyczyn odmiennych właściwości śluzu chorych na zwłóknienie torbielowate. Wykazano, że masa cząsteczkowa mucyny tych chorych jest w rozcieńczonych roztworach buforowych znacznie większa (12 200-17 100 kDa) niż mucyny normalnej (6 300-8 600 kDa), natomiast w 6 M roztworze chlorowodoru guanidyny jest taka sama jak mucyny normalnej (5 000 kDa), co wskazuje na jej większe skłonności do agregacji [96]. Mucyna chorych na zwłóknienie torbielowate, po redukcji, również uwalnia glikoproteinę 118 kDa, jednak jej cząsteczki wykazują zwiększoną reaktywność z przeciwciałami przeciwko glikoproteinie 118 kDa, sugerując odmienną konformację mucyny chorych na mukowiscydozę [97]. Badania struktury oligosacharydowej mucyny z dróg oddechowych chorych na zwłóknienie torbielowate wskazują na większą niż normalnie zawartość kwasu N-acetyloneuraminowego i siarczanu [98, 99, 100, 101, 102, 103]. Inną anomalią, i być może przyczyną wzmożonej lepkości śluzu, jest zwiększona estryfikacja hydroksyaminokwasów apomucyny przez kwasy tłuszczowe, co wpływa hamująco na jej proteolityczną degradację [104]. W mucynie chorych na mukowiscydozę znaleziono 6 razy więcej kowalencyjnie związanych kwasów tłuszczowych. Ekstrakcja zasocjowanych lipidów, jak również deacylacja glikoproteiny, powodowały znaczne (3 i 6-ciokrotne) ob-

niżenie lepkości, wskazując na rolę lipidów w tym zjawisku [104, 105]. Jak dotąd te interesujące wyniki nie zostały potwierdzone przez inne laboratoria.

Artykuł otrzymano 30 kwietnia 1991 r.
Zaakceptowano do druku 13 czerwca 1991 r.

Piśmiennictwo

- Hill H.D., Reynolds J.A., Hill R.L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**: 3791-3798.
- Chace K.V., Flux M., Sachdev G.P., (1985), *Biochemistry* **24**: 7334-7341.
- Ringler N.J., Selvakumar R., Woodward H.D., Simet I.M., Bhavanandan V.P., Davidson E.A., (1987), *Biochemistry* **26**: 5322-5328.
- Sanford B.A., Thomas V.L., Ramsay M.A., (1989), *Infection and Immunity* **57**: 3735-3742.
- Ramphal R., Houdret N., Koo L., Lamblin G., Roussel P., (1989), *Infection and Immunity* **57**: 3066-3071.
- Wishwanath S., Ramphal R., (1985), *Infection and Immunity* **48**: 331-335.
- Mouricout M., Julien R., (1987), *Glycoconjugates. Proc. IXth Int. Symposium, Lille, France, G 14*.
- Hansson G.C., Karlsson H., Carlstedt I., (1987), *Glycoconjugates. Proc. IXth Int Symposium, Lille, France A 71*.
- Carlstedt-Duke B., Midtvedt T., Nord C.E., Gustafsson B.E., (1986), *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.* **94**: 293-300.
- Ślomiany B.L., Bilski J., Sarosiek J., Murty V.L.N., Dworkin B., Van Horn K., Zieliński J., Ślomiany A., (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 307-314.
- Crowther R.S., Marriott C., (1984), *J. Pharm. Pharmacol.* **36**: 21-26.
- Saitoh H., Hasegawa N., Kawai S., Miyazaki K., Arita T., (1986), *J. Pharmacobio. Dyn.* **9**: 1008-1014.
- Creeth J.M., Cooper B., Donald A.S.R., Clamp J.R., (1983), *Biochem. J.* **211**: 323-332.
- Grisham M.B., Von Ritter C., Smith B.F., Lamont J.T., Granger D.N., (1987), *Am. J. Physiol.* **253**: 93-96.
- Gong D., Turner B., Bhaskar K.R., Lamont J.T., (1990), *Am. J. Physiol.* **259** (Gastrointest. Liver Physiol 22): 681-686.
- Clamp J.R., Creeth J.M., (1984), *Mucus and Mucosa, Pitman London*, (Ciba Foundation symposium 109), str. 121-136.
- Van-Seuningen J., Davril M., Hayem A., (1989), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**: 749-755.
- Boudier C., Bieth J.G., (1989), *Biochim. Biophys. Acta* **995**: 36-41.
- Clamp J.R., Cooper B., Creeth J.M., Ene D., Barrett J., Gough M., (1983), *Biochem. J.* **215**: 421-423.
- Clamp J.R., Cooper B., Creeth J.M., Ene D., (1984), W: Allen A., (red.) *Mechanism of Mucosal Protection in the Upper Gastrointestinal Tract*, Raven Press, New York, str. 203-208.
- Wu S.-S., Lee A.C., Bush C.A., (1987), *Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, A 58*.
- Witas H., Sarosiek J., Aono M., Murty V.L.N., Ślomiany A., Ślomiany B.L., (1983), *Carbohydr. Res.* **120**: 67-76.
- Ślomiany B.L., Sarosiek J., Ślomiany A., (1987), *Dig Dis* **5**: 125-145.
- Hansson C.G., Sheehan J.K., Carlstedt J., (1988), *Archs. Biochem. Biophys.* **266**: 197-200.
- Hansson G., Sheehan J.K., Carlstedt J., (1987), *Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, B 52*.
- Gwoździński K., Ślomiany A., Nishikawa H., Okazaki K., Ślomiany B.L., (1988), *Biochem. Int.* **17**: 907-917.
- Ślomiany B.L., Murty V.L.N., Sarosiek J., Piotrowski J., Ślomiany A., (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**: 1046-1053.

28. Shankar V., Naziruddin B., Reyes de la Rocha S., Sachdev G.P., (1990), *Biochemistry* **29**: 5856-5864.
29. Sheehan J.K., Carlstedt J., (1990), *Biochem. J.* **265**: 169-178.
30. Sachdev G., Chace K., Flux M., Reyes de la Rocha., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, A 70.
31. Slomiany B.L., Takagi A., Liau Y.H., Józwiak Z., Slomiany A., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**: 11997-12000.
32. Slomiany A., Liau Y.H., Takagi A., Łaszewicz W., Slomiany B.L., (1984), *J. Biol. Chem.* **259**: 13304-13308.
33. Slomiany B.L., Tsukada H., Slomiany A., (1986), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 387-393.
34. Slomiany B.L., Liau Y.H., Carter S.R., Zielen-ski J., Slomiany A., (1986), *Archs. Oral. Biol.* **31**: 463-468.
35. Zaleśna G., Tsukada H., Okazaki K., Slomiany B.L., Slomiany A., (1989), *Biochem. Int.* **18**: 775-784.
36. Harding S.E., (1989), *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **47**: 345-381.
37. Gindzieński A., Zwierz K., (1987), *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **38**: 347-354.
38. Allen A., Pain R., Robson T., (1976), *Nature* **264**: 88-89.
39. Clamp J.R., Allen A., Gibbons R.A., Roberts G.P., (1978), *Br. Med. Bull.* **34**: 25-41.
40. Pearson J.P., Allen A., Parry S., (1981), *Biochem. J.* **197**: 155-162.
41. Carlstedt I., Sheehan J.K., (1984), *Mucus and Mucosa, Pitman, London* (Ciba Foundation symposium 109) p. 157-172.
42. Sheehan J.K., Oates K., Carlstedt I., (1986), *Biochem. J.* **239**: 147-153.
43. Marianne T., Perini J.M., Lafitte J.J., Houdret N., Pruvot F.R., Lamblin G., Slayter H.S., Roussel P., (1987), *Biochem. J.* **248**: 189-195.
44. Sheehan J.K., Carlstedt I., (1990), *Biochem. J.* **265**: 169-178.
45. Carlstedt I., Sheehan J.K., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, B 53.
46. Carlstedt I., Sheehan J.K., Corfield A.P., Gal-lagher J.T., (1985), *Essays in Biochem.* **20**: 40-76.
47. Carlstedt I., Sheehan J.K., (1988), *Monographs in Allergy* **24**: 16-24, wyd. S. Karger, Basel.
48. Thornton D.J., Davies J.R., Kraayenbrink M., Richardson P.S., Sheehan J.K., Carlstedt I., (1990), *Biochem. J.* **265**: 179-186.
49. Sheehan J.K., Carlstedt I., (1990), *Biochem. J.* **265**: 169-178.
50. Sheehan J.K., Boot-Handford R.P., Chantler E., Carlstedt I., Thornton D.J., (1991), *Biochem. J.* **274**: 293-296.
51. Mantle M., Mantle D., Allen A., (1981), *Biochem. J.* **195**: 277-285.
52. Ringler J.R., Selvakumar R., Woodward H.D., Simet I.M., Bhavanandan V.P., Davidson E.A., (1987), *Biochemistry* **26**: 5322-5328.
53. Ringler N.J., Selvakumar R., Woodward H.D., Bhavanandan V.P., Davidson E.A., (1988), *Biochemistry* **27**: 8056-8063.
54. Fahim E.F., Specian R.D., Forstner G.G., Forstner J.F., (1987), *Biochem. J.* **243**: 631-640.
55. Robertson A.M., Mantle M., Fahim R.E.F., Specian R.D., Bennick A., Kawagishi S., Sherman P., Forstner J.F., (1989), *Biochem. J.* **261**: 637-641.
56. Mantle M., Stewart G., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, F 46.
57. Hounsell E.F., Feizi T., (1982), *Med. Biol.* **60**: 227-236.
58. Roussel P., Lamblin G., Lhermitte M., Houdret N., Lafitte J.J., Perini J.M., Klein A., Scharfman A., (1988), *Biochimie* **70**: 1471-1482.
59. Goso Y., Hotta K., (1989), *Biochem. J.* **264**: 805-812.
60. Van Beurden-Lamers W.M.O., Spec-Brand R., Dekker J., Strous G.J., (1989), *Biochim. Biophys. Acta* **990**: 232-239.
61. Dekker J., Strous G.J., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, E 65.
62. Zwierz K., Gindzieński A., Ostrowska L., Stankiewicz-Choroszuca B., (1989), *Acta Med. Hung* **64**: 275-288.
63. Silberberg A., (1987), *Biorheology* **24**: 605-614.
64. Silberberg A., (1988), *Biorheology* **25**: 799-801.
65. Silberberg A., (1988), Braga P.C., Allegra L., (red.), *Methods in Bronchial Mucology*, Raven Press Ltd, str. 51-61.
66. Watkins W.M., Greenwell P., Yates A.D., Johnson P.H., (1988), *Biochimie* **70**: 1597-1611.
67. Ginsburg V., Fredman P., Magnani J.L., (1984), *Contr. Oncol.* **19**: 44-50.
68. Magnani J.L., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsburg V., (1983), *Cancer Res.* **43**: 5489-5492.
69. Nakada H., Kitagawa H., Kurosaka A., Fukui S., Numata Y., Funakoshi I., Kawasaki T., Yamashina I., (1987), Glycoconjugates IXth Int Symposium, Lille, France, F 42.
70. Magnani J.L., Nilsson B., Brockhaus M., Zopf D., Steplewski Z., Koprowski H., Ginsburg V., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**: 14365-14369.
71. Herlyn M., Sears H.F., Verril H., Koprowski H., (1984), *J. Immunol. Meth.* **76**: 15-21.
72. Herlyn M., Shen J.W., Sears H.F., Civin C.I., Verril H.L., Goldberg E.M., Koprowski H., (1984), *Clin. Exp. Immunol.* **55**: 23-35.
73. Feizi T., Childs R.A., (1985), *TIBS* **10**: 24-29.
74. Rodeck U., Herlyn M., Leander K., Borlinghaus P., Koprowski H., (1987), *Hybridoma* **6**: 389-401.
75. Price M.R., Hudec F., O'Sullivan C., Baldwin R.W., Edwards P.M., Tendler S.J.B., (1990), *Molec. Immunol.* **27**: 795-802.
76. Kurosaka A., Nakajima H., Funakoshi I., Matsujama M., Nagayo T., Yamashina I., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**: 11594-11598.
77. Maoret J.-J., Font J., Augeron C., Codogno P., Bauvy C., Aubery M., Laboisie C.L., (1989), *Biochem. J.* **258**: 793-799.
78. Sojar H.T., Bahl O.P., (1987), *Meth., Enzymol.* **138**: 341-350.
79. Van Beurden-Lamers W.M.O., Peters P., Strous G.J., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France E 68.
80. Marianne T., Perini J.M., Houvenahgel M.C., Tramu G., Lamblin G., Roussel P., (1986), *Carbohydr. Res* **151**: 7-19.
81. Woodward H.D., Ringler N.J., Selvakumar R., Simet J.M., Bhavanandan V.P., Davidson E.A., (1987), *Biochemistry* **26**: 5315-5322.
82. Dekker J., Van Beurden-Lamers W.M.O., Oprins A., Strous G.J., (1989), *Biochem. J.* **260**: 717-723.
83. Perini J.M., Marianne T., Lafitte J., Lamblin G., Roussel P., Mazzuca M., (1989), *J. Histochem. Cytochem.* **37**: 869-875.
84. Mazzuca M., Perini J.M., Marianne T., Lafitte J.J., Lamblin G., Roussel P., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille, France, E 88.
85. Dekker J., Van Beurden-Lamers W.M.O., Strous G.J., (1987), Glycoconjugates Proc IXth Int Symposium, Lille, France, E 67.
86. Jentjens T., Van de Kamp A., Spec-Brand R., Strous G.J., (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **887**: 133-141.
87. Marianne T., Perini J.M., Lafitte J.J., Lamblin G., Roussel P., (1987), Glycoconjugates. Proc IXth Int Symposium, Lille France, E 89.
88. Bhavanandan V.P., Hegarty J.D., (1987), *J. Biol. Chem.* **262**: 5913-5917.
89. Timpte C.S., Eckhardt A.E., Abernethy J.L., Hill R.L., (1988), *J. Biol. Chem.* **263**: 1081-1088.
90. Siddiqui J., Abe M., Hayes D., Shari E., Yunis E., Kufe D., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **85**: 2320-2323.
91. Gendler S., Taylor-Papadimitriou J., Duhing T., Rothbard J., Burchell J., (1988), *J. Biol. Chem.* **263**: 12820-12823.
92. Gum J.R., Byrd J.C., Hicks J.W., Toribara N.W., Lamport D.T.A., Kin Y.S., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 6480-6487.
93. Gum J.R., Hicks J.W., Swallow D.M., Lagace

- R.L., Byrd J.C., Lampion D.T.A., Siddiki B., Kim Y.S., (1990), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**: 407-415.
94. Dekker J., Van Beurden-Lamers W.M.O., Strous G.J., (1989), *J. Biol. Chem.* **264**: 10431-10437.
95. Dekker J., Strous G.J., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 18116-18122.
96. Chace K.V., Naziruddin B., Desai V.C., Flux M., Sachdev G.P., (1989), *Exp. Lung. Res.* **15**: 721-732.
97. Mantle M., Stewart G., (1989), *Biochem. J.* **259**: 243-253.
98. Roussel L., Lamblin G., Degand P., Havez R., (1972), *Clin. Chim. Acta* **36**: 315-328.
99. Roussel P., Lamblin G., Degand P., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**: 2114-2122.
100. Frates Jr. R.C., Kaizu T.T., Last J.A., (1983), *Pediatr. Res.* **17**: 30-34.
101. Mawhinney T.P., Adelstein E., Morris D.A., Mawhinney A.M., Barbero G.J., (1987), *J. Biol. Chem.* **262**: 2994-3001.
102. Breg J., Van Halbeek H., Vliegthart J.F.G., Lamblin G., Houvenaghel M.-C., Roussel P., (1987), *Eur. J. Biochem.* **168**: 57-68.
103. Van Halbeek H., Breg J., Vliegthart J.F.G., Klein A., Lamblin G., Roussel P., (1988), *Eur. J. Biochem.* **177**: 443-460.
104. Slomiany A., Witas H., Aono M., Slomiany B.L., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**: 8535-8538.
105. Slomiany B.L., Murty V.L.N., Carter S.R., Slomiany A., (1986), *Digestion* **34**: 275-280.

Molekularne podłoże mukowiscydozy

Molecular basis of cystic fibrosis

JERZY BAL¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Gen CF
 - II-1. Klonowanie genu
 - II-2. Struktura genu
- III. Białko CFTR
- IV. Mutacje w genie CF
 - IV-1. Metody identyfikacji mutacji
 - IV-2. Mutacja $\Delta F508$
 - IV-3. Inne mutacje w genie CF
 - IV-4. Mutacje w populacji polskiej
 - IV-5. Mutacje a fenotyp
- V. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. CF gene
 - II-1. Gene cloning
 - II-2. Gene structure
- III. CFTR protein
- IV. Mutations in CF gene
 - IV-1. Methods of mutations identification
 - IV-2. $\Delta F508$ mutation
 - IV-3. Other mutations in CF gene
 - IV-4. Mutations in Polish population
 - IV-5. Mutation and phenotype
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

CF — mukowiscydoza (*cystic fibrosis*); CFTR — białko kodowane w genie CF (*cystic fibrosis transmembrane regulator*); cAMP — cykliczny jednofosforan adenozyne; PCR — łańcuchowa synteza fragmentów DNA (polymerase chain reaction); ASPCR — allel specyficzny PCR;

RFLP — zmienność długości fragmentów restrykcyjnych; kb — tysiąc par zasad.

I. Wstęp

Mukowiscydoza — dawna nazwa: zwłóknienie torbielowate trzustki (CF) — jest chorobą genetycznie uwarunkowaną. Dziedziczy się monogenowo jako cecha autosomalna recesywna. W rodzinie ryzyka genetycznego prawdopodobieństwo urodzenia chorego dziecka jest wysokie i wynosi 25%. W populacji europejskiej mukowiscydoza jest najczęstszą chorobą dziedziczną. Szacuje się, że 4—5% populacji to nosiciele zmutowanego genu CF, a jedno dziecko na około 2000 żywych urodzeń obciążone jest tą chorobą.

Upośledzenie funkcji gruczołów zewnątrzwydzielniczych jest przyczyną charakterystycznych objawów klinicznych choroby, wśród których najważniejszymi są: postępująca niewydolność układu oddechowego, upośledzenie funkcji trawiennych (niedobór enzymów trzustkowych) i postępujące wyniszczenie, podwyższenie jonów Cl^- w pocie. Jest to choroba nieuleczalna. Długość życia w zależności od nasilenia objawów chorobowych i możliwości opieki lekarskiej waha się od kilku do 40 lat.

Podane fakty stanowią o społecznym znaczeniu mukowiscydozy, a także roli diagnostyki, terapii i poradnictwa genetycznego. W pracy przedstawiono współczesny stan wiedzy o molekularnym podłożu mukowiscydozy: strukturze genu, jego mutacjach i kodowanym produkcie.

¹Dr, Instytut Matki i Dziecka, Zakład Genetyki
01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a

II. Gen CF

II-1. Klonowanie genu

Gen CF został sklonowany w 1989 r. we współpracy zespołów kierowanych przez Lap-Chee Tsui i Francis Collinsa [1, 2, 3]. Stało się to w niespełna cztery lata od chwili określenia jego pozycji mapowej w długim ramieniu chromosomu 7 (prążek q31). Pozycja mapowa została ustalona dzięki wykazaniu sprzężenia genu CF z znanymi markerami chromosomalnymi [4–6].

Brak dużych delecji, czy innego typu aberracji w obrębie genu CF, utrudniał jego dokładną lokalizację i zwiększał trudności klonowania. Dwa spośród kilkudziesięciu znanych markerów położone najbliżej i leżące po obydwu stronach locus genu CF, wyznaczały odcinek DNA ok. 500 kb. Stosując technikę „walking and jumping” udało się zredukować potencjalny obszar zajmowany przez gen do 280 kb. Fragment ten sklonowano na około 50 różnych wektorach fagowych i kosmidowych.

Sklonowany gen poprzedzony był (koniec 5') tzw. wyspami CpG charakterystycznymi dla wielu genów kręgowców i wykazywał krzyżową hybrydyzację z DNA takich gatunków jak mysz, wół czy kura (zakładano konserwatywną ewolucję genu). Wyizolowano odpowiedni dla tego genu mRNA, znaleziono otwartą ramkę odczytu i zidentyfikowano mutacje.

Sklonowanie genu CF wymagało zastosowania wielu technik rekombinowania DNA, mikrosekcji chromosomu, tworzenia banków DNA, otrzymania i rozdziału wielkich fragmentów DNA itp. Jak wspomniano, do sklonowania genu potrzebnych było kilkadziesiąt różnych wektorów. Obecnie dzięki rozwojowi technik klonowania okazało się możliwe sklonowanie całego genu CF na jednym wektorze drożdżowym [7].

Fakt sklonowania genu CF znalazł ostateczne potwierdzenie gdy w wyniku wprowadzenia do linii komórkowej chorego na mukowiscydozę nie zmutowanego genu wykazano supresję fenotypu CF. Supresja ta obserwowana była jako przywrócenie aktywności kanału chlorkowego regulowane przez cAMP [8, 9].

Zastosowana w przypadku klonowania genu CF, taktyka określana jako „*revers genetics*” (od genu do białka) [10] sprawdziła się również w przypadku klonowania innych genów ludzkich odpowiedzialnych za takie schorzenia jak przewlekła granulatoza [11], dystrofia mięśniowa typu Duchenne'a (DMD) [12, 13], neurofibromatosis [14], płasawica Huntigtona czy choroba Alzheimera [15]. W sytuacji kiedy w wielu krajach podejmuje się projekty sekwencjonowania genomu ludzkiego wydaje się, że ten sposób postępowania pozwoli na uzyskanie informacji o innych genach ludzkich.

II-2. Struktura genu

Gen CF zajmuje obszar około 250 kb i składa się z 27 eksonów. cDNA ma wielkość 6129 nukleotydów, a pojedyncza otwarta ramka odczytu 4440 nukleotydów [2, 16].

Jak dotąd znana jest sekwencja około 10% całego genu. Znane są sekwencje nukleotydów wszystkich eksonów i sąsiadujących z nimi fragmentów intronów. W końcu 5' genu CF nie ma sygnałów typu „TATA box” czy „CAAT box”, znajdują się natomiast sekwencje bogate w pary GC, charakterystyczne dla czynników transkrypcyjnych SP1 i AP1. Poliadenylacja w końcu 3' rozpoczyna się od pojedynczego sygnału AATAAA.

Wielkość eksonów jest zróżnicowana. Najmniejszy jest ekson 14b złożony z 38 nukleotydów, największy zaś ekson 13, na który składają się 724 nukleotydy. Wielkości intronów wahają się od 1.1 do 40 kb.

Analiza rejonów ekson/intron wskazuje na występowanie wariantu GT-AT. Zgodność poszczególnych nukleotydów na styku ekson/intron (miejsce akceptorowe) dla układu T/C T/C N C/T A G wynosi odpowiednio 92, 88, 100, 96, 100 i 100%. Na styku intron/ekson (miejsce donorowe) dla układu zasad G T A/G A G T stwierdzono zgodność 100, 100, 96, 61, 70 i 46%. W większości przypadków (58%) introny nie rozdzielają ostatniej w eksonie trójki kodującej aminokwas (intron typu 0). W 11% przypadków rozdział następuje po pierwszym (intron typu 1) a w 31% po drugim nukleotydzie ostatniego kodonu (intron typu 2).

W eksonach znaleziono szereg wariantów polimorficznych [16, 17]. W większości nie prowadzą one do zmiany kodowanego aminokwasu lub jak się wydaje powodowane zmiany, typu Ileu na Leu czy Gli na Ala, nie odbijają się na aktywności czy funkcji białka.

Szereg elementów powtarzających się zostało zlokalizowanych w znanych fragmentach intronowych. Zidentyfikowano pięć tzw. sekwencji Alu i jedną Kpn. Znalaziono również zespoły sekwencji typu (Ca/GT)—*n*, (GT)—17, (GATT)—7 i inne [16]. Wykazano ponadto, że powtarzająca się sekwencja GATT zlokalizowana w końcu 3' intronu 6 występuje w dwóch wariantach polimorficznych: (GATT)—6 i (GATT)—7. Występowanie heksameru /(GATT)—6/ jest w pełnej asocjacji z obecnością mutacji $\Delta F508$ [18].

Nie wszystkie aspekty struktury genu wydają się być jednak wyjaśnione. Ostatnio wykazano, że w komórkach zdrowego człowieka może istnieć frakcja mRNA pozbawiona eksonu 9 [19]. Nie wyklucza się również możliwości startu transkrypcji w innym niż opisano miejscu, jak też alternatywnej obróbki transkryptu kilku eksonów [8].

III. Białko CFTR

Białko kodowane przez gen CF ze względu na przypisywaną mu funkcję zostało nazwane „*cystic fibrosis transmembrane regulator*” (CFTR), a jego struktura została zaproponowana na podstawie sekwencji nukleotydów genu CF [2].

Początek otwartej ramki odczytu rozpoczyna się trójką AUG w pozycji 133 mRNA. Sekwencja nukleotydów otaczająca ten kodon 5' — AGACCAUGCA — 3' jest zgodna z sekwencjami inicjacyjnymi translacji znanymi u Eukaryota. Kodowany w genie CF polipeptyd złożony jest z 1480 aminokwasów o masie cząsteczkowej 168133 daltonów. Ponieważ, jak się wydaje, nie ma on peptydu sygnałowego, rolę jego może spełniać silnie hydrofilowy fragment położony blisko końca N.

W białku CFTR można wyróżnić szereg domen (Ryc. 1). Pozycję centralną zajmuje domena R (regulacyjna). Po obu jej stronach znajdują się domeny określane jako: domena wewnątrz błonowa (*membrane-spaning domain*) i domena wiążąca nukleotydy (NBF — *nucleotide (ATP) binding folds*). Mimo, że tylko w przypadku domen NBF wykazano wysokie podobieństwo sekwencji nukleotydów wydaje się, że gen CF powstał w wyniku duplikacji fragmentu DNA.

Domena R kodowana jest w całości przez największy ekson 13. W jej strukturze stwierdzono obecność 9 z 10 istniejących w białku sekwencji uznawanych jako miejsca fosforylacji przez kinazę białkową A i 7 miejsc substratowych dla kinazy białkowej C.

Domeny wewnątrz błonowe (eksony 3—7 i 14b—18) zawierają po sześć hydrofobowych fragmentów zdolnych do penetracji podwójnej błony lipidowej.

Domenom NBF przypisuje się kluczowe dla funkcji białka znaczenie. Pierwsza z nich kodowana jest przez ekson 9—12, druga przez 19—21. Domeny te złożone są z około 180 aminokwasów. Jak zaznaczono, istnieje wysoka zgodność sekwencji obu domen. Na końcu

C z 66 aminokwasów 27% jest identyczna, a 11% funkcjonalnie podobna. Przyjmuje się, że rolą domen NBF jest wiązanie ATP.

Poznanie sekwencji aminokwasów i struktury białka CFTR pozwoliło na jego porównanie z białkami o zbliżonej funkcji [2, 20, 21]. Wykazano daleko idące podobieństwo białka CFTR i wielu bakteryjnych białek transportowych, drożdżowego białka STE6, ssaczego „MDR — *multi drug resistance*”, wołowej cykazy adenylowej czy P-glikoproteiny.

Identyfikacja białka CFTR umożliwiła stwierdzenie, że jest ono błonową glikoproteiną. Brak glikozylacji wydaje się być wspólną cechą wszystkich zmutowanych białek, niezależnie od miejsca mutacji w genie CF. Wydaje się, że właśnie brak możliwości właściwego dojrzewania białka jest istotą defektu genu CF [22, 23].

Ostatnio udowodniono, że białko CFTR pełni funkcję kanału chlorkowego [24, 25], a plejotropowość efektów towarzysząca mukowiscydozie wiązana jest ze zmianą kwasowości w organelach komórkowych [26].

Sklonowany ostatnio gen CF myszy, jak się wydaje, będzie stanowił wygodny model dla ostatecznego wyjaśnienia roli białka CFTR. Gen CF myszy wykazuje olbrzymie podobieństwo do genu człowieka [27]. 80% sekwencji jest identyczna. W eksonach kodujących NBF1 — dziesiątym i jedenastym, homologia jest jeszcze wyższa i wynosi odpowiednio 91 i 97%. Sądzi się, że możliwość „konstruowania” myszy transgenicznych pozwoli odtworzyć układ mutacji znany z ludzkiego genu CF. Stworzone zostały również nowe możliwości istotne dla badań klinicznych mukowiscydozy.

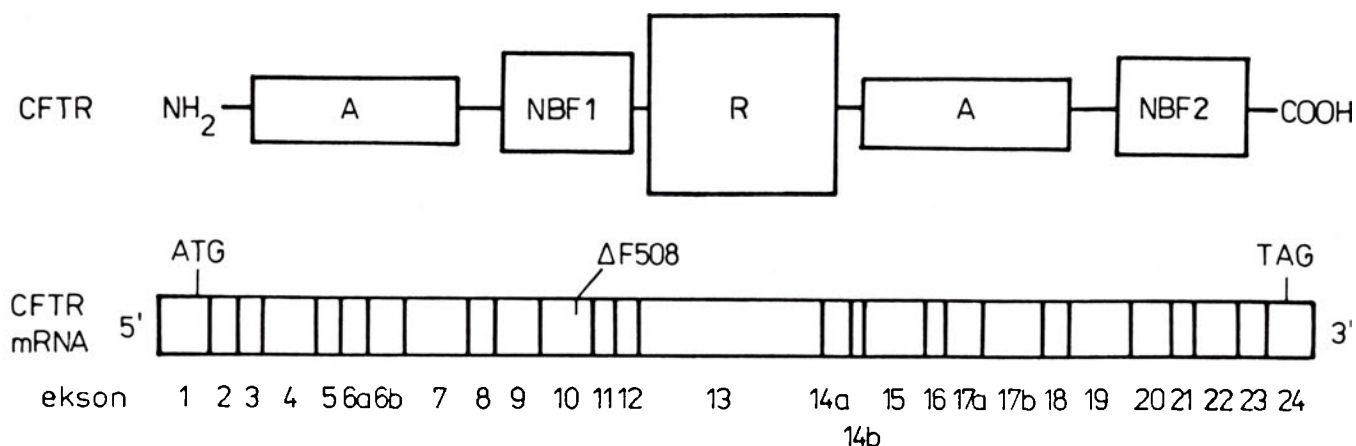
IV. Mutacje

IV-1. Metody identyfikacji mutacji

Podstawą wszystkich metod identyfikacji czy też poszukiwania nowych mutacji jest modyfikacja odpowiedniego fragmentu genu w reakcji PCR [28]. W zależności od charakteru zmian w DNS i stosowanej metody, wykrycie mutacji możliwe jest w jednym

Ryc. 1 Schemat budowy białka i mRNA CFTR

A — domena wewnątrz błonowa;
NBF — domena wiążąca nukleotydy;
R — domena regulacyjna.



kroku — ASPCR [29], lub wymaga dalszej analizy. Małe dwutrójnukleotydowe delecje wykrywa się rozdzielając produkty amplifikacji w żelu akryloamidowym, w przypadku zaś gdy mutacja dotyczy powstania lub zaniku charakterystycznego miejsca restrykcyjnego, stosuje się trawienie odpowiednią endonukleazą restrykcyjną [28]. Możliwość tworzenia w reakcji PCR sztucznych miejsc restrykcyjnych [30, 31] pozwala wyprzeć metody izotopowe, jakkolwiek przy identyfikacji pewnych mutacji są one w dalszym ciągu niezastąpione [32, 33].

Stosunkowo łatwe wykrywanie różnic w konformacji nici DNA, powstałych w wyniku nawet pojedynczej zmiany nukleotydów, znalazło zastosowanie w poszukiwaniu nowych mutacji [34, 35]. Sekwencjonowanie DNA musi weryfikować jednak zawsze wyniki tych eksperymentów.

IV-2. Mutacja Δ F508

Mutacja Δ F508 jest trójnukleotydową delecją w eksonie 10 (pierwsza domena NBF) odpowiadającą pozycji 508 łańcucha aminokwasów. W wyniku mutacji polipeptydu „wypada” fenyloalanina [3].

Badania populacyjne wykazały, że mutacja Δ F508 odpowiedzialna jest średnio za około 70% wszystkich mutacji w genie CF [3, 36, 37]. Najwyższą częstość jej występowania, blisko 90% stwierdzono w populacji duńskiej, najniższą około 30% w tureckiej. Na dominujący udział jednej mutacji odpowiedzialnej za defekt genu CF wskazywały wyniki analizy sprzężeń markerów z genem CF zanim jeszcze delecja F508 została wykryta [38, 39]. Analiza haplotypów dwóch najczęściej stosowanych markerów XV2c i KM19 wykazała, że jeden z czterech możliwych haplotypów tzw. haplotyp B [1, 2] występuje wraz ze zmutowanym genem CF w ponad 70% (wartość średnia dla kilkunastu populacji). Po zidentyfikowaniu mutacji Δ F508 okazało się, że właśnie haplotyp B w przeważającej liczbie przypadków towarzyszy występowaniu delecji F508 [3, 37, 37]. W tym samym tle genetycznym określonym przez haplotyp B występują także i inne mutacje. Mutacja Δ F508 w jednostkowych przypadkach opisana została z innymi haplotypami markerów XV2c i KM19 [3, 32].

IV-2. Inne mutacje

Asocjacje haplotypów kilku badanych markerów ze zmutowanym genem CF wskazywały na możliwość istnienia jeszcze kilku innych mutacji, w tym *locus* [40, 41]. Wykrycie do połowy 1991 r. ponad 70 różnych mutacji (*Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*, CFGAC, 1991) jest jednak pewnym zaskoczeniem.

Większość z tych mutacji to mutacje rzadkie, występujące sporadycznie [33, 34, 42]. Część z nich jest charakterystyczna dla badanych populacji [17, 33].

Mutacje grupują się zasadniczo w tych fragmentach genu, które kodują obie domeny NBF. Większość z dotychczas wykrytych mutacji mapuje się w eksonie 10 i 11 [32, 42–44]. W eksonie 11 w odcinku 34 nukleotydów zidentyfikowano 10 różnych mutacji z czego cztery występują w populacji europejskiej z częstością od kilku do kilkunastu procent [44]. Jak dotychczas tylko dwie rzadkie mutacje opisano dla największego eksonu 13 [45, 46].

Obok delecji F508 opisano również trójnukleotydową delecję I1507 [28] i I506 (I — izoleucyna) [47]. Znanych też jest szereg innych małych delecji dwu lub jedno nukleotydowych prowadzących do zmiany ramki odczytu [32, 33, 45, 46, 48]. Największa ze znanych delecji obejmuje 22 nukleotydy (CFGAC). Większość mutacji to mutacje typu *missens* [33]. Opisano również szereg mutacji typu *nonsense* w różnych eksonach [17, 32, 43, 44, 49]. Oprócz mutacji eksonowych znane są również — mutacje w intronach niszczące miejsce obróbki transkryptu [32, 33, 50].

Częstość występowania mutacji Δ F508 układa się w Europie wzdłuż gradientu z północnego zachodu na południowy wschód [36]. Sądzi się, że może to odpowiadać sytuacji określającej miejsce powstania mutacji, a następnie kierunkom jej rozchodzenia.

Inny mechanizm towarzyszył zapewne powstaniu identycznej mutacji w całkowicie odmiennych tłach genetycznych (różne haplotypy dla kilku markerów). Sytuacje takie ilustruje mutacja *nonsense* R553X w eksonie 11 u chorych na mukowiscydozę amerykańskiego Murzyna i Niemca [51].

IV-3. Mutacje w populacji polskiej

Jak zaznaczono, częstość występowania delecji F508 różni się wśród badanych populacji. Badania przeprowadzone na próbie 94 chorych na mukowiscydozę w Polsce pozwalają oszacować częstość tej mutacji na około 54%. Wartość ta jest wyższa od podawanej poprzednio [52], w dalszym ciągu należy jednak do jednej z niższych w badanych populacjach europejskich i północnoamerykańskich. Badania prowadzone do tej pory skoncentrowane były na próbie określenia częstości występowania najbardziej rozpowszechnionych mutacji w genie CF. Analiza mutacji występujących w eksonie 11 oraz częściowo w eksonach 4, 7 i 21 (łącznie z delecją F508) pozwoliła na zidentyfikowanie około 65% mutacji odpowiedzialnych za defekt genu CF [B a 1, dane nieopublikowane].

IV-4. Mutacja a fonotyp

Spośród szeregu symptomów mukowiscydozy opisanych u pacjentów chorych, udało się ustalić jak dotąd jedynie korelację po między obecnością mutacji Δ F508 a niedoborem enzymów trzustkowych (*pancreatic insufficiency*) [53]. Dane populacyjne wykazują, że ponad 85% chorych wykazuje niedobór tych en-

zymów. Z reguły objawy te wiążą się z cięższym przebiegiem choroby, wcześniejszym ustaleniem rozpoznania, oraz wysokim poziomem chlorków w pocie. Prawie w 100% przypadków niedoborowi enzymów trzustkowych towarzyszy genotyp $\Delta F508/\Delta F508$. Niedobór taki obserwowany jest rzadziej, gdy w genie CF oprócz delecji F508 występuje inna mutacja i stwierdza się go jedynie u 40% chorych, u których zidentyfikowano inne niż $\Delta F508$ mutacje. U tych pacjentów z reguły obserwuje się także łagodniejszy przebieg choroby.

Stwierdzone u 5–10% chorych na mukowiscydozę *meconium ileus* (niedrożność smółkowa) wykazywano wyłącznie u osób o genotypie $\Delta F508/\Delta F508$ [53]. Interesujące wydają się być obserwacje, w których występowaniu łagodniejszych objawów płucnych choroby towarzyszy obecność mutacji typu *nonsense* [50, 54]. Jak dotąd nie wykazano korelacji pomiędzy innymi objawami klinicznymi mukowiscydozy a znanymi mutacjami.

V. Podsumowanie

Powszechnie uznawanym badaniem w diagnostyce mukowiscydozy jest test potowy. Stwierdzany u chorych podwyższony poziom chlorków w pocie koreluje niewątpliwie z obecnością choroby, nie jest to jednak test precyzyjny. Poziom chlorków jest uzależniony do wieku pacjenta przy czym podwyższone wartości występują również w innych schorzeniach [55]. Test potowy nie pozwala ponadto na ustalenie nosicielstwa zmutowanego genu.

Metodą diagnostyczną stosowaną w badaniu prenatalnym mukowiscydozy jest oznaczanie w płynie owodniowym aktywności enzymów jelitowych [56]. Wykazano bowiem korelację pomiędzy obciążeniem płodu mukowiscydozą a obniżeniem poziomu aktywności tych enzymów. Korelacja ta ma miejsce jednak tylko w określonym czasie ciąży (17–18 tydzień). Oznaczanie aktywności enzymów jelitowych, podobnie jak test potowy, nie pozwala na rozpoznanie heterozygoty, obciążone jest również około 5% błędem [57].

Wprowadzenie do diagnostyki mukowiscydozy analizy polimorfizmu DNA (RFLP) umożliwiło zarówno post jak i wczesną (10 tydzień) prenatalną diagnostykę choroby [58, 59]. Po raz pierwszy powstała możliwość badania nosicielstwa genu. Niedogodnością metody jest konieczność objęcia badaniem najbliższej rodziny chorego. Analiza polimorfizmu DNA nie może też weryfikować rozpoznania, ponieważ określenie sposobu dziedziczenia uzależnione jest od wyników otrzymanych dla probanda (pierwszy zdiagnozowany chory w rodzinie).

Możliwość identyfikacji mutacji warunkujących chorobę rozwiązuje problem zarówno weryfikacji rozpoznania, jak i diagnostyki mukowiscydozy w populacjach o wysokiej częstości delecji F508 [34]. W populac-

jach tych możliwe jest również prowadzenie badań przesiewowych. W przypadku pozostałych populacji identyfikacja mutacji w genie CF wymaga w dalszym ciągu określania sposobu dziedziczenia się genu w określonej rodzinie ryzyka genetycznego.

Pewne nowe możliwości diagnostyczne łączy się z identyfikacją białka CFTR i wykazaniem, że efektem mutacji jest brak dojrzałego produktu genu. Możliwe, że w przyszłości ta koncepcja diagnostyczna będzie prostsza niż analiza DNA.

Leczenie mukowiscydozy w dalszym ciągu jest objawowe i polega na zapobieganiu i leczeniu infekcji, rehabilitacji oddechowej i uzupełnieniu niedoboru enzymów trzustkowych. Nie można natomiast wykluczyć, że mukowiscydoza będzie kolejnym modelem w terapii genowej.

Na zakończenie warto podkreślić, że w wielu ośrodkach prowadzone są badania zmierzające do wyjaśnienia wysokiej częstości zmutowanego genu CF w populacji europejskiej. Jak do tej pory żadna z proponowanych teorii próbujących wyjaśnić naturę przewagi heterozygot nie znalazła potwierdzenia [3, 60, 61].

Artykuł otrzymano 27 sierpnia 1991 r.

Zaakceptowano do druku 26 września 1991 r.

* * *

Podziękowanie

Chciałbym podziękować doc. dr hab. med. T. Mazurczakowi i dr P. Cegłowskiemu za cenne rady i wskazówki udzielone w trakcie pisania tej pracy.

Piśmiennictwo

1. Rommens L.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J.R., Tsui L.-C., Collins F.S., (1989), *Science*, **245**: 1059-1065.
2. Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelchak Z., Zieliński J., Lok S., Plavšić N., Chou J.-L., Drumm M.L., Iannuzzi M.C., Collins F.S., Tsui L.-C., (1989), *Science*, **245**: 1066-1073.
3. Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.-C., (1989), *Science*, **245**: 1073-1080.
4. Knowlton R.G., Cohen-Haguenaue O., Vang Vong N., Frezal J., Brown V.A., Brauman J.C., Schuman J.W., Tsui L.-C., Buchwald M., Donis-Keller H., (1985), *Nature*, **318**: 380-382.
5. White R., Woodward S., Leppert M., O'Connell P., Hoff M., Herbs J., Lalouel J.-M., Dean M., Vande Woude G., (1985), *Nature*, **318**: 382-384.
6. Wainwright B.J., Scambler P.J., Schmidtke J., Watson E.A., Law H.-Y., Farrall M., Cooke H.J., Eiberg H., Williamson R., (1985), *Nature*, **318**: 384-385.
7. Anand R., Ogilvie D.J., Butler O.R., Riley J.H., Finnier R.S., Powell S.J., Smith J.C., Markham A.F., (1991), *Genomics*, **9**: 124-130.
8. Drumm M.L., Pope H.A., Cliff W.H., Rommens J.M., Marvin S.A., Tsui L.-C., Collins F.C., Fizzell R.A., Wilson J.M., (1990), *Cell*, **62**: 1227-1233.

9. Rich D.P., Anderson M.P., Gregory R.J., Cheng S.H., Paul S., Jefferson D.M., McCann J.D., Klinger K.W., Smith A.E., Welsh M.J., (1990), *Nature*, **347**: 358-363.
10. Orkin S.H., (1986), *Science*, **245**: 1959-1065.
11. Orkin S.H., (1989), *Annu Rev Immunol*, **7**: 277-307.
12. Monaco A.P., Kunkiel L.M., (1988), *Adv Hum Genet*, **17**: 61-98.
13. Mandel J.L., (1989), *Nature*, **22**: 584-586.
14. Collins F.S., O'Connell P., Pondre B.A.J., Seizinger B.R., (1989), *Trends Genet*, **5**: 217-221.
15. Gusella J.F., (1989), *FASEB J*, **3**: 2036-2041.
16. Zieliński J., Rozmahel R., Bozon D., Kerem B., Grzelak Z., Riordan J.R., Rommens J., Tsui L.-C., (1991), *Genomics*, **10**: 214-228.
17. Gasparini P., Nunes V., Savoia A., Dognini M., Morral N., Gaona A., Bonizzato A., Chillon M., Sangiuolo F., Novelli G., Dallapiccola B., Pignatti P.F., Estevill X., (1991), *Genomics*, **10**: 193-200.
18. Chehab F.F., Johnson J., Louise E., Goossens M., Kawasaki E., Erlich H., (1991), *Am J Hum Genet*, **48**: 223-226.
19. Chu C.-S., Trapnell B.C., Murtagh J.J.Jr., Moss J., Dalemans W., Jallat S., Mercienier A., Pavirani A., Lecocq J.-P., Cutting G.R., Guggino M., Crystal R.G., (1991), *EMBO J*, **10**: 1355-1363.
20. Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F., (1990), *Nature*, **346**: 362-365.
21. Blight M.A., Holland I.B., (1990), *Molec Microbiol*, **4** (6): 873-880.
22. Cheng S.H., Gregory R.J., Marshall J., Paul S., Souza D.W., White G.A., O'Riordan C.R., Smith A.E., (1990), *Cell*, **63**: 827-834.
23. Gregory R.J., Cheng S.H., Rich D.P., Marshall J., Paul S., Hahir K., Ostedgaard L., Klinger K.W., Welsh M.J., Smith A.E., (1990), *Nature*, **347**: 382-386.
24. Anderson M.P., Rich D.P., Gregory J., Smith A.E., Welsh M.J., (1991), *Science*, **251**: 679-682.
25. Kartner N., Hanrahan J.W., Jensen T.J., Naismith A.L., Sun S., Ackerley C.A., Reyes E.F., Tsui L.-P., Rommens J.M., Bear C.E., Riordan J.R., (1991), *Cell*, **64**: 681-691.
26. Barasch J., Kiss B., Prince A., Saiman L., Gruenert D., Al-Alwqati O., (1991), *Nature*, **352**: 70-73.
27. Tata F., Stainer P., Wicking C., Halford S., Kruyer H., Lench N.J., Scambler P.J., Hansen C., Braman J.C., Williamson R., Wainwright B.J., (1991), *Genomics*, **10**: 301-307.
28. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N., (1985), *Science*, **230**: 1350-1354.
29. Wagner M., Schloesser M., Reiss J., (1990), *Mol Biol Med*, **7**: 359-364.
30. Fridman K.J., Highsmith W.E.Jr., Prior T.W., Perry T.R., Silverman L.M., (1990), *Clin Chem*, **36**: 695-696.
31. Sorscher E.J., Huang Z., (1991), *Lancet*, **337**: 1115-1118.
32. Kerem B.-S., Zieliński J., Markiewicz D., Bozon D., Gazit E., Yahav J., Kennedy D., Riordan J.R., Collins F.S., Rommens J.M., Tsui L.-C., (1990), *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 8447-8451.
33. Zieliński J., Bozon D., Kerem B., Markiewicz D., Durie P., Rommens J.M., Tsui L.-P., (1991), *Genomics*, **10**: 229-235.
34. Dean M., White M.B., Amos J., Gerrard B., Stewart C., Khaw K.-T., Leppert M., (1990), *Cell*, **61**: 863-870.
35. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Seliya T., (1989), *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 2766-2770.
36. European Working Group on CF Genetics (1990) *Hum Genet*, **85**: 391-44.
37. The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (1990) *Am J Hum Genet*, **47**: 354-359.
38. Beaudet A.L., Feldman G.L., Fernbach S.D., Buffone G.J., O'Brien W.E., (1989), *Am J Hum Genet*, **44**: 319-322.
39. Estevill X., Scambler P.J., Wainwright B.J., Hawley K., Frederick P., Schwartz M., Baiget M., Kere J., Williamson R., Farrall M., (1987), *Genomics*, **1**: 257-263.
40. Estevill X., Farrall M., Williamson R., Ferrari M., Seia M., Guinta A.M., Novelli G., Potenza L., Dallapiccola B., Borgo G., Gasparini P., Pignatti P.F., De Benedetti L., Vitale E., Devoto M., Romeo G., (1988), *Am J Hum Genet*, **43**: 23.
41. Kerem B.S., Buchanan J.A., Durie P., Corey M., Levinson H., Buchwald M., Tsui L.-P., (1989), *Am J Hum Genet*, **44**: 827-834.
42. Vidaud M., Fanen P., Martin J., Ghanem N., Nicolas S., Goossens M., (1990), *Hum Genet*, **85**: 446-449.
43. Osborne L., Knight R., Santis G., Hodson M., (1991), *Am J Hum Genet*, **48**: 608-612.
44. Cutting G.R., Kasch L.M., Rosenstein B.J., Zieliński J., Tsui L.-C., Antonarakis S.E., Kazazian H.H.Jr., (1990), *Nature*, **346**: 366-369.
45. White M.B., Krueger L.J., Holsclaw D.S.Jr., Gerard B.C., Stewart C., Quittell L., Dolganov G., Baranov V., Ivaschenko T., Kapronov N.I., Sebastiano G., Castiglione O., Dean M., (1991), *Genomics*, **10**: 266-269.
46. White M., Amos J., Hsu J.M.-C., Gerrard B., Finn P., Dean M., (1990), *Nature*, **244**: 665-667.
47. Nelson P.V., Carey W.F., Morris C.P., (1991), *Hum Genet*, **86**: 391-393.
48. Iannuzzi M.C., Stern R.C., Collins F.S., Hon C.T., Hidaka N., Strong T., Becker L., Drumm M.L., White M.B., Gerrard B., Dean M., (1991), *Am J Hum Genet*, **48**: 227-231.
49. Cutting G., Kasch L.M., Rosenstein B.J., Tsui L.-C., Kazazian H.H.Jr., Antonarakis S.E., (1990), *N Engl J Med*, **323**: 1685-1688.
50. Guillermit H., Fanen P., Ferec C., (1990), *Hum Genet*, **85**: 450-453.
51. Reiss J., Cooper D.N., Bal J., Slomski R., Cutting G.R., Krawczak M., (1991), *Hum Genet* (w druku).
52. Bal J., Maciejko D., Mazurczak T., Potocka A., Krawczak M., Reiss J., (1991), *Hum Genet*, **86**: 329.
53. Kerem E., Corey M., Kerem B.-S., Rommens J., Markiewicz D., Levison H., Tsui L.-C., Durie P., (1990), *N Engl J Med*, **323**: 1517-1522.
54. Bal J., Stuhmann M., Schloesser M., Schmidtke J., Reiss J., (1991), *J Mol Genet* (w druku).
55. Boat T.F., Welsh M.J., Beaudet A.L., (1989), Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle (red.). *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw Hill Publishers, New York, str. 2649-2678.
56. Boue A., Muller F., Nezelof C., Dury J.F., Duchatel F., Dumez Y., Aubry M.C., Boue J., (1986), *Hum Genet*, **74**: 288-297.
57. Aitken D.A., Beaudet A., Boue A., Brock D.J.H., Carey W.F., Kleijer W., Papp Z., Petersen L., Potier M., Schwartz M., Wauters J., (1987), Vogel F., Sperling K., (red.). *Workshop on the prenatal diagnosis of cystic fibrosis*. Springer Berlin, Heidelberg, New York str. 631-633.
58. Spence J.E., Buffone G.J., Rosenbloom C.L., Fernbach S.D., Curry M.R., Carpanter R.J., Ledbetter D.H., O'Brien W.E., Beaudet A.L., (1987), *Hum Genet*, **76**: 5-10.
59. Schwartz M., Super M., Schmidtke J., Buys C., Halley D.G., Krawczak M., Poncin J.E., Loukopoulos D., Devoto M., (1988), *Prenatal Diag*, **8**: 619-624.
60. Jorde L.B., Lathrop G.M., (1988), *Am J Hum Genet*, **42**: 808-815.
61. Romeo G., Devoto M., Galietta L.J.V. (1989), *Hum Genet*, **84**: 1-5.

Syntetyczne immunomodulatory wzorowane na naturalnych produktach mikroorganizmów

Synthetic immunomodulators designed on the basis of naturally occurring microbial products

PIOTR ROMANOWSKI*¹
KRYSTYNA DZIERZBICKA**²
ANDRZEJ MYŚLIWSKI*³
ALEKSANDER M. KOŁODZIEJCZYK**⁴

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Immunostymulatory
 - II-1. Muramylopeptydy i desmuramylopeptydy
 - II-2. Dimykolan trehalozy
 - II-3. Lipopeptydy
 - II-4. Lipid A
 - II-5. β -Glukany i lentinan
 - II-6. Bestatyna
- III. Immunosupresory
 - III-1. Cyklosporyna A
 - III-2. FK506 i rapamycyna
- IV. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Immunostimulators
 - II-1. Muramyl peptides and desmuramyl peptides
 - II-2. Trehalose dimycolate
 - II-3. Lipopeptides
 - II-4. Lipid A
 - II-5. β -Glucans and lentinan
 - II-6. Bestatin
- III. Immunosuppressors
 - III-1. Cyclosporin A
 - III-2. FK506 and rapamycin
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AZT — 3-azydo-3'-deoksytymina; BSA — albumina surowicy bydłej (*bovine serum albumin*); ConA — konkanawalina A; Cs-A — cyklosporyna A; CSA — aktywność stymulująca wzrost kolonii (*colony stimulating activity*); DAG — diacyloglicerol; DNP — dinitrofenol; DTH — reakcja nadwrażliwości typu późnego (*delayed type hypersensitivity*); FCA — kompletny adjuwant

Freunda (*Freund's complete adjuvant*); FKBP — białko wiążące FK506; FLV — wirus białaczki Frienda (*Friend Leukemia Virus*); G-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (*granulocyte colony stimulating factor*); GM-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów i makrofagów (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*); IFN γ — interferon γ ; IgM — immunoglobulina klasy M; IL1 — interleukina 1; IL2 — interleukina 2; IL4 — interleukina 4; IL6 — interleukina 6; IP₃ — 1,4,5-trójfosforan inozytolu; LAK — komórki „zabójcze” aktywowane przez limfokiny (*lymphokine-activated killer*); LDL — lipoproteina o niskiej gęstości (*low density lipoprotein*); LPS — lipopolisacharyd; M-CSF — czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (*macrophage-colony stimulating factor*); MDP — muramylo-dipeptyd (*N-acetylo-muramilo-L-alanylo-D-izoglutamina*); MDP-GDP — 1-0-(N-acetylo-muramilo-L-alanylo-D-izoglutamilo)-2,3-0-dipalmitoilo-glicerol; MLR — mieszana reakcja limfocytów (*mixed lymphocyte reaction*); MTP-PE — N-acetylo-muramilo-L-alanylo-D-izoglutamilo-L-alanylo-fosfatydyloetanoloamina; NK — naturalne komórki „zabójcze” (*natural killer*); PAF — czynnik aktywujący płytki (*platelet activating factor*); Pam3Cys — N-palmitoilo-S-[2,3-bis(palmitoiloalksy)(2RS)-propylo]-L-cysteina; PGE₂ — prostaglandyna E₂; PHA — fitohemaglutynina; PMA — octan mirystoilo-forbolu (*phorbol myristate acetate*); RIA — test radioimmunologiczny (*radioimmune assay*); TDM — dimykolan trehalozy (*trehalose dimycolate*); TNF α — czynnik martwiczy guza α (*tumor necrosis factor α*); 5-HT — serotonina (5-hydroksytryptamina).

I. Wstęp

Ewolucja układu immunologicznego przebiegająca w ciągłej konfrontacji ze światem mikroorganizmów doprowadziła do wykształcenia silnych reakcji odpornościowych na charakterystyczne dla drobnoustrojów elementy strukturalne. Stąd też nie jest zaskakującym fakt, iż właśnie mikroorganizmy, a w szczególności ich ściany komórkowe, stanowią bogate źródło struktur stymulujących układ immunologiczny, takich jak mu-

¹ student IV roku, ² mgr inż., ³ prof. dr hab. med., ⁴ doc. dr hab. inż.,

* Katedra i Zakład Histologii, Akademia Medyczna w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk

** Zakład Chemii Organicznej, Instytut Chemii i Technologii Organicznej oraz Żywnościowej, ul. Majakowskiego 11/12, 80-952 Gdańsk

ramylopeptydy, diestry, trehalozy, lipopeptydy, lipid A i glukany. „Oferta” świata mikroorganizmów nie ogranicza się tylko do immunostymulatorów. Mikroskopijnej wielkości grzyby są źródłem cyklosporyny A, obecnie podstawowego leku immunosupresyjnego stosowanego w transplantologii, oraz jej przypuszczalnego następcy FK506.

Mimo, iż obecnie dysponujemy wielu syntetycznymi substancjami modyfikującymi odpowiedź immunologiczną (np. lewamisol, azimekson, cyklofosamid) nadal, ze zrozumiałych względów, w centrum zainteresowania znajdują się preparaty naturalne i ich analogi. Obfitość wzorców dostarczanych przez organizmy żywe najprawdopodobniej jeszcze na długi czas ukierunkuje rozwój immunofarmakologii raczej na kopiowanie natury z drobnymi „retuszami” niż poszukiwanie dróg na własną rękę.

Modyfikowanie reaktywności układu odpornościowego, czyli immunomodulacja może mieć dwojaki kierunek — prowadzić do immunosupresji, czyli zahamowania reaktywności układu immunologicznego, lub do immunostymulacji czyli wzmagania odczynowości immunologicznej.

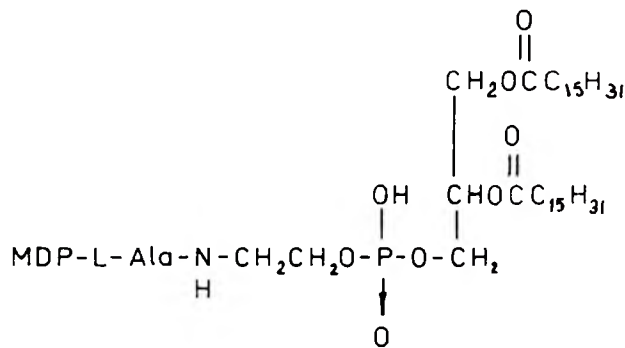
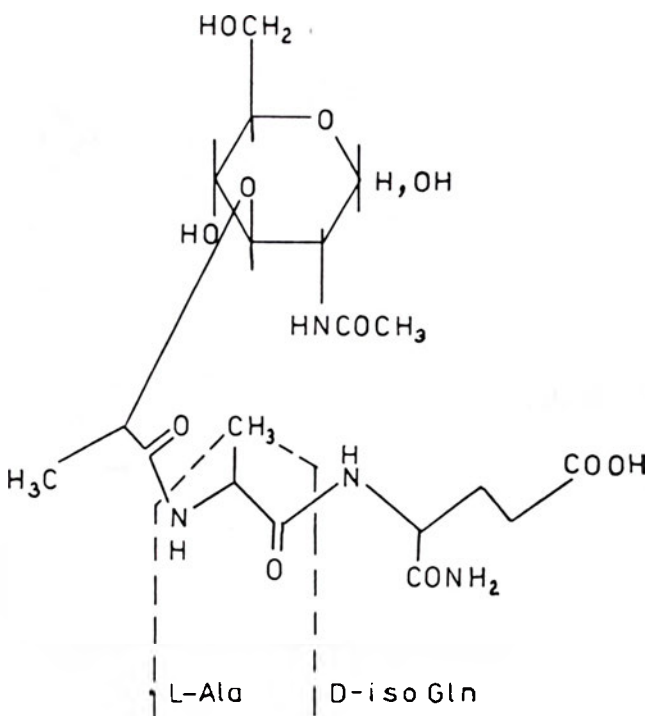
W niniejszym artykule poświęcono uwagę nowym immunomodulatorom, próbom wyjaśnienia mechanizmu ich działania oraz zastosowania klinicznego.

II. Immunostymulatory

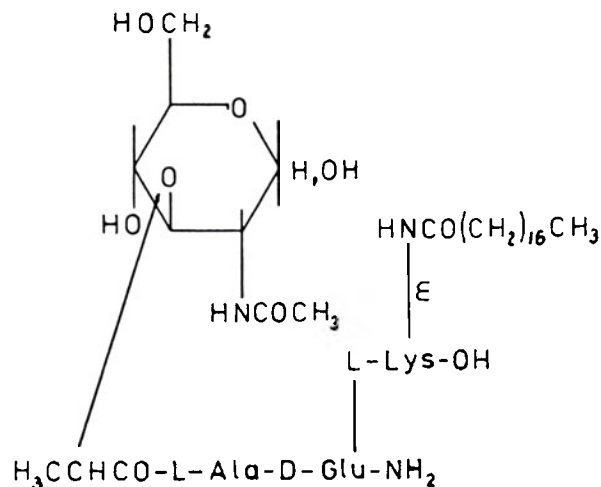
II-1. Muramylopeptydy i desmuramylopeptydy

Historia odkrycia, właściwości adjuwantowe i immunomodulatorowe muramylopeptydów zostały wy-

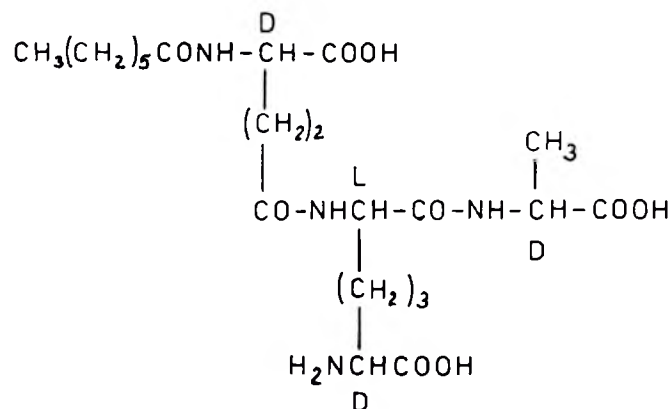
Wzór I. Muramylo-dipeptyd (MDP).



Wzór II. MDP-L-alanylo-fosfatydyloctanoloamina (MTP-PE).



Wzór III. Muroktazyna (MDP-Lys-L18).



Wzór IV. D-laktylo-L-alanylo- γ -D-glutamyl-(L)-mezo- α , ϵ -diaminopimelilo-L-glicyna (FK-156).

czepująco opisane w pracy A. A. Kołodziejczyk ó w [1]. Najprostszym związkiem należącym do tej grupy jest muramylo-dipeptyd — MPD(I).

Spośród kilkuset pochodnych MDP otrzymanych syntetycznie 8 zasługuje na szczególną uwagę ze względu na swoje właściwości biologiczne i potencjalne zastosowanie kliniczne [2].

Badania nad zależnością aktywności biologicznej muramylopeptydów od ich struktury chemicznej [3] wykazały, że modyfikacje chemiczne tak pierścienia kwasu muraminowego, jak i łańcucha bocznego znacz-

Tabela 1
Struktura chemiczna i właściwości ważniejszych pochodnych MDP

Pochodna	Struktura chemiczna	Właściwości biologiczne
pochodne hydrofilne		
MDP (I) murabutyd (Murabutide)	N-acetylo-muramylo-L-alanylo- -D-izoglutamina ester n-butylowy-N-acetylo-muramylo-L- -alanylo-D-glutaminy	adjuwant o sile równej FCA pirogenny, somnogenny równie skuteczny adjuwant, niepirogenny [29], testowany jako składnik szczepionek
pochodne lipofilne		
B30-MDP	6-0-(2-tetradecyloheksadekanoilo)-MDP	aktywny adjuwantowo, pirogenność niższa od MDP testowany jako składnik szczepionek, aktywność przeciwnowotworowa
MTP-PE (II)	MDP-L-alanylo-fosfatydyloctanoilamina	silnie aktywuje makrofagi, aktywność przeciwnowotworowa i przeciwwirusowa, testowany klinicznie w immunoterapii nowotworów [33]
MDP-GDP	1-0-MDP-2,3-0-dipalmitoilo-glicerol	zwiększa aktywność przeciwnowotworową makrofagów, indukuje CSA <i>in vivo</i>
muroctazyna (Muroctasin) (III)	MDP-Lys-L18	stymuluje odporność niespecyficzną, indukuje produkcję M-CSF, testowany laboratoryjnie jako składnik szczepionek oraz klinicznie w celu skrócenia okresu leukopenii po chemioterapii
desmuramylopeptydy		
FK-156 (IV)	D-laktylo-L-alanylo- γ -D-glutamyl-(L)- -mezo-2,6-diaminopimelilo-(L)-glicyna	wyizolowany z przesączu hodowli Streptomyces olivaceogriseus, stymuluje odporność na infekcje i aktywność przeciwnowotworową makrofagów zwiększa produkcję IL1
FK-565	N-heptanoilo- γ -D-glutamyl-(L)-mezo-2,6- diaminopimelilo-(L)-D-alanina	syntetyczna pochodna FK156 o silniejszym działaniu immunostymulacyjnym, zwiększa aktywność przeciwnowotworową makrofagów [41], sekrecję TNF- α , IL1, aktywność komórek NK

nie zmieniają właściwości adjuwantowe pochodnych MDP. W łańcuchu bocznym podstawowe znaczenie ma zachowanie konfiguracji L pierwszego aminokwasu (choć grupa metylowa alaniny może być zastąpiona etylową bądź izopropylową) oraz konfiguracji D reszty glutaminy. Duży wpływ na zmianę aktywności ma amidacja lub estryfikacja grupy karboksylowej glutaminy. W pierścieniu cukrowym zasadnicze znaczenie dla aktywności biologicznej ma grupa acyloamidowa przy C2. Dane na temat znaczenia pierścienia piranozowego komplikuje fakt wyizolowania i syntezy aktywnych biologicznie pochodnych pozbawionych kwasu muraminowego, czyli desmuramylopeptydów (np.: FK156, FK565) [4]. Problem zależności struktury i funkcji muramylopeptydów został przedstawiony w pracy A. A. Kołodziejczyk ó w [1].

Głównymi komórkami docelowymi MDP są makrofagi i limfocyty B. Opisano jednak także immunomodulacyjny wpływ MDP i jego pochodnych na komórki NK [5] oraz neutrofile [6, 7]. MDP stymuluje chemotaksję, aktywność fagocytarną i przeciwno-

wotworową makrofagów [8], wydzielanie IL1 [9], IL6 [10, 11], IFN γ [12], PAF, GM-CSF [13], G-CSF, PGE $_2$ i kolagenazy. MDP zwiększa również produkcję TNF- α w odpowiedzi na stymulację LPS *in vivo*, chociaż sam nie indukuje ani syntezy, ani sekrecji tej cytokiny (ostatnio Chedid i współautorzy zaobserwowali słabą indukcję TNF- α przez MDP-GDP) [14].

Próby wywołania wielu z podanych efektów *in vivo* napotkały na trudności związane z bardzo szybką eliminacją MDP. Użycie liposomów, tworzonych przez zamykanie MDP w małe pęcherzyki otoczone podwójną błoną fosfolipidową, pozwalające na wprowadzenie zawartych w nich substancji bezpośrednio do wnętrza komórki, znacznie zmniejsza szybkość usuwania MDP z organizmu, pozwalając jednocześnie na 500- do 1000-krotne obniżenie dawek. Dodatkowo, liposomy umożliwiają bardziej wybiórcze dostarczanie MDP do makrofagów. Należy zaznaczyć, iż same liposomy także posiadają właściwości immunomodulacyjne [15]. Z innych sposobów zwiększania powinow-

wactwa MDP do makrofagów należy wymienić zwiększenie lipofilności MDP, związanie MDP z mannozylo-BSA [16], mannozylo-poli-L lizyną [17], acetylo-LDL [18] oraz użycie przeciwciał monoklonalnych przeciw MDP wiązanych przez występujące na makrofagach receptory dla fragmentu Fc immunoglobulin G.

Wysoka aktywność MDP podawanego w liposomach, jak również wzmocnienie efektów MDP przez związki stymulujące fagocytozę wskazuje na wewnątrzkomórkową lokalizację receptorów MDP [19]. Istnieją jednak dane o występowaniu miejsc receptorowych również na błonie komórkowej [20].

Mimo, iż pierwotnie przypisywano działanie adjuwantowe MDP jego zdolności do uwalniania IL1, szereg prac wskazuje na aktywację limfocytów B przez muramylopeptydy na drodze niezależnej od makrofagów [21]. MDP wzmacnia proliferację limfocytów B stymulowanych przeciwciałami anti-IgM [21], jak również wzmacnia produkcję przeciwciał przez limfocyty B pod wpływem IL2 [22]. MDP działa również synergistycznie z IL4 na proliferację preaktywowanych limfocytów B [22]. Brak efektów oddziaływania MDP na spoczynkowe limfocyty B oraz konieczność długiego czasu inkubacji przy stymulowaniu preaktywowanych limfocytów B wskazuje, że receptory MDP pojawiają się na powierzchni limfocytów B dopiero w pewnej fazie cyklu komórkowego [21]. Ten i współautorzy opisali ostatnio obecność miejsc wiążących jodowaną pochodną ^{125}I -MDP na powierzchni aktywowanych, ale nie spoczynkowych limfocytów B [23]. Nie wyklucza to jednak możliwości aktywacji limfocytów B przez MDP również na drodze pośredniej przez stymulację syntezy cytokin [12].

Molekularny mechanizm działania MDP nie jest znany. Dotychczas opublikowane prace wskazują na brak wpływu MDP na wewnątrzkomórkowe stężenie Ca^{+2} czy aktywność kinazy proteinowej C [24]. Niewykluczone, iż poszczególne pochodne działają za pośrednictwem różnych systemów przekazywania, gdyż na przykład MTP-PE w odróżnieniu od MDP stymuluje kinazę proteinową C. Ostatnio stwierdzono, że działanie MDP na limfocyty B jest hamowane przez toksynę krztuśca. Wskazuje to na rolę białka G wrażliwego na tę toksynę w odpowiedzi komórki na MDP [25].

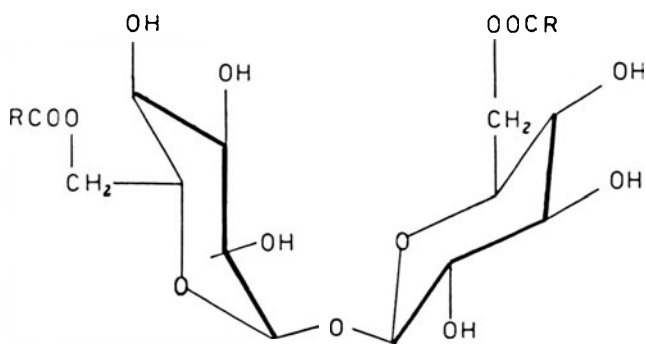
MDP podany pozajelitowo wywiera szereg efektów ubocznych. Właściwości pirogenne MDP wynikają prawdopodobnie ze stymulacji syntezy IL1. Podanie MDP powoduje leukocytozę, przejściowy wzrost stężenia kortyzolu w surowicy krwi, nacieczenie zapalne ścian naczyń i wzrost ich przepuszczalności, jak również wzrost syntezy białek ostrej fazy przez wątrobę. W wysokich dawkach MDP wykazuje działanie immunosupresyjne, przypuszczalnie w wyniku hamowania syntezy IL2. MDP wywiera również działanie somnogenne [27]. Tu warto wspomnieć o obserwowanych powiązaniach efektów działania MDP z ukła-

dem serotonergicznym. MDP wykazuje powinowactwo do receptorów dla serotoniny (5-HT), serotonina zaś hamuje wiązanie MDP do makrofagów oraz wywiera w pewnych modelach doświadczalnych efekty zbliżone do MDP. Również antagoniści receptorów 5-HT hamują działanie MDP na makrofagi. Jeszcze bardziej komplikują problem dane wskazujące na obecność u człowieka, królika i szczura endogennych substancji o budowie muramylopeptydów mających działanie pirogenne i somnogenne [28]. Większość efektów ubocznych muramylopeptydów daje się odzielić od aktywności adjuwantowej, na co wskazują niepirogenne i niesomnogenne pochodne o silnych właściwościach immunostymulacyjnych, jak np. murabutyd [29].

Niektóre pochodne MDP znajdują się już w trakcie badań klinicznych. Szczepionki przeciw *Streptococcus pyogenes* i *Clostridium tetani* zawierające murabutyd efektywnie indukują powstawanie przeciwciał swoitych u ludzi. Zachęcające rezultaty dały również przeprowadzone na grupie ochotniczek próby ze szczepionką antykoncepcyjną. Szczepionka ta zawiera fragment łańcucha β gonadotropiny kosmówkowej związanej z anatoksyną krztuśca w emulsji zawierającej nor-MDP jako adjuwant [30]. Szereg dalszych szczepionek, między innymi przeciw: *Plasmodium falciparum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella enteritidis*, wirusom *Epsteina-Barr*, wirusowego zapalenia wątroby typu B, opryszczki znajduje się w trakcie prób laboratoryjnych [26]. MDP podawany w postaci wolnej lub w liposomach stymuluje również niespecyficzną odporność organizmu na infekcję, nawet w stanach immunosupresji (np. po radio lub chemioterapii) [31].

MTP-PE zamknięty w liposomach okazał się pochodną o szczególnie silnych właściwościach przeciwnowotworowych, skutecznie wydłużającą średni czas przeżycia [32] oraz zapobiegającą przerzutom w doświadczeniach na zwierzętach, jak również zwiększającą aktywność przeciwnowotworową ludzkich makrofagów *in vivo*. Ostatnio opublikowano wyniki badań klinicznych pierwszej fazy, z użyciem MTP-PE zamkniętego w liposomach, na pacjentach z zaawansowaną chorobą nowotworową, oporną na klasyczną terapię [33, 34]. Mimo, że nie uzyskano znamiennych efektów terapeutycznych, MTP-PE (1-2 * 0.01-12 mg/m² tygodniowo) był dobrze tolerowany i powodował podwyższenie aktywności przeciwnowotworowej makrofagów *in vivo*.

Duże nadzieje wiąże się z szansą wykorzystania desmuramylopeptydu FK565 w terapii AIDS. Yorkota i współautorzy opublikowali intrygujące dane o hamującym wpływie FK565 na infekcję retrowirusem FLV u myszy [35]. Co więcej, zaobserwowano synergistyczne działanie FK565 z AZT, obecnie głównym lekiem w terapii AIDS, pozwalające na 15-krotne obniżenie dawki tego ostatniego. Ze względu na znaczną mielotoksyczność AZT, wyniki te budzą



Wzór V. 6,6'-dimykolan- α,α' -D-trehalozy (TDM).

nadzieje na możliwość ograniczenia tych efektów ubocznych przez łączne stosowanie FK565 i niskich dawek AZT.

Działanie immunosupresyjne dużych dawek MDP z powodzeniem wykorzystano w celu zapobieżenia cukrzycy z autoagresji indukowanej niskimi dawkami streptozocyny [36].

II-2. Dymikolan trehalozy

Diestry trehalozy stanowią kolejny składnik ściany komórkowej *Mycobacterium* posiadający właściwości immunomodulacyjne. Najlepiej poznanym związkiem z tej grupy jest 6,6'-dimykolan- α,α' -D-trehalozy (TDM) (V), wyizolowany w 1956 roku z frakcji lipidowej ściany *Mycobacterium tuberculosis*, będący identycznym czynnikiem wiążkowym odpowiedzialnym za wiążkowy wzrost zjadliwych szczepów tego gatunku.

Należy zaznaczyć, iż naturalny dimykolan trehalozy mykobakterii, podobnie jak analogiczne substancje *Corynebacterium* czy *Nocardia* nie jest jednorodną chemicznie substancją, lecz mieszaniną glikolipidów o zbliżonej budowie [37]. Decydujące znaczenie dla aktywności biologicznej ma konfiguracja reszty cukrowej — właściwości adjuwantowe posiadają jedynie D-stereoizomery. Pochodne zestryfikowane kwasami mykolinowymi (α -rozgałęzionymi β -hydroksykwasami) mają silniejsze właściwości immunostymulacyjne od estrów nierozgałęzionych kwasów tłuszczowych [37].

Obserwowane efekty działania TDM są prawdopodobnie wynikiem aktywacji makrofagów [37], jakkolwiek niektóre prace wskazują również na limfocyty T jako komórki docelowe w działaniu tego adjuwantu. *In vitro*, dimykolan trehalozy zwiększa aktywność przeciwnowotworową makrofagów, sekrecję PAF, PGE₂, jak również wzmacnia wydzielanie wolnych rodników tlenowych w odpowiedzi na PMA [37].

In vivo, TDM podwyższa niespecyficzną odporność organizmu na infekcje bakteryjne, wirusowe i pasożytnicze [38]. TDM posiada również właściwości adjuwantowe, często synergistyczne z muramylopeptydami. Wykorzystano je między innymi w szczepionce dla bydła przeciw *Brucella abortus*. Jako adjuwant użyta została mieszanina TDM i pochodnej MDP.

Doguzowe lub dożylnie podanie dimykolanu trehalozy korzystnie razem z MDP lub jej pochodnymi powodowało regresję guzów nowotworowych a nawet wytworzenie specyficznej odporności przeciwnowotworowej organizmu [1, 37].

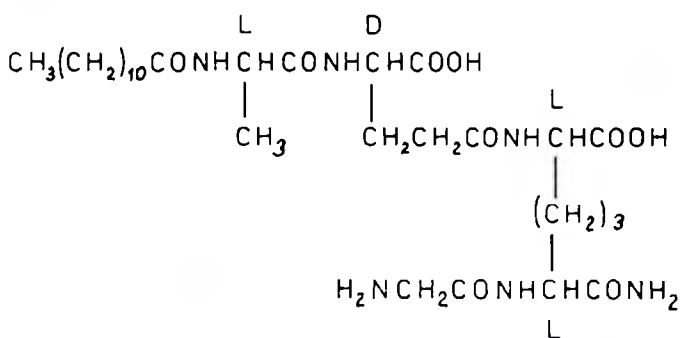
Molekularny mechanizm działania TDM nie jest znany. Uzyskane dane doświadczalne wiążą go ze zdolnością TDM do hamowania fosforylacji oksydacyjnej lub z faktem jego dużej aktywności powierzchniowej. Mimo, iż czynnik wiążkowy zyskał nazwę „toksycznego lipidu”, toksyczność dimykolanu trehalozy wydaje się być raczej związana z podawaniem go w postaci emulsji w oleju mineralnym niż z samym TDM *per se*. Użyta w próbach klinicznych wodna zawiesina TDM była dobrze tolerowana i nie zaobserwowano poważniejszych reakcji ubocznych [39].

Spśród syntetycznych diestrów trehalozy na uwagę zasługuje pochodna C76, o właściwościach adjuwantowych i przeciwnowotworowych porównywalnych z naturalnym dimykolaniem trehalozy [37].

II-3. Lipopeptydy

Lipopeptydy, w odróżnieniu od MDP i jego pochodnych stanowią heterogenną grupę związków o różnym pochodzeniu, składzie i właściwościach biologicznych. Wyróżnia się trzy klasy lipopeptydów.

Lipopeptydy I są fragmentami peptydoglikanu ścian komórkowych bakterii, zawierającymi składnik lipidowy. Posiadają właściwości adjuwantowe, jednak w odróżnieniu od lipopeptydów III nie stymulują proliferacji limfocytów B. Ze względu na zdolność do wzmagania odporności przeciw infekcjom jeden z lipopeptydów I, *Pimelautide*, jest obecnie poddawany próbom klinicznym [40].



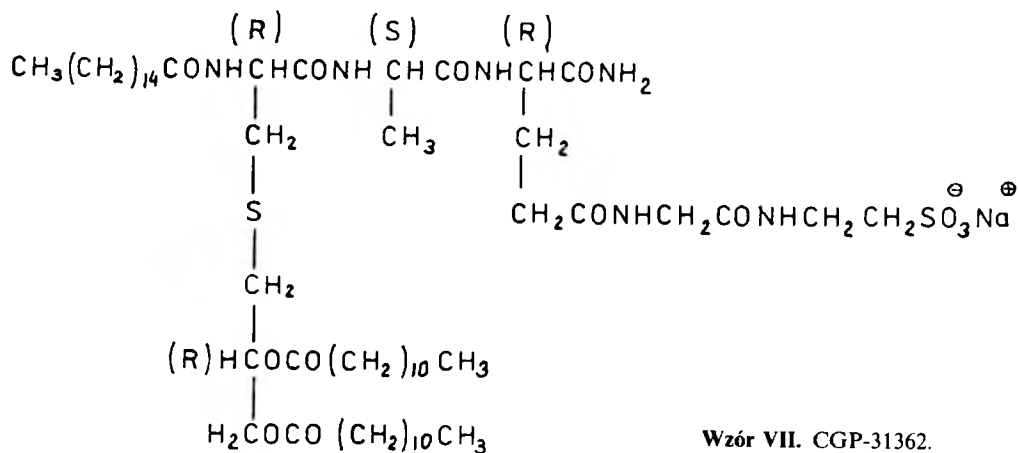
Wzór VI. *Pimelautide*.

Lipopeptydy II są składnikami ściany komórkowej niektórych bakterii. Wiele z nich ma aktywność antybiotyków. Nie stymulują układu odpornościowego [41], a więc nie są przedmiotem tego opracowania.

Lipopeptydy III to składniki lipoproteiny produkowanej przez *E. coli*. Stymulują one produkcję przeciwciał, proliferację limfocytów B, uwalnianie nadtlenków przez neutrofile [42], syntezę IL1, prostaglandyn oraz

zwiększają aktywność przeciwnowotworową makrofagów *in vitro*, a pochodne sprzężone z tauryną (np. CGP 31362 (VII)) także *in vivo* [43]. Badania nad aktywnością przeciwnowotworową CGP 31362 wykazały jego skuteczność w hamowaniu przerzutów w doświadczeniach *in vivo* [26].

syntezy IL1, większość opublikowanych badań nie pozostawia wątpliwości, iż lipid A jest fragmentem odpowiedzialnym za właściwości immunomodulacyjne i toksyczne [46]. Polisacharydowe składniki LPS mogą jednak modulować właściwości biologiczne lipidu A. Struktura chemiczna lipidu A poszczególnych



Wzór VII. CGP-31362.

Koniugaty pochodnych syntetycznych fragmentów lipoproteiny *E. coli* (Pam₃Cys-Ser i Pam₃Cys-Ala-Gly) z haptenem DNP okazały się skuteczne w stymulowaniu produkcji przeciwciał przeciw temu haptenu, bez użycia nośnika białkowego [44].

Dane na temat molekularnego mechanizmu działania lipopeptydów są bardzo skąpe. Wiadomo, że w limfocytach B lipopeptydy nie powodują wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP, cGMP, Ca²⁺, translokacji kinazy białkowej C z cytozolu na błonę komórkową ani hydrolizy fosfatydyloinozytoli [42]. Hamowanie mitogennego działania lipopeptydów na mysie limfocyty B przez toksynę cholery sugeruje udział białka G wrażliwego na tę toksynę w aktywności biologicznej lipopeptydów. Wyniki badań przeprowadzonych na ludzkich neutrofilach sugerują jednak udział zarówno białek G wrażliwych na toksynę cholery, jak i białek G wrażliwych na toksynę krztuśca [42].

II-4. Lipid A

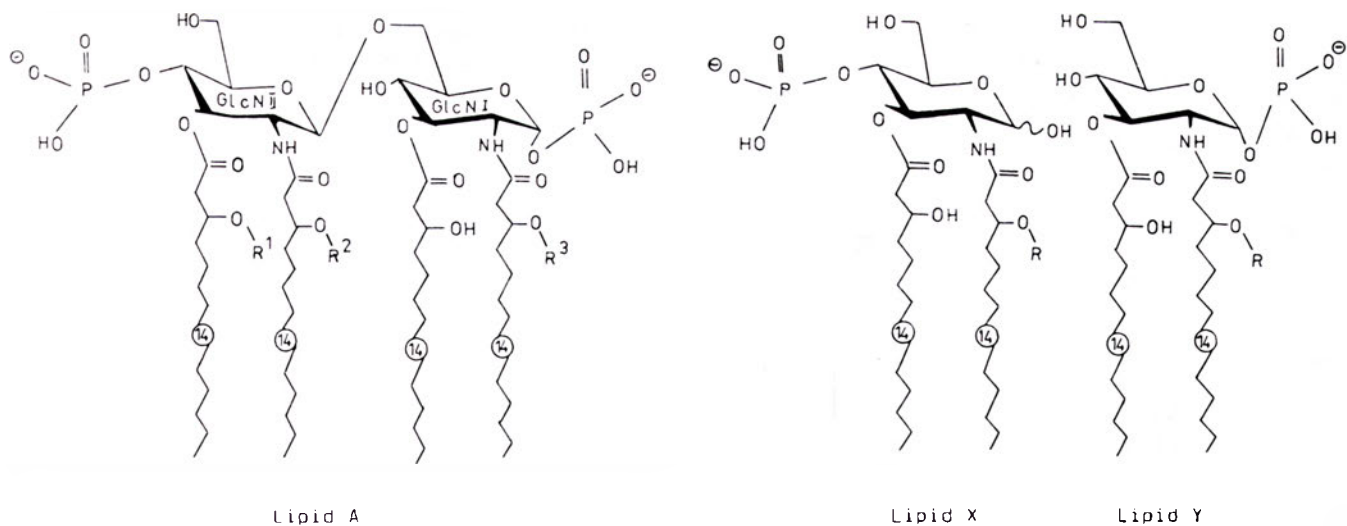
Lipopolisacharydy bakteryjne, stanowiące główny element strukturalny ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych posiadają złożone spektrum aktywności biologicznych: wykazują właściwości antygenowe, odpowiadają za aktywność adjuwantową bakterii Gram(-) oraz za groźne dla życia objawy posocznicy Gram(-) określane mianem wstrząsu endotoksycznego [45]. Na strukturę lipopolisacharydów składają się trzy elementy: O-specyficzny polisacharyd o dużej zmienności strukturalnej, odpowiadający za właściwości antygenowe LPS, polisacharyd rdzeniowy oraz lipid A.

Poza nielicznymi doniesieniami o zdolności izolowanych z LPS poli- i oligosacharydów do indukcji

drobnoustrojów wykazuje swoistość gatunkową. Co więcej, w przypadku niektórych bakterii, jak np. *Salmonella minnesota*, lipid A jest w rzeczywistości mieszaniną kilku związków o zbliżonej strukturze. Lipid A zbudowany jest z disacharydowego rdzenia powiązanego z pewną liczbą reszt acylowych. Strukturę lipidu A *E. coli* oraz ważniejszych syntetycznych i naturalnych pochodnych zilustrowano na rycinie 1.

Lipid A jest silnym mitogenem limfocytów B oraz zwiększa liczbę komórek produkujących przeciwciała. Pomimo, że lipid A nie indukuje proliferacji limfocytów T, obecność tych komórek jest niezbędna dla aktywności adjuwantowej LPS. Podobnie niezbędna jest obecność monocytów. Prawdopodobnym wyjaśnieniem opisanych powyżej obserwacji jest zdolność lipidu A do stymulowania sekrecji IL1 przez monocyty. Wzrost syntezy IL1 powoduje z kolei uwalnianie przez limfocyty T szeregu limfokin, a wśród nich czynników wzrostu i różnicowania limfocytów B. Poza syntezą IL1, lipid A stymuluje również aktywność fagocytarną i przeciwnowotworową makrofagów oraz sekrecję TNF-α [47]. Dane doświadczalne wskazują, że właśnie ta cytokina odpowiada w dużym stopniu za objawy wstrząsu endotoksycznego. Warto wspomnieć, że w mysie makrofagi linii C3H/HeJ, odpornej na toksyczne efekty podania LPS, nie syntetyzują TNF-α w odpowiedzi na endotoksynę [48]. LPS podwyższa również aktywność NK *in vivo*, prawdopodobnie za pośrednictwem interferonu.

Lipid X i lipid Y charakteryzują się bardzo zbliżonym do lipidu A spektrum aktywności *in vitro*; są one umiarkowanie silnymi mitogenami dla limfocytów B oraz aktywują makrofagi. Pochodne te nie mają jednak typowych dla lipidu A właściwości pirogennych *in vivo*. Jest to zgodne z obserwowanym *in vitro*



Lipid A

Lipid X

Lipid Y

Pochodna	Pochodzenie	Struktura chemiczna		
		R ₁	R ₂ R	R ₃
A				
Lipid A E. coli	naturalny składnik LPS E. coli	14:0	12:0	H
Prekursor Ia	disacharydowe intermediały syntezy lipidu A wyizolowane z mutantów Salmonella minnesota /109/	H	H	H
Prekursor Ib		H	H	16:0
B				
GLA-46	syntetyczne pochodne monosacharydowe /110/	H		
GLA-27		14:0		
C				
Lipid X	monosacharydy będące biosyntetycznymi prekursorami lipidu A izolowane z mutantu pgsB E. coli /111/	H		
Lipid Y		16:0		

Ryc. 1. Struktura chemiczna i pochodzenie podstawowych disacharydowych analogów lipidu A. 12:0 — reszta laurylowa, 14:0 — reszta mirystylova, 16:0 — reszta palmitylova

brakiem indukcji IL1 i TNF- α przez wspomniane pochodne [47]. Problem dodatkowo komplikują ostatnio opublikowane dane sugerujące, że wiele z immunomodulacyjnych właściwości lipidu X wynika z zanieczyszczeń śladowymi ilościami lipidu A [49].

Syntetyczna pochodna GLA-27 jest również pozbawiona właściwości pirogennych, stymuluje produkcję przeciwciał, proliferację limfocytów B, syntezę TNF- α *in vitro* oraz aktywuje makrofagi [50]. Deoksy-analog GLA-27, określane symbolem GLA-40 wykazuje silniejsze od substancji macierzystej właściwości mitogenne wobec limfocytów B oraz znacznie słabszy wpływ aktywujący na makrofagi. Interesującymi właściwościami biologicznymi charakteryzują się koniugaty pochodnych z serii GLA z MDP (GMD-323 do 328). GMD-324 i GMD-326 przewyższały substan-

cje macierzyste pod względem stymulacji sekrecji IL1 i aktywności przeciwnowotworowej makrofagów [51].

Disacharydowe pochodne lipidu A, prekursor Ia i prekursor Ib są pod względem aktywności *in vitro* niemal identyczne z lipidem A. Prekursor Ib jest również silnym pirogenem i induktorem reakcji Schwartzmanna *in vivo*, co odróżnia go od słabo pirogenego prekursora Ia. Dane te wskazują, że toksyczne właściwości lipidu A *in vivo* wymagają obok struktury disacharydowej, również wolnych i zacylowanych grup hydroksylowych przy C3 w resztach kwasów tłuszczowych. Nietoksyczność monofosforylo- i defosforylo-pochodnych wskazuje także na związek obu grup fosforanowych z toksycznością lipidu A [52]. Nietoksyczny monofosforylo-lipid A, mimo, że pozbawiony pirogenności zachowuje w pełni włas-

ciwości adjuwantowe difosforylo-lipidu A [53]. Rokuje to szanse na wykorzystanie tej pochodnej jako adjuwantu w produkcji szczepionek. Defosforylo-pochodne są pozbawione właściwości immunomodulacyjnych.

Jak dotychczas brak dokładnych danych na temat receptorów dla LPS. Obniżenie aktywności biologicznej lipidu A po zamknięciu w liposomach przemawia jednak silnie za ich lokalizacją na błonie komórkowej [54, 55]. W molekularnym mechanizmie działania lipidu A prawdopodobnie główną rolę odgrywa hydrolyza fosfatydyloinozytoli [56]. Działanie LPS na makrofagi powoduje wzrost produkcji IP_3 i DAG, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{+2} , aktywację kinazy proteinowej C i alkalizację cytoplazmy [57]. Wzrost pH jest hamowany przez amylorid, bloker wymiennicza Na^+/H^+ . Warto dodać, iż indukcja syntezy TNF- α przez LPS jest również wrażliwa na amylorid [56].

Poza nietoksycznymi pochodnymi lipidu A duże nadzieje wiąże się z klinicznym zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych przeciw lipidowi A w celu jego neutralizacji *in vivo* i przeciwdziałania objawom wstrząsu endotoksycznego. Szereg grup opisał syntezę przeciwciał monoklonalnych przeciw trzem podstawowym fragmentom cząsteczki lipidu A [58]. Istnieją również doniesienia o udanych próbach neutralizacji niektórych efektów biologicznego działania lipidu A przy pomocy swoistych przeciwciał monoklonalnych w modelach *in vitro* i *in vivo*. Ostatnio opublikowano także prace o udanej próbie indukcji odporności na toksyczne działanie lipidu A przy pomocy przeciwciał antyidiotypowych przeciw przeciwciałom anty-lipid A. Przeciwciała monoklonalne przeciw lipidowi A są obecnie poddawane próbom klinicznym [61].

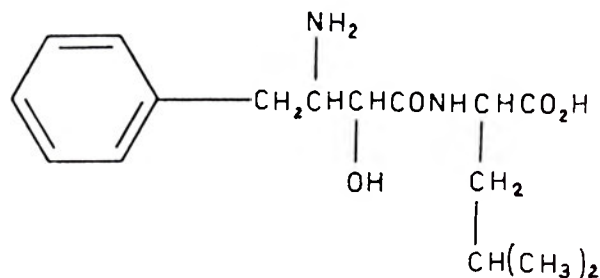
II-5. β -Glukany i lentinan

Lentinan jest wielkocząsteczkowym polisacharydem wyizolowanym z grzyba *Lentinus edodes* [62]. Pod względem chemicznym jest to łańcuch β -D-glukanu zawierający wiązania $\beta(1 \rightarrow 3)$ glikozydowe oraz $\beta(1 \rightarrow 6)$ odgałęzienia. Podobnie jak szereg innych, znacznie jednak słabiej przebadanych β -D-glukanów wyizolowanych z grzybów i innych drobnoustrojów, posiada on właściwości przeciwnowotworowe [62]. Lentinan stymuluje produkcję IL1, IL3, jak również aktywność przeciwnowotworową makrofagów otrzewnowych. Podwyższa on również aktywność NK *in vivo* oraz działa synergistycznie z IL2 w indukcji komórek o aktywności LAK [63]. Opisano również immunomodulacyjne działanie lentinanu na limfocyty T [64].

II-6. Bestatyna

Bestatyna (VIII) jest dipeptydem wyizolowanym ze *Streptomyces oliverticuli* zawierającym wiązanie pep-

tydowe pomiędzy L-leucyną i kwasem 2-hydroksy-3-amino-4-fenylomastlowym [65]. Aktywuje ona makrofagi, stymuluje produkcję IL1 [40] i IL2 [66]. Bestatyna zwiększa również aktywność lityczną komórek NK i limfocytów T-cytotoksycznych *in vitro* [40] oraz wykazuje aktywność przeciwnowotworową u myszy *in vivo* [67]. Molekularny mechanizm działania bestatyny nie jest znany. Najprawdopodobniej jednak jej działanie immunostymulacyjne związane jest z hamowaniem aminopeptydazy leucynowej, enzymu występującego w błonach komórkowych limfocytów i makrofagów [65].



Wzór VIII. Bestatyna.

Od kilku lat bestatyna jest testowana klinicznie na pacjentach z nowotworami złośliwymi w celu przeciwdziałania immunosupresji towarzyszącej zaawansowanemu stadium choroby nowotworowej [68].

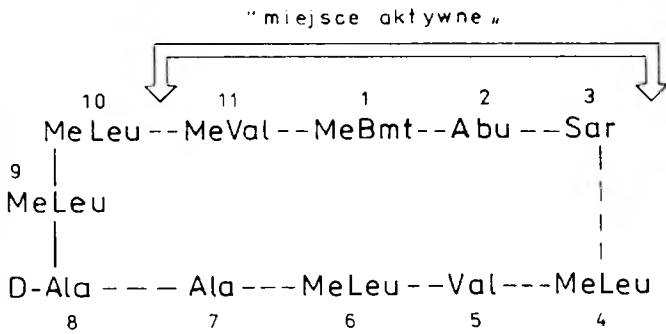
III. Immunosupresory

III-1. Cyklosporyna A

Cyklosporyna A (Cs-A, *Sandimmune*) (IX) należy do dużej grupy cyklicznych undekapeptydów wytwarzanych przez grzyb *Tylopodadium inflatum* Gams. Od 1976 roku, gdy J. Borel i współautorzy [69] opublikowali pierwszą pracę na temat jej właściwości immunosupresyjnych, poznano co najmniej 25 innych naturalnych, a także otrzymano około 750 syntetycznych i półsyntetycznych pochodnych [70]. Wśród naturalnych cyklosporyn jedynie kilka, a mianowicie cyklosporyny C, D, G i M wykazują silne działanie *in vivo*. Żadna z naturalnych czy syntetycznych pochodnych nie dorównuje jednak Cs-A pod względem aktywności immunosupresyjnej. Należy zaznaczyć, że również wiele z metabolitów Cs-A posiada właściwości immunosupresyjne i obserwowane *in vivo* działanie Cs-A jest prawdopodobnie po części wynikiem obecności jej aktywnych biologicznie metabolitów [71]. Co więcej, działanie immunosupresyjne tych metabolitów jest, w niektórych modelach doświadczalnych, synergistyczne z Cs-A.

Wydaje się, że za aktywność biologiczną Cs-A odpowiada pierwszy, dziewięciowęglowy aminokwas o szczególnej budowie — butenylometylo-L-treonina. Wysycenie podwójnego wiązania zmniejsza aktywność, zaś modyfikacja grupy hydroksylowej całkowicie

znosi efekt immunosupresyjny. Obecność sąsiadujących N-metylowaliny i sarkozyny ma również istotne znaczenie dla aktywności biologicznej [3]. Część aktywna cząsteczki obejmuje fragment zaznaczony na rysunku [72].

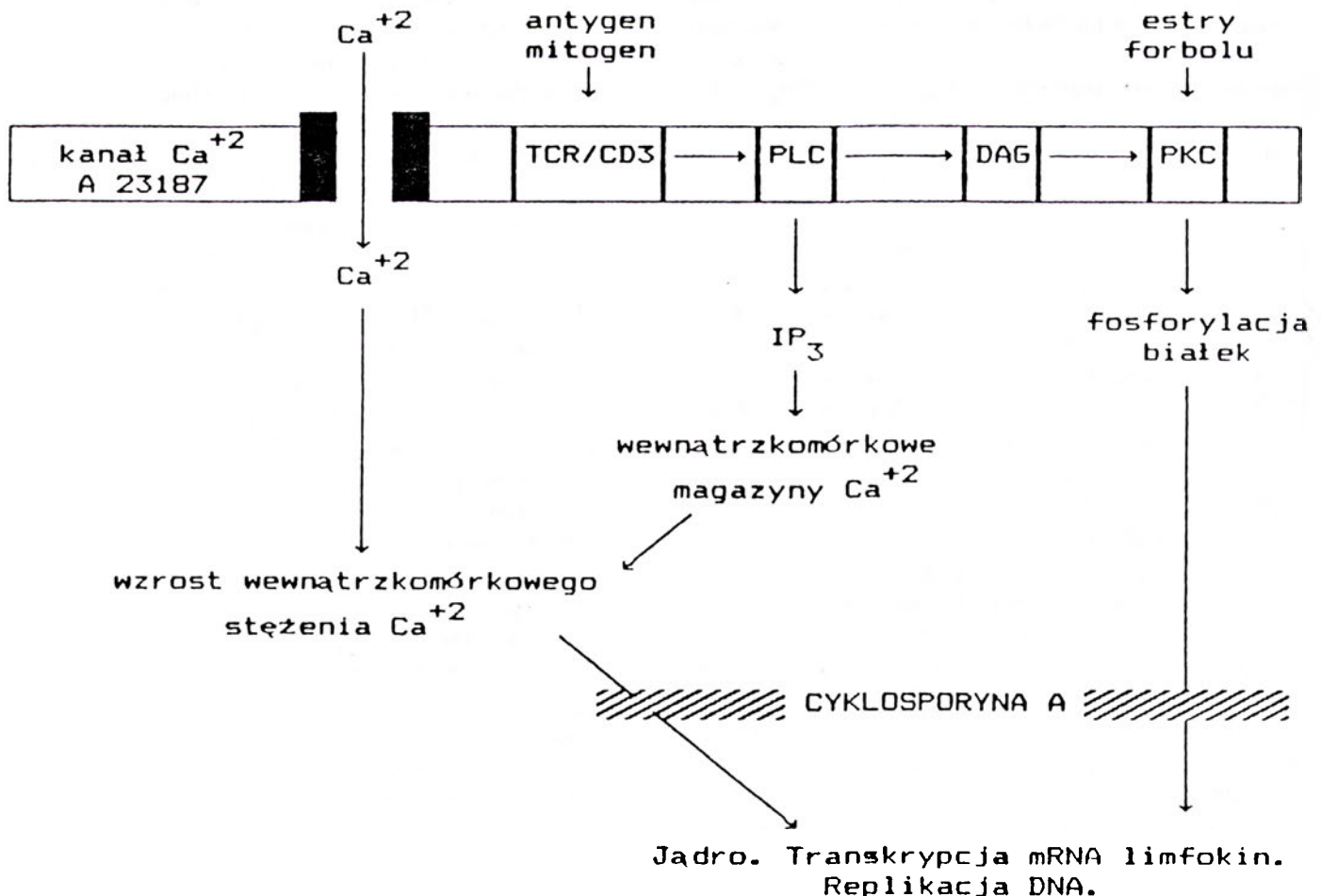


Wzór IX. Cyklosporyna A (Cs-A).

Użyte we wzorze symbole oznaczają: MeBmt — (4R)-4-[(E)-2-butenylo]-4-metylo-L-treonina; Abu — kwas L-2-aminobutanowy; Sar — sarkozyna; MeLeu — N-metylo-L-leucyna; Val — walina; Ala — L-alanina; D-Ala — D-alanina; MeVal — N-metylo-L-walina.

Olbrzymie zainteresowanie Cs-A związane jest z jej zdolnością do wybiórczego i odwracalnego hamowania odpowiedzi komórkowej przez zablokowanie aktywacji limfocytów T-pomocniczych. Cs-A hamuje produkcję IL2, IFN- γ [73], GM-CSF [74], IL3 [73], IL4 [75], proliferację limfocytów T w odpowiedzi na mitogeny takie jak PHA, mieszaną reakcję limfocytów (MLR) [74] i reakcje nadwrażliwości typu późnego (DTH). Cs-A blokuje również wzrost ekspresji antygeny CD2, receptorów transferynowych oraz receptora dla IL2 na limfocytach T pod wpływem prezentacji antygeny [76]. Dane dotyczące ekspresji receptora IL2 są jednak niejasne, gdyż szereg grup badawczych nie zaobserwowało hamującego wpływu Cs-A. Cs-A hamuje aktywację limfocytów T cytotoksycznych [74, 77]. W obecności IL4 limfocyty te stają się jednak odporne na immunosupresyjne działanie Cs-A. Opisano również bezpośrednie działanie Cs-A na komórki prezentujące antygen [78], bazofile, limfocyty B [79], jak również na różnicowanie limfocytów T w grasicy [80]. Dane dotyczące komórek NK wskazują na brak wpływu Cs-A na aktywność cytotoksyczną tych komórek *in vivo* [81]. Istnieją jednak doniesienia o spadku aktywności NK pod wpływem Cs-A [82].

Ryc. 2. Działanie cyklosporyny A na proces aktywacji komórki. Użyte symbole i skróty oznaczają odpowiednio: pole zakreskowane — miejsce działania cyklosporyny A; A 23187 — jonofor wapniowy; TCR/CD3 — kompleks receptora limfocyta T i antygeny CD3; PLC — fosfolipaza C; DAG — diacyloglicerol; PKC — kinaza proteinowa C; IP₃ — 1, 4, 5-trójfosforan inozytolu.



Molekularny mechanizm działania Cs-A nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo, że Cs-A jest niezbędna we wczesnym etapie aktywacji limfocytów T (G_0 , wczesna G_1) dla wywołania efektu hamującego. Etap aktywacji komórki wrażliwy na działanie Cs-A jest późniejszy niż wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{+2} [76, 77].

W limfocytach wykryto białka specyficznie wiążące Cs-A ze stałą wiązania K_d rzędu $10^{-7}M$, co jest zgodne z obserwowanymi efektywnymi stężeniami Cs-A *in vitro*. Początkowo opisywane miejsca receptorowe na błonie komórkowej odzwierciedlają najprawdopodobniej tylko przenikanie lipofilnej cząsteczki Cs-A przez dwuwarstwę lipidów błonowych. Najwięcej zainteresowania, jako potencjalne receptory Cs-A, wzbudziły dwa białka wewnątrzkomórkowe — kalmodulina i cyklofilina. Cs-A wiąże się z kalmoduliną z powinowactwem $2 \cdot 10^{-7}M$ (K_d) oraz hamuje fosfodiesterazę cyklicznych nukleotydów zależną od kalmoduliny [83]. Cs-A wywiera również w niektórych układach doświadczalnych efekty podobne do antagonistów kalmoduliny [72]. Inne badania nie wykazały jednak, wpływu Cs-A na procesy zależne od kalmoduliny [84]. Istnieją sugestie, iż wiązanie Cs-A z kalmoduliną ma charakter niespecyficzny i wynika z hydrofobowych właściwości cząsteczki kalmoduliny [77]. Cyklofilina została opisana jako 17-kD polipeptyd wiążący Cs-A z K_d rzędu $10^{-7}M$ [85]. Cyklofilina nie wykazuje homologii strukturalnej z kalmoduliną, choć wykazała pewną reaktywność krzyżową w RIA [83]. W odróżnieniu od kalmoduliny powinowactwo cyklosporyny do cyklofiliny wykazuje silną korelację z aktywnością immunosupresyjną danej pochodnej [85]. W związku z tym, bardzo interesującym wydaje się fakt, że cyklofilina jest identyczna z *cis-trans* izomerazą peptydylo-prolilową, ważnym enzymem posttranslacyjnych modyfikacji białek. Co więcej Cs-A hamuje aktywność tego enzymu [86, 87]. Nadal nie wyjaśniony jest fakt, dlaczego Cs-A hamuje wybiórczo aktywację komórek układu odpornościowego mimo, że zarówno kalmodulina, jak i cyklofilina występują w dużych ilościach we wszystkich komórkach ustroju. Warto również wspomnieć, że w limfocytach T wykryto mechanizm aktywacji niewrażliwy na Cs-A. Może być on związany z antygenem CD28, gdyż przeciwciała anti-CD28 antyaktywują limfocyty T nawet w obecności Cs-A [88].

Ze względu na swoje szczególne właściwości immunosupresyjne, już w 1978 roku Cs-A została poddana próbom klinicznym [89] i obecnie jest lekiem z wyboru w transplantologii. Użycie wysokich dawek Cs-A jest jednak w dużym stopniu limitowane przez jej nefrotoksyczność i działanie hipertensyjne [90]. Istnieją doniesienia o zwiększonym ryzyku zakrzepicy oraz tendencjach do krwawienia w wyniku toksycznego działania Cs-A na śródbłonek. Opisano również częstsze występowanie chłoniaków u pacjentów po terapii Cs-A. Transplantologia nie wyczerpuje jednak farmakologii

cznego zastosowania cyklosporyny. Cs-A została z powodzeniem użyta w terapii szeregu chorób z autoagresji: reumatoidalnego zapalenia stawów, cukrzycy typu I, *myasthenia gravis*, łuszczycy, choroby Leśniewskiego-Crohna, zapalenia jagodówki. Cyklosporyny posiadają również aktywność przeciwgrzybiczą i przeciw pasożytniczą, choć o dość wąskim spektrum. Właściwości przeciwgrzybicze i przeciw pasożytnicze są niezależne od immunosupresyjnych. Rokuje to szanse na uzyskanie pochodnych aktywnych przeciw pasożytniczo pozbawionych aktywności immunosupresyjnej. Cs-A wzmacnia również działanie niektórych cytostatyków na komórki normalne i nowotworowe. Wśród syntetycznych pochodnych na uwagę zasługuje (Val^2)-dihydrocyklosporyna. Ta pochodna nie hamuje odporności humoralnej, zachowując jednak supresyjny wpływ na odpowiedź komórkową. Choć nieskuteczna w zapobieganiu odrzuceniu przeszczepu okazała się ona efektywna w leczeniu przewlekłych stanów zapalnych (np. doświadczalnego *encephalomyelitis*). Co więcej, (Val^2)-dihydro-Cs pozbawiona jest nefrotoksyczności, wskazując na możliwość oddzielenia właściwości immunosupresyjnych od nefrotoksycznych. Silna hepatotoksyczność tej pochodnej i działanie hipertensyjne spowodowały jednak zarzucenie prób klinicznych.

III-2. FK506 i rapamycyna

Substancja FK 506 (X) jest makrolidem wyizolowanym z grzyba *Streptomyces tsukubaensis no9993*, o właściwościach zbliżonych do cyklosporyny A. FK 506 jest jednak aktywny immunosupresyjnie w stężeniach kilkaset razy niższych niż cyklosporyna A [91]. Mimo braku podobieństwa strukturalnego FK 506 i cyklosporyna A wywierają bardzo zbliżony efekt na aktywację limfocytów T, hamując jedynie te systemy przekazywania, które są związane ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{+2} . Opisano również hamujące działanie FK 506 na limfocyty B. Najnowsze doniesienia wskazują jednak, iż limfocyty B są dużo mniej wrażliwe na supresyjne działanie FK 506 niż limfocyty T [92]. FK 506 hamuje syntezę mRNA dla IL2, IL3, IL4, $IFN\gamma$, GM-CSF, $TNF\alpha$, jak również ekspresję receptorów dla IL2 oraz receptorów transferynowych na limfocytach stymulowanych alloantygenem. Ostatnio wyizolowane z cytosolu komórek śledziony ludzkiej i linii JURKAT białko wiążące FK 506 (FKBP) okazało się posiadać aktywność *cis-trans* izomerazy peptydylo-prolilowej. Białko wiążące FK 506 jest jednak różne od cyklofiliny. W większości modeli doświadczalnych FK 506 wykazuje silne działanie synergistyczne z niskimi dawkami Cs-A [93]. Nadzieje na ograniczenie obserwowanych klinicznie efektów ubocznych terapii Cs-A przez łączne stosowanie niskich dawek obu wspomnianych środków immunosupresyjnych, nie znalazły jednak potwierdzenia w badaniach klinicznych.

Doświadczenia laboratoryjne na szczurach, psach i naczelnych z wykorzystaniem FK506 jako jedynego środka immunosupresyjnego przy przeszczepach nerek, serca, wątroby, płuc, jelita cienkiego [94] dały obiecujące rezultaty. Również zachęcające są wyniki pierwszych badań klinicznych na pacjentach po transplantacji wątroby, u których konwencjonalna terapia immunosupresyjna okazała się nieskuteczna. Badania te, przeprowadzone w klinice Uniwersytetu w Pittsburghu nie potwierdziły jednocześnie wcześniejszych doniesień o bardzo wysokiej toksyczności FK506 obserwowanej w czasie doświadczeń na zwierzętach.

FK506, w odróżnieniu od Cs-A, znamienne wydłuża czas przeżycia myszy MRL-lpr/lpr obciążonych ciężkimi schorzeniami autoimmunologicznymi [95]. Rokuje to szanse na użycie FK506 również w terapii chorób z autoagresji. Ostatnio doniesiono o udanych próbach zastosowania FK506 w dwóch przypadkach kłębuszkowego zapalenia nerek opornego na prednizon. Uzyskano kompletną remisję bez upośledzenia funkcji nerek, co było częstym następstwem terapii Cs-A [96].

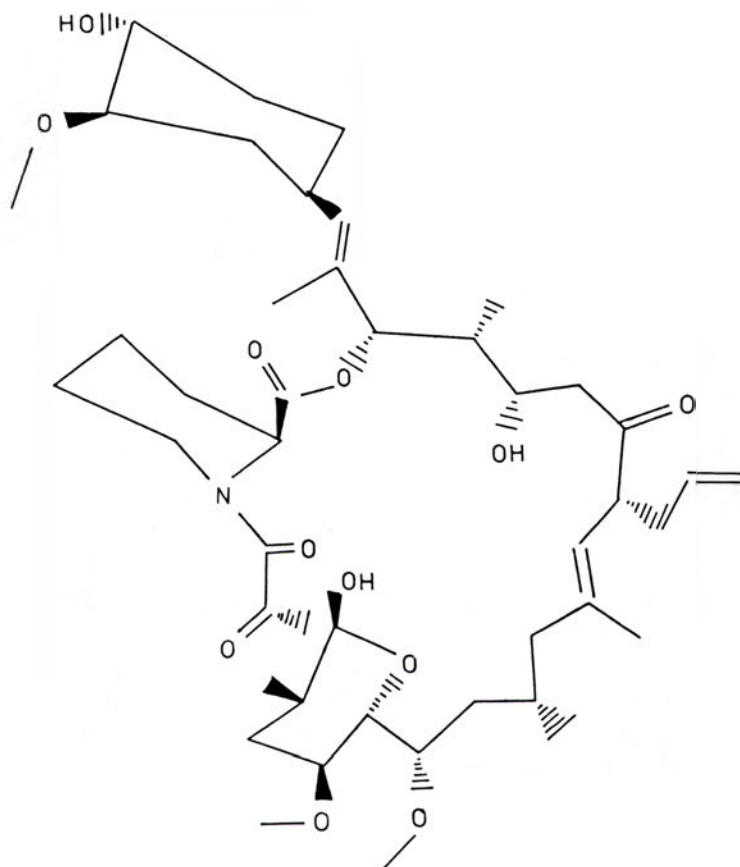
Pod względem strukturalnym FK506 wykazuje duże podobieństwo do leku przeciwgrzybiczego rapamycyny (XI), posiadającego również właściwości immunosupresyjne.

Pomimo podobieństwa strukturalnego do FK506 rapamycyna nie hamuje jednak produkcji IL2, lecz blokuje odpowiedź limfocytów T na egzogenną IL2 lub IL4 (etap niewrażliwy na FK506 i Cs-A). Również w odróżnieniu od FK506 i Cs-A, działających na granicy faz G_0 i G_1 , rapamycyna blokuje progresję

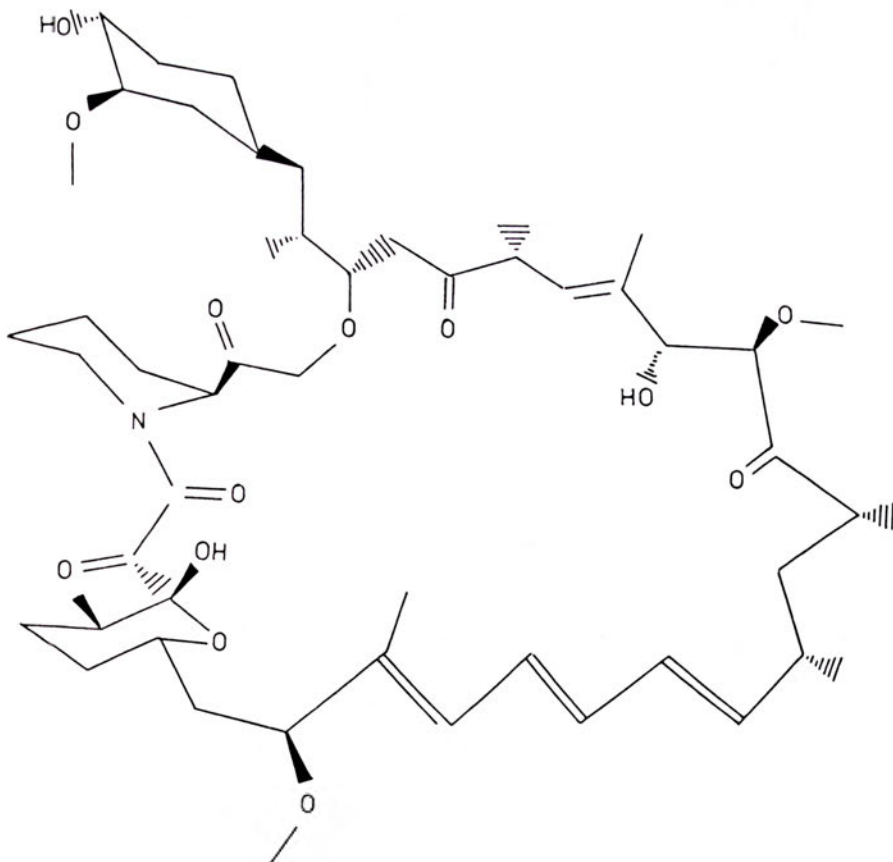
komórki w cyklu komórkowym w fazie G_1 [97]. Co więcej, FK506 i rapamycyna działają antagonistycznie na aktywację mysich limfocytów T, konkurując o wspólne miejsce receptorowe w cytosolu. W przeciwieństwie do działania FK506, Cs-A wzmagając efekt immunosupresyjny rapamycyny [97].

IV. Podsumowanie

Udane próby terapeutycznego zastosowania immunomodulatorów sięgają zeszłego wieku [98], jed-



Wzór X. FK-506.



Wzór XI. Rapamycyna.

nak dopiero w ostatnim dziesięcioleciu kazuistyczne doniesienia w tej dziedzinie ustąpiły miejsca wynikom przekonująco udokumentowanych prospektywnych badań klinicznych. Do poważnego potraktowania możliwości terapeutycznych immunomodulatorów przyczynił się niewątpliwie olbrzymi postęp wiedzy dotyczącej regulacji odpowiedzi immunologicznej w stanach fizjologii i patologii, który dokonał się na przestrzeni kilku ostatnich lat. Zrozumienie podstawowych mechanizmów warunkujących stopień reaktywności immunologicznej ustroju umożliwiło racjonalne próby wybiórczego i bezpiecznego modyfikowania tych procesów.

Chociaż obecnie jedynie cyklosporyna A zdobyła miejsce w rutynowym postępowaniu klinicznym, cały szereg immunomodulatorów znajduje się w trakcie badań klinicznych, dając obiecujące wyniki. Szczególne miejsce zajmują w tej grupie syntetyczne analogi naturalnych substancji występujących w świecie mikroorganizmów. Stanowią one uwieńczenie kilkunastoletniej pracy nad wyizolowaniem z drobnoustrojów frakcji odpowiedzialnych za ich właściwości immunomodulacyjne, ustaleniem ich struktury chemicznej oraz uzyskaniem z makrocząsteczek fragmentów aktywnych o na tyle prostej strukturze, że możliwych do otrzymania na drodze syntetycznej przy umiarkowanych kosztach.

Mimo pojawiających się sensacji, nadzieje na „cudowny lek” wydają się być płonne. Do takiego zresztą miana omówione immunomodulatory wcale nie pretendują. Stanowią one jednak wyjątkowo wartościowy materiał dla niektórych najnowszych kierunków farmakologii: projektowania syntetycznych szczepionek, immunostymulacji towarzyszącej chemioterapii i chirurgicznemu leczeniu nowotworów czy korekty defektów immunologicznych leżących u podłoża autoagresji.

Artykuł otrzymano 25 października 1990 r.
Zaakceptowano do druku 21 stycznia 1991 r.

Piśmiennictwo

- Kołodziejczyk A.M., Kołodziejczyk A.S., (1987), *Post. Bioch.* **33**: 203-229.
- Adam A., Lederer E., (1988), *ISI Atlas of Science and Immunology* **1**: 205-214.
- Devlin J.P., Hargrave K.D., (1989), *Tetrahedron*, **45**: 4327-4369.
- Wang Y.L., Kaplan S., Whiteside T., Herbermann R.B., (1989), *Immunopharmacol* **18**: 213-222.
- LeGarrec Y., Morin A., (1987), *Nat. Immun. Cell. Growth. Regul.* **6**: 65-76.
- Jupin C., Parant M., Chedid L., (1989), *Immunol. Lett.* **22**: 187-192.
- Jupin C., Parant M., Chedid L., (1989), *Immunobiol.* **180**: 68-79.
- Sone S., Lopez-Berestein G., Fidler I.J., (1986), *Cancer Immunol. Immunother.* **21**: 93-99.
- Salem P., Deryckx S., Dulioust A., Vivier E., Denizol Y., Damais C., Dinarello C.A., Thomas Y., (1990), *J. Immunol.* **144**: 1338-1344.
- Sanceau J., Falcoff R., Beranger F., Carter D.B., Wietzerbin J., (1990), *Immunol.* **69**: 52-56.
- Frost H., Murray J.L., Chaudric H.A., Van Damme J., (1990), *J. Biol. Resp. Modif.* **9**: 160-166.
- Odean M.J., Frane C.M., Van der Vieren M., Tomai M.A., Johnson A.G., (1990), *Infect. Immun.* **58**: 427-432.
- Broudy V.C., Kaushansky K., Shoemaker S.G., Aggarwal B.B., Adamson J.W., (1990), *J. Immunol.* **144**: 3789-3794.
- Parant M., Parant F., Vinit M.A., Jupin C., Noso Y., Chedid L., (1990), *J. Leuk. Biol.* **47**: 164-169.
- Gregoriadis G., (1990), *Immunol. Today* **11**: 89-97.
- Petit C., Monsigny M., Roche A.C., (1990), *J. Biol. Resp. Modif.* **9**: 33-43.
- Derrien D., Midoux P., Petit C., Negre E., Mayer R., Monsigny M., Roche A.C., (1989), *Glycoconjugate J.* **6**: 241-255.
- Shaw J.M., Futch W.S., Schook L.B., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 6112-6116.
- Fogler W.E., Fidler I.J., (1986), *J. Immunol.*, **136**: 2311-2317.
- Silverman D.H.S., Krueger J.M., Karnovsky M.L., (1986), *J. Immunol.* **136**: 2195-2201.
- Souvannavong V., Adam A., (1984), *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **125**: 431-439.
- Souvannavong V., Brown S., Adam A., (1990), *Cell. Immunol.* **126**: 106-116.
- Tenu J.P., Adam A., Souvannavong V., Yapo A., Petit J.F., Douglas K., (1989), *Int. Immunopharmacol.* **11**: 653-661.
- Dziarski R., (1988), *Cell Immunol.* **111**: 10-27.
- Dziarski R., (1989), *Eur. J. Immunol.* **19**: 125-130.
- Baschang G., (1989), *Tetrahedron* **45**: 6331-6360.
- Meltzer L.T., Serpa K.A., Moos W.H., (1989), *Psychopharmacol.* **99**: 103-108.
- Krueger J.M., Karaszewski J.W., Davenne D., Shoham S., (1986), *Federation Proc.* **45**: 2552-2555.
- Chomel J.J., Simon-Lavoine N., Thouvenot D., Valette M., Choay J., Chedid L., Aymard M., (1988), *J. Biol. Resp. Modif.* **7**: 581-586.
- Jones W.R., Judd S.J., Ing R.M.Y., Powell J., Bradley J., Denholm E.H., Mueller U.W., Griffin P.D., (1988), *Lancet* **2**: 1295-1298.
- Pecyk R.A., Fraser-Smith E.B., Matthews T.S., (1989), *Infect. Immun.* **57**: 3257-3258.
- MacEwen E.G., Kurzman I.D., Rosenthal R.D., Smith B.W., Manley P.A., Roush J.K., Howard A.E., (1989), *J. Natl. Canc. Inst.* **81**: 935-938.
- Urba J.W., Hartmann L.C., Longo D.L., Steis R.G., Smith II J.W., Kedar I., Creekmore S., Sznol M., Conlon K., Kopp W.C., Huber C., Herold M., Alvord W.G., Snow S., Clark J.W., (1990), *Cancer Res.* **50**: 2979-2986.
- Hanagan J.R., Trunet P., LeSher D., Andrejcio K., Frost H., (1989), w *Liposomes in the Therapy of Infectious Diseases and Cancer* (red. Lopez-Berenstein G., Fidler I.J.), str. 305-315 Alain R. Liss, New York.
- Yokota Y., Wakai Y., Watanabe Y., Mine Y., (1988), *J. Antibiot.* **41**: 1479-1487.
- Leclerc C., Deriaud E., Schutze M.P., Chedid L., (1988), *Int. J. Immunopharmacol.* **10**: 293-298.
- Lemaire G., Tenu J.P., Petit J.F., (1986), *Med. Res. Rev.* **6**: 243-274.
- Grand-Perret T., Lepoivre M., Petit J.F., Lemaire G., (1986), *Eur. J. Immunol.* **16**: 332-338.
- Vosika G., Giddings C., Gray G.R., (1984), *J. Biol. Resp. Modif.* **3**: 620-626.
- Werner G.H., Floc'h F., Migliore-Samour D., Jolles P., (1986), *Experientia* **42**: 521-531.
- Wu H.C., Tokunaga M., (1986), *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* **125**: 127-157.
- Seifert R., Schultz G., Ruchter-Freund M., Metzger J., Weismuller K.H., Jung G., Bessler W.G., Hauschildt S., (1990), *Biochem. J.* **267**: 795-802.
- Hoffmann P., Wiesmuller K.H., Metzger J., Jung G., Bessler W.G., (1989), *Biol.-Chem.-Hoppe-Slayer* **370**: 575-582.
- Reitermann A., Metzger J., Wiesmuller K.H.,

- Jung G., Bressler W.G., (1989), *Biol-Chem-Hoppe-Slayer* 370: 343-352.
45. Westphal O., Luderitz O., Galanos C., Mayer H., Rietschel E.T., (1986), w *Advances in Immunopharmacology* (red. Chedid L., Hadden J.W., Ipreafico F., Dukor P., Willoghby D.) str. 13-34 Pergamon Press, Oxford.
 46. Kirkland T.N., Ziegler E.J., Tobias P., Ward D.C., Michalek S.M., McGhee J.R., Macher I., Urayama K., Appelmelk B.J., (1988), *J. Immunol.* 141: 3208-3213.
 47. Flad H.D., Loppnow H., Feist W., Wang M.H., Brade H., Kusumoto S., Rietschel E.T., Ulmer A.J., (1989), *Lymphokine Res.* 8: 235-238.
 48. Beutler B., Krochin N., Milsark I.W., Luedke C., Cerami A., (1986), *Science* 232: 977-980.
 49. Aschauer H., Grob A., Hildebrandt J., Schuetze E., Stuetz P., (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 9159-9164.
 50. Kumazawa Y., Nakatsuka M., Takimoto H., Furuya T., Naqumo T., Jamamoto A., Homma Y., Inada K., Yoshida M., Kiso M., (1988), *Infect. Immun.* 56: 149-155.
 51. Maeda H., Saiki I., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., Azuma A.I., (1989), *Vaccine* 7: 275-281.
 52. Homa J.Y., Matsuura M., Kumazawa Y., (1990), *Adv. Exp. Med. Biol.* 256: 101-109.
 53. Johnson A.G., Tomai M.A., (1990), *Adv. Exp. Med. Biol.* 256: 567-579.
 54. Daemen T., Veninga A., Dijkstra J., Scherphof G., (1989), *J. Immunol.* 142: 2469-2474.
 55. Dijkstra J., Mellors J.W., Ryan J.L., (1989), *Infect. Immun.* 57: 3357-3363.
 56. Uhing R.J., Adams D.O., (1989), *Agents. Actions.* 26: 9-14.
 57. Prpic V., Gawdi G., Herman B., Uhing R.J., Adams D.O., (1988), *FASEB J* 2: A916.
 58. Pollack M., Oishi K., Chia J., Evans M., Guelde G., Koles N., (1990), *Adv. Exp. Med. Biol.* 256: 331-340.
 59. Shnyra A.A., Kalantarov G.F., Vlasik T.N., Trakht I.N., Mayatnikov A.J., Tabachnik A.L., Borovikov D.V., Golubykh V.L., (1990), *Adv. Exp. Med. Biol.* 256: 681-684.
 60. Kato T., Takazoe I., Okuda K., (1990), *Infect. Immun.* 58: 416-420.
 61. Harkonen S., Kennedy D., Greenberg R., (1988), *Prog. Clin. Biol. Res.* 272: 395-406.
 62. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y., Arai Y., Fukuoka F., (1970), *Cancer Res.* 30: 2776-2781.
 63. Yamasaki K., Sone S., Yamashita T., Ogura T., (1989), *Cancer Immunol. Immunother.* 29: 87-92.
 64. Hamuro J., Wagner H., Rollinghoff M., (1978), *Cell Immunol.* 38: 328-335.
 65. Umezawa H., Ishizuka M., (1985), *J. Clin. Pharmac. Ther. Toxic.* 23: S9-S13.
 66. Noma T., Klein B., Cupissol D., Yata J., Serrou B., (1984), *Int. J. Immunopharmacol.* 6: 87-92.
 67. Talmadge J.E., Lenz B.F., Pennington R., Long C., Phillips H., Schneider M., Tribble H., (1986), *Cancer Res.* 46: 4505-4510.
 68. Konno K., Nakai Y., Kumano N., str. 125-132, Maizumi H., str. 173-178, Isono K., Onoda S., Ishikawa T., Koide Y., Sato H., str. 187-200, Akiya A., Okabe K., str. 201-210, (1981), w *Small Molecular Immunomodifiers of Bacterial Origin*, (red. Umezawa H.), Pergamon Press, Elmsford, New York.
 69. Borell J.F., Feuer C., Gubler H.V., Stahelin H., (1976), *Agents Actions* 6: 468-475.
 70. von Wartburg A., Traber R., (1986), *Prog. Allergy* 38: 28-45, Wenger R.M., (1986), 46-64.
 71. Lorber M.I., (1989), *Year Immunol.* 4: 253-263.
 72. Foxwell B.M.J., Ryffel B., (1989), *Immunol. Allergy Clin. North. America* 9: 79-93.
 73. Herold K.C., Lancki D.W., Moldwin R.L., Fitch F.W., (1986), *J. Immunol.* 136: 1315-1321.
 74. Havele C., Paetkau V., (1988), *J. Immunol.* 140: 3303-3308.
 75. Granelli-Piperno A., Keane M., (1988), *Transplant. Proc.* 20: S136-S142.
 76. Redelman D., (1988), *Cytometry* 9: 156-163.
 77. Trenn G., Taffs R., Hohman R., Kincaid R., Shevach E.M., Sitkorsky M., (1989), *J. Immunol.* 142: 3796-3802.
 78. Palay D.A., Cluff C.W., Wentworth P.A., Ziegler H.K., (1986), *J. Immunol.* 136: 4348-4353.
 79. Cirillo R., Triggiani M., Siri L., Ciccarelli A., Pettit G.R., Condorelli M., Marone G., (1990), *J. Immunol.* 144: 3891-3897.
 80. Kosugi A., Sharrow S.O., Shearer G.M., (1989), *J. Immunol.* 142: 3026-3032.
 81. Lefkowitz M., Kornbluth J., Tomaszewski J.E., Jorkasky D.K., (1988), *J. Clin. Immunol.* 8: 121-127.
 82. Wachowiak J., (1986), *Immunol. Lett.* 13: 95-99.
 83. Colombani P.M., Robb A., Hess A.D., (1985), *Science* 228: 337-339.
 84. Mizushima Y., Kosaka H., Sakuma S., (1987), *J. Biochem.* 102: 1193-1201.
 85. Handschumacher R.E., Harding M.W., Rice J., Drugge R.J., (1984), *Science* 226: 544-546.
 86. Takahashi N., Hayano T., Suzuki M., (1989), *Nature (Lond)* 337: 473-475.
 87. Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kieffhaber T., Schmid F.X., (1989), *Nature (Lond)* 337: 476-478.
 88. June C.H., Ledbetter J.A., Linsley P.S., Thompson C.B., (1990), *Immunol. Today* 11: 211-216.
 89. Calne R.Y., Rolles K., White D.J.G. (1979), *Lancet* 2: 1033-1036.
 90. Scherrer U., Vissing S.F., Morgan B.J., Rollins J.A., Tindall R.S., Ring S., Hanson P., Mohanty P.K., Victor R.G., (1990), *New. Eng. J. Med.* 323: 693-699.
 91. Thomson A.W., (1989), *Immunol. Today* 10: 6-9.
 92. Wąsik M., Stępień-Sopniewska B., Łagodziński Z., Górski A., (1990), *Immunopharmacol* 20: 57-61.
 93. Woo J., Sewell H.F., Thomson A.W., (1990), *Scand. J. Immunol.* 31: 297-304.
 94. Lee K.K., Stangl M.J., Todo S., Langrehr J.M., Starzl T.E., Schraut W.H., (1990), *Transplant. Proc.* 22: 78-79.
 95. Yamamoto K., Mori A., Nakahama T., Ito M., Okudaira H., Miyamoto T., (1990), *Immunol.* 69: 222-227.
 96. McCauley J., Tzakis A.G., Fung J.J., Todo S., Starzl T.E., (1990), *Lancet* 335: 674.
 97. Metcalfe S.M., Richards F.M., (1990), *Transplant* 49: 798-802.
 98. Coley W.B., (1891), *Ann. Surg.* 14: 199-220.

8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON SECOND MESSENGERS & PHOSPHOPROTEINS

(The Biology & Medicine of Signal Transduction)
August 3rd-8th 1992
Glasgow, Scotland

Travel Grants:

It is hoped that a number of partial travel awards will be available for younger participants. Details will be given in the Second Announcement.

Dr. P. R. M. Dobson, General Secretary,
8th International Conference on Second
Messengers & Phosphoproteins,
Institute of Endocrinology,
Cellular Signalling Group,
Department of Human Metabolism & Clinical
Biochemistry, University of Sheffield Medical School,
P. O. Box 596,
SHEFFIELD, S10 2UL,
United Kingdom.

Owadzi hormon juvenilny. Synteza, degradacja oraz oddziaływanie na poziomie komórkowym i tkankowym

Insect juvenile hormone. Synthesis, degradation and interaction on the cell and tissue level

JOANNA MICHALIK¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Biosynteza i poziom JH w tkankach owadzych
- III. Szlaki biosyntezy JH
 - III-1. Szlak seskwiterpenoidowy biosyntezy JH III
 - III-2. Szlak homoizoprenoidowy
 - III-3. Enzymy biosyntezy JH
 - III-3.1. Reduktaza HMG-CoA
 - III-3.2. Epoksydaza (monooksygenaza)
 - III-3.3. o-metylotransferaza
- IV. Metabolizm JH i produkty jego degradacji
 - IV-1. Hydratacja reszty epoksydowej
 - IV-2. Hydroliza estru
 - IV-3. Utlenianie
- V. Rola JH w regulacji funkcji komórkowych
 - V-1. Tkanki w rozwoju osobniczym
 - V-2. Diapauza
 - V-3. Metabolity
 - V-4. Mechanizm działania na poziomie komórkowym

Contents:

- I. Introduction
- II. JH biosynthesis and JH level in insect tissues
- III. Biosynthetic pathways of JHs
 - III-1. Sesquiterpenoid pathway of JH III synthesis
 - III-2. Homo-isoprenoid pathway
 - III-3. Enzymes of JH biosynthesis
 - III-3.1. HMG-CoA reductase
 - III-3.2. Epoxidase (monooxygenase)
 - III-3.3. o-methyl transferase
- IV. JH metabolism and its degradation products
 - IV-1. Epoxide residue hydration
 - IV-2. Ester hydrolysis
 - IV-3. Oxidation
- V. JH as a regulator of cell function
 - V-1. Tissue in development
 - V-2. Diapause
 - V-3. Metabolites
 - V-4. Mechanism of action on the cell level

Wykaz stosowanych skrótów: JH — hormon juvenilny; CA — *corpora allata*; RIA — test radioimmunologiczny; GC-MS — spektroskopia masowa sprzężona z chromatografią gazową; HMG-CoA — 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzym A; HEG-CoA-3-hydroksy-3-etyloglutarylo koenzym A; FPP — pirofosforan farnezyli; SAM — S-adenozylu metionina.

¹ Dr, Zakład Biochemii Porównawczej, Instytut Biochemii i Biofizyki, PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

I. Wstęp

Hormon juvenilny, jako jeden z głównych regulatorów trzech zasadniczych procesów w rozwoju owadów: różnicowania, morfogenezy i wzrostu, skupia uwagę badaczy również z praktycznego punktu widzenia. Spośród 3 milionów gatunków owadów żyjących na ziemi, około 0,1% stanowią szkodniki roślin uprawnych i drzewostanów, a także nosiciele chorób zwierząt i ludzi. Straty żywnościowe wynikłe z niszcycielskiej działalności owadów sięgają 20% światowych zbiorów [1].

Znajomość mechanizmów kontrolujących rozwój owada na poziomie komórkowym i tkankowym stanowi szansę skutecznej walki ze szkodnikami. Negatywne następstwa stosowania syntetycznych insektycydów skłaniają do poszukiwania innych regulatorów populacji szkodliwych owadów. Zastosowanie hormonów wzrostowych, głównie analogów hormonów juvenilnych o wysokiej selektywności gatunkowej i nietoksycznych dla zwierząt i ludzi stanowi inne podejście metodyczne do prób wpływania na liczebność populacji owadów szkodliwych i pasożytniczych.

Hormony juvenilne (JH) występujące u owadów wyodrębniono i scharakteryzowano jako związki o charakterze seskwiterpenów. Pojawiają się wprawdzie sporadyczne doniesienia o ich obecności u skorupiaków [2] czy roślin [3], lecz ich znaczenie i funkcje pozostają niewyjaśnione.

Opisano pięć homologów hormonów juvenilnych: JH I (C_{18} JH), JH II (C_{17} JH), JH III (C_{16} JH), JH 0 oraz 4-metylo-JH I (izo- JH 0), przedstawionych na rycinie 1. Trzy pierwsze formy syntetyzowane w *corpora allata* owadów występują w stadium larwy, poczwarki i imago, natomiast dwie ostatnie wyizolowano ostatnio z zarodków *M. sexta*.

II. Biosynteza i poziom JH w tkankach owadzych

Pierwsze badania *in vivo* nad biosyntezą JH przeprowadzono na początku lat siedemdziesiątych, wstrzykując radioaktywne prekursorzy dorosłym sami-

com *H. cecropia*. Uzyskano tą drogą cenne informacje na temat biogenezy metylowej grupy estru JH. Doświadczenia *in vivo* nastrożają jednak kłopoty ze względu na bardzo małą wielkość CA w stosunku do ciała owada. U samicy *M. sexta* proporcja ta kształtuje się jak 1:250 000, co utrudnia uzyskanie radioaktywnego produktu przy podaniu prekursorów znakowanych [³H] lub [¹⁴C] [4]. Ponadto podany substrat jest wykorzystywany w innych szlakach, zarówno anabolicznych jak i katabolicznych, co poważnie komplikuje interpretację wyników.

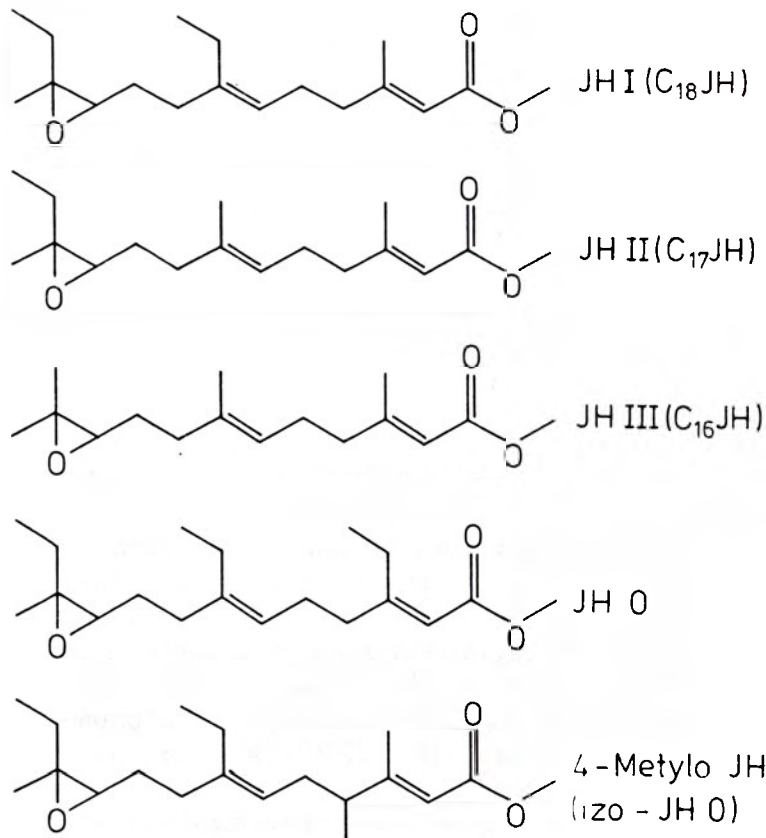
Pierwsze badania nad biosyntezą JH *in vitro* przeprowadzono analogicznie do doświadczeń *in vivo*. Badacze stosowali długie czasy inkubacji CA, wyizolowanych z dorosłej samicy *M. sexta*, w obecności metioniny, znakowanej w grupie metylowej. Wykazano w ten sposób syntezę JH III oraz JH II. W dalszych badaniach wykorzystano techniki *in vitro* do badania syntezy JH u *S. gregoriana* i wkrótce udoskonalona metoda radiochemiczna posłużyła do badania zależności między syntezą JH a wzrostem oocytu [5], oraz dynamiki uwalniania JH do hemolimfy, jak również zależności między wielkością CA a syntezą JH [6]. Technika badań *in vitro* stosowana jest powszechnie do badania syntezy JH u różnych owadów w różnych stadiach rozwoju. Zastosowanie krótkich czasów inkubacji *in vitro* umożliwiło wyodrębnienie i identyfikację związków pośrednich szlaków biosyntezy JH [7].

JH obecny jest u owadów w większości okresów stadiów larwalnych. Z reguły stężenia JH w początkowym okresie stadium larwalnego są wyższe niż w końcowej fazie tego samego stadium, natomiast w ostatnim okresie stadium larwalnego JH zanika zupełnie, co umożliwia metamorfozę. W trakcie rozwoju osobniczego obserwuje się zarówno zmiany ilościowe, jak i jakościowe; tzn. zarówno zmiany bezwzględnego stężenia JH, jak i zmiany w ilości różnych homologów JH względem siebie. Zaobserwowano znaczne różnice (ponad dwa rzędy wielkości) w bezwzględnym stężeniu krążącego hormonu w ciele różnych owadów w takim samym stadium rozwoju [8].

Stężenie hormonu określić można jedną z trzech metod. Są to:

- metoda testu biologicznego [9]
- metoda radioimmunologiczna (RIA), [10]
- spektroskopia masowa sprzężona z chromatografią gazową (GC-MS), [11]

Dane dotyczące miana JH, uzyskane przy użyciu różnych metod wykazują zadawalającą zgodność: np. w przypadku zastosowania metody testu biologicznego i metody GC-MS u *N. cineraria* [12] oraz metody RIA i metody GC-MS u *L. decemlineata* [13]. W innych przypadkach, jak u *G. mellonella* dane dotyczące poziomu JH wykazują znaczne rozbieżności [9, 14].



Ryc. 1 Homologi hormonów juwenilnych, zidentyfikowanych u owadów.

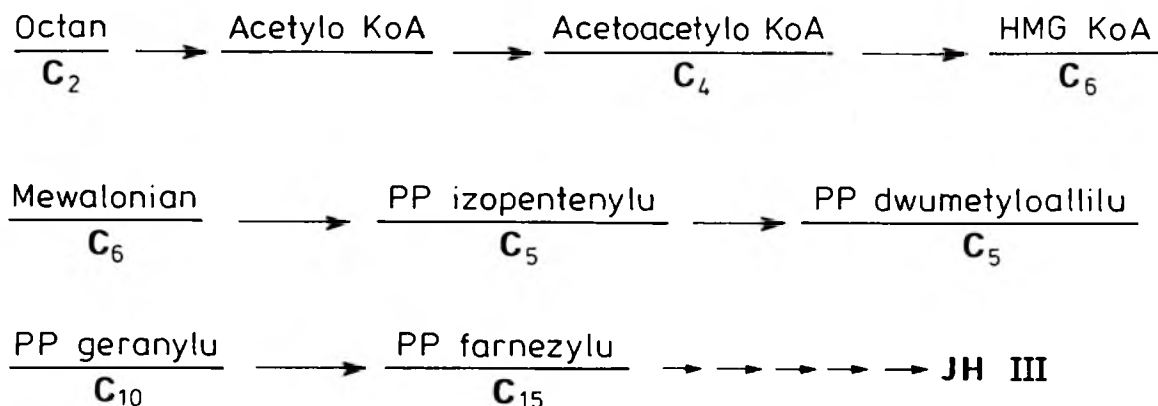
III. Szlaki biosyntezy JH

Wiadomo, że *corpora allata* są jedynym organem owadów syntetyzującym JH i że synteza tego hormonu przebiega pod kontrolą zarówno humoralną jak i nerwową. Badanie szlaków biosyntezy hormonów juwenilnych oparto na śledzeniu losów znakowanych prekursorów i identyfikacji produktów pośrednich w układach *in vivo* jak również *in vitro* w wyizolowanych gruczołach CA.

JH III syntetyzowany jest w szlaku syntezy seskwiterpenów z octanu jako prekursora i z jednostką izoprenoidową jako stadium pośrednim, wykorzystywaną także w szlaku syntezy JH II i JH I. Szkielet węglowy wyższych homologów: JH II i JH I zawierających etylowe grupy boczne, dołączone do głównego łańcucha powstaje z octanu i propionianu, tworząc w stadium pośrednim jednostkę homoizoprenoidową, dającą w kombinacji połączeń jednostek izoprenoidowych i homoizoprenoidowych JH 0, JH I oraz JH II. Nie udało się natomiast wykazać w CA syntetyzujących JH III syntezy innych form hormonu po podaniu prekursorów JH I i JH II [8].

III-1. Szlak seskwiterpenoidowy biosyntezy JH III

Synteza łańcucha węglowego JH III przebiega według schematu opisanego w przypadku syntezy seskwiterpenów u kręgowców. Kondensacja trzech jednostek C₂ (octanu) prowadzi do powstania jednostki



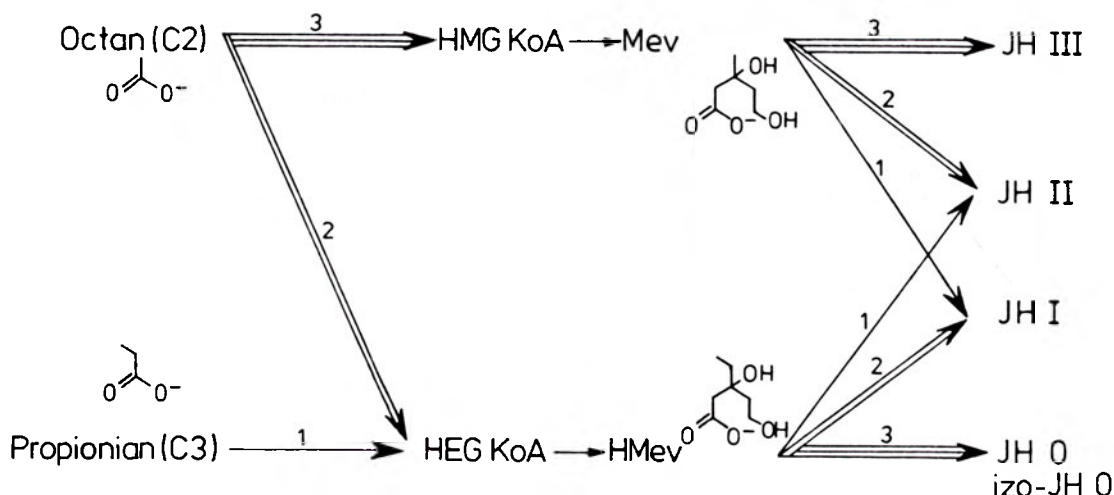
Ryc. 2 Szlak seskwiterpenowy biosyntezy JH III. HMG KoA — 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzym A, PP — pirofosforan.

$C_6:3$ hydroksy-3-metyloglutarylo koenzymu A (HMG-CoA). Fosforylacja a następnie dekarboksylacja poprzedza powstanie jednostki C_5 , pirofosforanu izopentenyłu, która poprzez ciąg reakcji tworzy pięciowęglową jednostkę izoprenoidową. Kondensacja trzech jednostek C_5 prowadzi do powstania pirofosforanu farnezyłu C_{15} (FPP). FPP-cykliczny seskwiterpenoid jest związkiem pośrednim szlaku biosyntezy cholesterolu i innych steroli, seskwiterpenów i trójterpenów [15]. U owadów, pozbawionych zdolności biosyntezy cholesterolu, FPP jest związkiem pośrednim syntezy hormonów juwenilnych. Jednak boczne grupy etylowe szkieletu węglowego, występujące w JH II, JH I, JH 0 i 4-metylo JH I (izo JH 0), jak również grupa metylowa w pozycji 4 ostatniego enencjomeru, są niespotykane w znanych szlakach biosyntezy.

III-2. Szlak homoizoprenoidowy

W badaniach *in vitro* wykazano włączanie [^{14}C]propionianu do JH II u *M. sexta*, natomiast

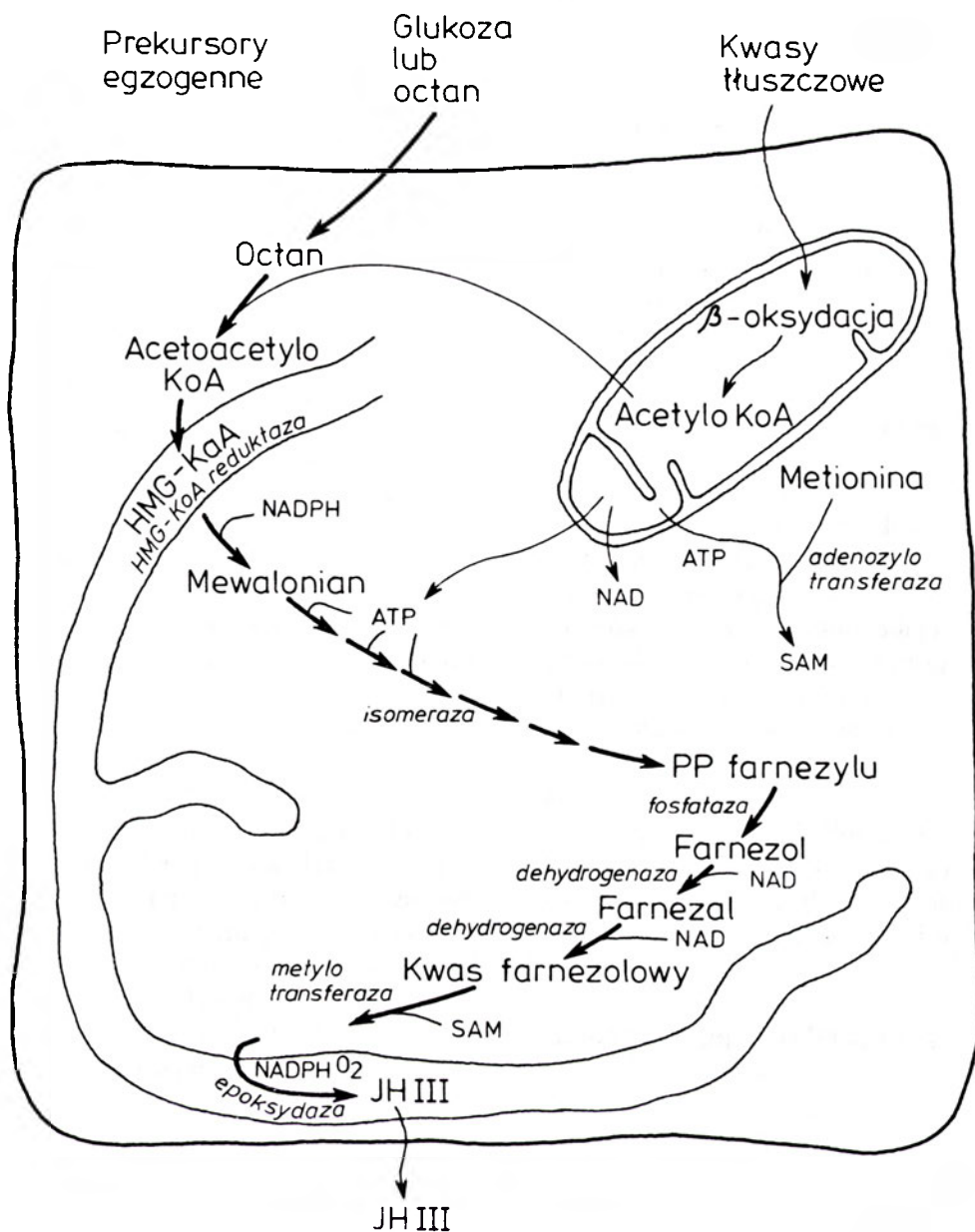
Ryc. 3 Szlak homoizoprenoidowy syntezy hormonów juwenilnych. HMG KoA — 3-hydroksy-3-metyloglutarylo koenzym A, HEG KoA — 3-hydroksy-3-etyloglutarylo koenzym A. Mev — mewalonian, HMev — homomewalonian. Cyframi oznaczono ilość jednostek biorących udział w syntezie różnych produktów.



[^{14}C]octan i [^{14}C]mewalonian wbudowywał się w JH II i JH III. Chociaż nie udowodniono wówczas, że boczny łańcuch JH II pochodzi z propionianu, to dalsze badania wykazały, że tak jest istotnie. Przyjmuje się obecnie, iż JH II powstaje z dwóch jednostek izoprenoidowych i jednej homoizoprenoidowej, natomiast JH I z dwóch jednostek homoizoprenoidowych i jednej izoprenoidowej (Ryc. 3).

Ostatnie reakcje szlaku biosyntezy to hydroliza grupy pirofosforanowej z FPP, utlenianie farnezołu (alkoholu) do farnezyłu (aldehydu) i kwasu farnezolowego; wreszcie estryfikacja i epoksydacja do hormonu.

Kolejność ostatnich dwóch reakcji, wspólnych dla wszystkich form hormonu, zależy od rodzaju owada. Reibstein [16] stwierdził, że epoksy-kwas JH I i JH III są substratami w reakcji o-metylacji u *M. sexta* (*Lepidoptera*). Obie formy kwasów przekształcone zostały w estry w obecności SAM jako dawcy grupy metylowej. U *Orthoptera* i *Dictyoptera* kolejność procesów jest odwrotna — metylacja poprzedza epoksydację. Warto dodać, że CA dorosłych samców *H. cecropia* syntetyzują i wydzielają do hemolimfy JH w formie kwasu, ponieważ nie zawierają o-metylotransferazy. Metylacja przebiega ostatecznie w dodatkowych gruczołach płciowych [16]. Aktywność o-metylotransferazy obserwuje się sporadycznie poza CA u niektórych owadów, np. w płytkach imaginalnych oczu i skrzydeł larw *M. sexta* [17] oraz *G. mellonella* [18].



Ryc. 4 Ciąg reakcji szlaku biosyntezy JH III, zachodzących w cytozolu i endoplazmatycznym retikulum na terenie corpora allata, wg. [15], zmodyfikowane. Egzogenne prekursorsy jak glukoza, octan czy kwasy tłuszczowe wnikają do komórki, dostarczając substratów i związków wysokoenergetycznych, wytworzonych w mitochondriach.

III-3. Enzymy biosyntezy JH

Praktycznie wszystkie badania nad enzymami zaangażowanymi w omawiany cykl przemian wykonano przy użyciu znakowanych substratów i koenzymów. Rycina 4 obrazuje lokalizację komórkową reakcji szlaku biosyntezy JH.

Reakcje enzymów, obecnych we frakcji mikrosomalnej przebiegają w retikulum endoplazmatycznym, natomiast pozostałe zachodzą bądź w organellach komórkowych bądź w cytosolu. Jedynie dwa enzymy szlaku są nierozpuszczalne: są to reduktaza HMG-CoA oraz epoksydaza.

III-3.1. Reduktaza HMG-CoA

Enzym ten badano szczegółowo u kręgowców, zwłaszcza w wątrobie, ponieważ jest enzymem limitującym szybkość biosyntezy cholesterolu i innych steroli. Jest on hamowany zwrotnie zarówno przez cholesterol, jak i inne izoprenoidy na poziomie transkrypcji mRNA, kodującego reduktazę [19]. Badania nad reduktazą HMG-CoA w owadach CA są znacznie mniej zaawansowane. Wiadomo, że aktywność enzymu zależy od fosforylacji — defosforylacji [20], jak u kręgowców. Nie można jednak stwierdzić, czy jest on jedynym enzymem limitującym biosyntezę JH. Zachodzi bowiem prawdopodobieństwo, że reduktaza HMG-CoA regulowana jest przez związki pośrednie końcowych etapów biosyntezy JH.

III-3.2. Epoksydaza (monooksygenaza)

U owadów, podobnie jak u kręgowców, epoksydaza związana jest z błonami retikulum endoplazmatycz-

nego [21]. Współdziała ona z cytochromem P-450 i wymaga NADPH jako koenzymu. Odznacza się ponadto niską specyficznością i odgrywa rolę w toksycznym działaniu prekocenu w CA. Prekoceny (produkty pochodzenia naturalnego wywołujące przedwczesną metamorfozę), inkubowane *in vitro* z CA *L. migratoria* mogą stanowić substrat zastępczy epoksydazy JH [22]. Powstające w wyniku reakcji pochodne epoksydowe prekocenów są wysoce toksyczne dla owada — hamują epoksydazę oraz alkilują inne składniki komórki.

III-3.3. o-metylotransferaza

Metylowa reszta estru, obecna we wszystkich JH, jest ugrupowaniem rzadko spotykanym wśród produktów naturalnych. Doświadczenia *in vivo* nad biosyntezą JH i przy użyciu znakowanej grupy metylowej metylo [¹⁴C] lub [³H] metioniny u dorosłych samców *H. cecropia* wykazały obecność piętna jedynie w grupie metylowej estru. Nie obserwowano żadnego włączenia radioaktywności do seskwiterpenowego szkieletu węglowego, o-metylotransferaza z gruczołu dodatkowego samców *H. cecropia* jest enzymem rozpuszczalnym, obecnym w komórkach nabłonka, wysoce specyficznym [8]. o-metylotransferaza z CA *L. migratoria* wykazuje niewielką specyficzność substratową, współdziała również z SAM jako kofaktorem [22].

IV. Metabolizm JH i produkty jego degradacji

Katabolizm JH zachodzi w hemolimfie lub w tkankach docelowych [23, 24]. Opisano dwa główne szlaki degradacji JH: hydrolizę estru oraz hydratację wiązania epoksydowego. Produktami tych reakcji są odpowiednio JH-kwas i JH-diol, które ulegają następnie przemianom katabolicznym, sprzęgane z siarczanami i wydalane z organizmu.

IV-1. Hydratacja reszty epoksydowej

Opisane dwa mechanizmy metabolizmu reszty epoksydowej JH: sprzężenie z glutationem oraz hydratację, czyli dołączenie cząsteczki wody do reszty epoksydowej z wytworzeniem 1, 2-diolu lub glikoli. Enzymem katalizującym ostatnią reakcję jest hydrolaza epoksydowa (E.C.3.3.2.3.), scharakteryzowana dobrze u ssaków, znacznie słabiej u owadów. Wydaje się że hydratacja epoksydu odgrywa istotną rolę w metabolizmie JH *S. bullata*. U *M. domestica* jej rola jest porównywalna z rolą szlaku deestryfikacji, a u *M. sexta* jest ona mało istotna [25]. Substratami użytymi jako związki modelowe w badaniu tej aktywności enzymatycznej są: styren, 1, 2-oksystyren, okten oraz juwenoidy zawierające grupę epoksydową, rzadziej związki naturalne — JH czy JH-kwas. Aktywność hydrolazy epoksydowej znaleziono w tkankach owa-

dzich we frakcji mikrosomalnej lub związanej z błonami.

Nie stwierdzono obecności hydrolazy epoksydowej w hemolimfie, natomiast obecna jest ona w różnych tkankach owadów jak jelito środkowe, ciało tłuszczowe czy płytki imaginalne [26]. Aktywność enzymu badano w rozwoju osobniczym kilku owadów. Wydaje się, że w początkowej fazie przemian rolę główną odgrywa hydroliza estru JH następnie zaś rolę tę przejmuje hydrolaza epoksydowa, preferująca jako substrat JH-kwas a nie JH [27]. Brak danych dotyczących oczyszczonego enzymu utrudnia ocenę roli i znaczenia hydrolazy epoksydowej w metabolizmie JH.

IV-2. Hydroliza estru

Hydroliza jest głównym i najlepiej zbadanym szlakiem degradacji JH [28, 29]. Esterazy degradujące JH lub jego analogi występują głównie w hemolimfie i ciele tłuszczowym [30], choć scharakteryzowano również esterazy tkankowe metabolizujące JH [31]. Cechą charakterystyczną esteraz JH jest specyficzność substratowa, która zmienia powinowactwo enzymu w zależności od charakteru grupy estrowej oraz długości łańcucha węglowego substratu [31].

Esterazy JH określono jako „specyficzne”, tj. hydrolizujące zarówno wolny JH jak i związany z białkiem przENOśnikowym, oraz „niespecyficzne” — aktywne jedynie wobec hormonu wolnego. Ponieważ stężenie białek transportujących przewyższa w hemolimfie o dwa rzędy wielkości stężenie hormonu, występuje on praktycznie w formie związanej z białkiem i co za tym idzie może być rozkładany wyłącznie przez esterazy specyficzne.

IV-3. Utlenianie

Uważa się, że utlenianie JH jest mało istotnym szlakiem katabolicznym [31]. Tym niemniej wielofunkcyjna oksydaza może odgrywać pewną rolę w metabolizmie JH, wpływając na regulację poziomu hormonu.

V. Rola JH w regulacji funkcji komórkowych

U owadów transport hormonów z miejsca syntezy do tkanek docelowych zachodzi w hemolimfie przy udziale białek wiążących, które utrzymują również określone miano hormonów w różnych stanach fizjologicznych. Funkcje białek wiążących określić można następująco:

- ochrona hormonów przed enzymatyczną degradacją,
- ograniczenie niespecyficznych oddziaływań i niespecyficznego wiązania,
- utrzymywanie określonej zawartości hormonu, który może być pobierany przez tkanki docelowe.

Białka wiążące hormon z wysokim powinowactwem (o M_r około 30 000) występują w hemolimfie owadów wielu gatunków [32, 33]. Drugą grupę stanowią lipoproteiny (dominująca klasa białek hemolimfy) o M_r powyżej 100 000 [34]. Wykazano, że kompleks hormon-lipoproteina jest zasadniczą formą przenoszenia JH [35].

V-1. Tkanki w rozwoju osobniczym

Hormon juwenilny reguluje wiele złożonych zjawisk fizjologicznych, takich jak rozwój, rozmnażanie czy zachowanie. JH wpływa hamująco na rozwój, utrzymując ściśle określoną długość trwania kolejnych stadiów rozwojowych oraz diapauzy. Obok działania hamującego, JH stymuluje również rozwój jajników i syntezę w ciele tłuszczowym witellogenin [36] i reguluje ich wchłanianie przez oocyty. JH wpływa również na wytwarzanie feromonów [37] i syntezę barwników.

Najlepiej poznany i opisany zjawiskiem regulowanym przez JH jest rozwój i różnicowanie komórek epidermy [38]. Efekt działania hormonu widoczny jest krótko przed linką, kiedy to komórki epidermy tworzą nową warstwę kutikuli. U większości owadów holometabolicznych, które charakteryzuje cykl rozwojowy z przeobrażeniem zupełnym, obecność JH w czasie trwania stadium larwalnego powoduje tworzenie kutikuli larwalnej, podczas gdy nieobecność hormonu prowadzi do wytworzenia kutikuli poczwarkowej.

Płytki imaginalne — wpuklenia komórek epidermy, które stanowią zaczątek kutikuli poczwarkowej oraz dorosłego owada, w stadium larwalnym nie ulegają różnicowaniu a jedynie podziałom komórkowym. Przyjmuje się, że JH odpowiedzialny jest za brak różnicowania tej tkanki w okresie larwalnym [39].

U przedstawiciela *Lepidoptera* — *B. mori* w gruczole przednim, który jest zmodyfikowanym gruczołem śliniankowym, snucie jedwabiu kontrolowane jest hormonalnie [40]. Podanie JH w początkowej fazie ostatniego okresu larwalnego powoduje spowolnienie procesów replikacji, transkrypcji i translacji w gruczole przednim a w konsekwencji wydłużenie stadium larwalnego i wzrost produkcji jedwabiu o około 30%.

V-2. Diapauza

JH odgrywa istotną rolę w regulacji diapauzy, czyli okresowego przerwania rozwoju osobniczego owada. Diapauza może występować w każdym ze stadiów rozwojowych owadów.

U *D. grandiosella* w diapauzie larwalnej obserwowano wysokie miano JH w hemolimfie i aktywność gruczolów syntetyzujących ten hormon. JH może zapobiegać diapauzie poczwarkowej, natomiast diapauzę imaginalną wywołać można przez usunięcie CA, syntetyzujących JH u niediapauzujących form *L. decemlineata* [41].

V-3. Metabolity

JH wpływa na metabolizm oddechowy zwiększając wielokrotnie zużycie tlenu (tzw. hipermetabolizm). Efekt ten może mieć związek ze zmianami w metabolizmie lipidów, szczególnie ich syntezie.

Opisane funkcje JH omawiano w wielu pracach przeglądowych [42], jednak niewiele wiadomo o mechanizmie tych efektów, głównie z powodu trudności w interpretacji wyników badań *in vivo*. Powszechnie stosowany układ modelowy polega na podaniu badanemu owadowi egzogenego JH lub jego analogu. Wiadomo jednak, że tak podany JH współdziałać może z innymi hormonami owadzimi jak ekdyzon czy neurohormony, może być raptownie metabolizowany, a także może działać jako produkt hamujący zwrotnie w cyklu przemian endokrylnych.

Efekt działania każdego hormonu determinują trzy czynniki:

- stężenie krążącego w organizmie hormonu, tzn. jego miano,
- oddziaływanie między hormonem a receptorami komórkowymi,
- regulacja przez hormon lub kompleks hormon-receptor podstawowych procesów takich jak transkrypcja, translacja lub inne w komórkach docelowych.

Niewiele jak narazie wiadomo jest na temat oddziaływań wymienionych w pp. 2 i 3, natomiast ostatnie dziesięciolecie przyniosło wiele informacji dotyczących syntezy i uwalniania JH przez corpora allata aktywności esteraż, degradujących JH w hemolimfie, dostępności białek przenośnikowych, pobierania hormonu przez tkanki, katabolizmu i wydzielania.

V-4. Mechanizm działania na poziomie komórkowym

Regulacja przez hormon lub kompleks hormon-receptor podstawowych procesów w komórkach docelowych na poziomie transkrypcji czy translacji nie jest jasna. W przeciwieństwie do białek wiążących z hemolimfy, komórkowe receptory JH nie zostały dostatecznie scharakteryzowane, a ich rola, lokalizacja, podobnie jak mechanizm działania samego JH pozostają ciągle w sferze hipotez.

Opisano białka o cechach receptora hormonu w komórkach embrionalnych *Drosophila* [43], w komórkach epidermy *D. hydei* [44], w ciele tłuszczowym [45-47] *L. migratoria*. Charakteryzują się one niską stałą dysocjacji ($10^{-7} - 10^{-9} M$) i preferencją oddziaływania z homologami JH, charakterystycznymi dla fazy rozwoju i tkanek owadów, u których występują. Powyższe informacje dotyczą wyłącznie białek cytosolowych. Postulowane miejsca wiązania JH na terenie jądra nie zostały udowodnione. Z prac W y a t t a [48] wynika, że stymulacja ciała tłuszczowego metoprenem, aktywnym analogiem JH nie ulegającym degradacji powoduje syntezę *de novo* oraz nagromadzenie witel-

logeninowego mRNA. Także Riddiford [49] opisała efekt JH w komórkach epidermy sugerujący regulację transkrypcji specyficznych genów. Scharakteryzowano również kinetykę wiązania JH w jądrach komórek epidermy [50] oraz białka jądrowe o charakterze receptora JH z tej samej tkanki [51].

Wysunięto hipotezę, że mechanizm działania JH może być podobny do oddziaływania hormonów sterydowych, które w kompleksie hormon-receptor łączą się ze specyficzną sekwencją DNA obszaru regulatorowego, powyżej genu odpowiadającego na bodziec hormonalny [52]. W jądrach komórkowych ciała tłuszczowego *M. bivittatus* [53] stwierdzono wiązanie znakowanego JH III we frakcji białek, ekstrahujących się 0,3 M KCl. Pozostałe 75% znakowanego JH III pozostawało w osadzie jąder z pewną ilością hormonu zaadsorbowanego na błonie jądrowej lub w materiale mikrosomalnym. Nadal jednak brak jest przekonujących dowodów na oddziaływanie hipotetycznego receptora JH z chromatyną lub konkretnym genem.

Artykuł otrzymano 15 lutego 1991 r.

Zaakceptowano do druku 21 maja 1991 r.

Piśmiennictwo

- Klimaszewski S.M., (1973), *Świat owadów*. P. W. Wiedza Powszechna, Warszawa.
- Laufer H., Borst D., Baker F.C., Carrasco C., Sinkus M., Reuter C.C., Tsai L.W., Schooley D.A., (1987), *Science* **235**: 202-205.
- Toong Y.C., Schooley D.A., Baker F.C., (1988), *Nature* **333**: 170-171.
- Schooley D.A., Baker F.C., (1985), W Kerkut G.A., Gilbert L.J. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t. 7, Pergamon Press, New York str. 363-389.
- Tobe S.S., Stay B., (1985), *Adv. Insect. Physiol.* **18**: 305-432.
- Tobe S.S., Pratt G.E., (1975), *Life Sci.* **17**: 417-422.
- Baker F.C., Schooley D.A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta.* **664**: 356-372.
- de Kort C.A.D., Granger N.A., (1981), *Ann. Rev. Ent.* **26**: 1-2.
- Hsiao T.H., Hsiao C., (1977), *J. Insect. Physiol.* **23**: 89-93.
- Granger N.A., Goodman W.G., (1983), *Insect. Biochem.* **13**: 333-340.
- Rembold H., Lackner B., (1985), *J. Chromatogr.* **323**: 355-361.
- Lanzrein B., Gentinetta V., Abegglen H., Baker F.C., Miller C.A., Schooley D.A., (1985), *Experientia* **41**: 913-917.
- de Kort C.A.D., Koopmanschap A.B., Strambi C., Strambi A., (1985), *Insect. Biochem.* **15**: 771-775.
- Sehnal F., Rembold H., (1985), *Experientia* **41**: 684-685.
- Tobe S.S., Feyereisen R., (1983), W Downer R.G.H., Laufer H. (red.) *Endocrinology of Insects*, Liss Inc., New York str. 161-178.
- Reibstein D., Law J.H., Bowlus S.B., Katzenellenbogen J.A., (1976), W Gilbert L.I. (red.) *The Juvenile Hormones*. Plenum Press. New York str. 131-146.
- Sparagana S.P., Bhaskaran G., Dahm K.H., Riddle U., (1984), *J. Exp. Zool.* **230**: 309-313.
- Sparagana S.P., Bhaskaran G., Barrera P., (1985), *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **2**: 191-202.
- Brown M.S., Goldstein J.L., (1980), *J. Lipid. Res.* **21**: 505-517.
- Lusky K.L., Faust J.R., Chin D.J., Brown M.S., Goldstein J.L., (1983), *J. Biol. Chem.* **258**: 8462-8469.
- Monger D.J., Law J.H., (1982), *J. Biol. Chem.* **257**: 1921-1923.
- Pratt G.E., Jennings R.C., Hamnett A.F., Brooks G.T., (1980), *Nature* **284**: 320-323.
- Wing K.D., Sparks T.C., Lovell V.M., Levinson S.O., Hammock B.D., (1981), *Insect. Biochem.* **11**: 473-485.
- McCaleb D.C., Reddy G., Kumaran A.K., (1980), *Insect. Biochem.* **10**: 273-277.
- Hammock B.D., (1985), W Kerkut G.A., Gilbert L.J. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t. 7 Pergamon Press, New York str. 431-472.
- Slade M., Hetnarski H.K., Wilkinson C.F., (1976), *J. Insect. Physiol.* **22**: 629-622.
- Yu S.J., Terriere L.C., (1978), *Insect. Biochem.* **8**: 349-352.
- Jones D., Jones G., Wing K.D., Rudnicka M., Hammock B.D., (1982), *J. Comp. Physiol.* **148**: 1-10.
- Wozniak M., (1989), Rola esteryzacji hormonu juwenilnego w regulacji rozwoju owadów. Rozprawy Habilitacyjne Akademii Medycznej we Wrocławiu, Wrocław.
- Mitsui T., Riddiford L.M., Bellamy G., (1979), *Insect. Biochem.* **9**: 637-643.
- Goodman W.G., Chang E.S., (1984), W Kerkut G.A., Gilbert L.I. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t. 7 Plenum Press, New York str. 491-510 wyd. Kerkut G.A., Gilbert L.I., Pergamon Press New York.
- Lenz C.J., Dillwith J.W., Chippendale G.M., (1986), *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **3**: 61-73.
- Ożyhar A., Kochman M., (1987), *Europ. J. Biochem.* **162**: 675-682.
- Van Mellaert H., Theunis S., De Loof A., (1985), *Insect. Biochem.* **15**: 655-661.
- Kramer K.J., Dunn P.E., Peterson R.C., Law J.H., (1976), W Gilbert L.I. (red.) *The Juvenile Hormones*. Plenum Press. New York str. 327-341.
- Bradfield J.Y., Berlin R.L., Keeley L.L., (1990), *Insect. Biochem.* **20**: 105-111.
- Cusson M., McNeil J.N., (1989), *Science* **243**: 210-212.
- Riddiford L.M., (1985), W Kerkut G.A., Gilbert L.J. (red.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* t. 8 Pergamon Press, str. 37-84.
- Riddiford L.M., (1986), *Arch. Insect. Biochem. Physiol. Supl.* **1**: 75-86.
- Garel J.P., (1983), *Experientia* **39**: 461-466.
- Cymborowski B., (1984), W *Endokrynologia owadów*, wyd. PWN, Warszawa str. 164-184.
- Laufer H., Borst D.W., (1983), W Downer R.G.H., Laufer H. (red.) *Endocrinology of Insects* Liss Inc., New York str. 203-216.
- Chang E.S., Condron T.A., Bruce H.J., Sage B.A., o Connor J.D., Law J.H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **7**: 4657-4661.
- Klages G., Emmerich H., Peter M.G., (1980), *Nature* **286**: 282-285.
- Engelman F., Mala J., Tobe S.S., (1987), *Insect. Biochem.* **17**: 1045-1052.
- Shemshedini L., Lanoue M., Wilson T.G., (1990), *J. Biol. Chem.* **265**: 1913-1918.
- Roberts P., Wyatt G.R., (1983), *Mol. Cell Endocrinol.* **31**: 53-69.
- Wyatt G.R., (1988), *Can. J. Zool.* **66**: 2600-2610.
- Riddiford L.M., (1986), *Arch. Insect. Biochem. Physiol. Supl.* **1**: 75-86.
- Osir E.O., Riddiford L.M., (1988), *J. Biol. Chem.* **263**: 13812-13818.
- Palli S.R., Osir E.O., Eng W.S., Boehm M.F., Edwards M., Kulcsar P., Ujvary I., Hiruma K., Prestwich G.D., Riddiford L.M., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 796-800.
- Pongs O., (1988), *Europ. J. Biochem.* **175**: 199-204.
- Roberts P.E., Jefferies L.S., (1986), *Arch. Insect. Biochem. Physiol. Supl.* **1**: 7-23.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne ogłasza konkurs na najlepszy wykład akademicki

Regulamin nagrody

1. Intencją Nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1992 r.
3. Przewidziana jest Nagroda Główna w wysokości **3 milionów złotych** (w 1992 r.) oraz dwa wyróżnienia. Środki finansowe na Nagrodę zapewnia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
4. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut.
5. Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postęпах Biochemii” oraz w „Listach”.
6. Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.
7. Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku i wchodzi w życie z dniem uchwalenia.

W 1992 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

Z okazji Nowego Roku

naszym czytelnikom, autorom i sympatykom

*życzymy sukcesów zawodowych,
naukowych i osobistych.*

Redaktor naczelny Zofia Zielińska

Prezes P. T. Bioch. Zofia Porembska



SPRAWOZDANIE

z Międzynarodowej Zimowej Szkoły FEBS/EMBO na temat: „Strukturalne i Motoryczne Białka Jądra i Cytoplazmy” (“Structural and Motile Proteins of the Nucleus and Cytoplasm”, (Schladming, Austria, 18-22 marca, 1991 r.)

Szkoła zorganizowana została przez Dr J. V. S m a l l a z Instytutu Biologii Molekularnej Austriackiej Akademii Nauk w Salzburgu i zgromadziła 120 naukowców z krajów europejskich i USA. Sesje poranne i wieczorne poświęcone były wykładom, natomiast środek dnia sesjom plakatowym oraz rekreacji.

Problematyka zjazdu obejmowała zagadnienia dotyczące struktury białek cykoszkieletowych i białek odpowiedzialnych za różne aspekty ruchliwości komórkowej, a także budowy cytoszkieletu, jego reorganizacji i mechanizmów regulacji tego procesu podczas lokomocji komórek, kariokinezy, cytokinezy, transportu organelli, adhezji, funkcjonalnej polaryzacji komórek.

Szczególnie dużo uwagi poświęcono tzw. białkom motorycznym, odpowiedzialnym za występowanie zjawisk ruchliwości komórkowej zachodzących kosztem energii wiązań fosfodiesterowych ATP.

Dotychczas scharakteryzowano trzy cytoplazmatyczne białka motoryczne: miozynę, dyneinę oraz kinezynę. Miozyna aktywowana jest przez mikrofilamenty (filamenty aktynowe), a dyneina i kinezyna przez mikrotubule. Oddziaływanie tych filamentowych struktur z białkami motorycznymi, sprzężone z hydrolizą ATP, prowadzi do zmiany energii chemicznej zmagazynowanej w białku motorycznym o zmienionej konformacji w energię mechaniczną. Ilustracją tego procesu *in vitro* jest przesuwanie filamentów aktynowych lub mikrotubul po powierzchni szklanej, na której zaadsorbowano odpowiednie białko motoryczne. Ostatnio podkreśla się również aktywną rolę samych mikrofilamentów i mikrotubul w generacji ruchu ich dynamiczne właściwości zmieniają się w wyniku hydrolizy związanych z nimi nukleotydów (ATP i GTP).

Układ aktynowo-miozynowy wydaje się odpowiadać za lokomocję komórek, tworzenie pierścienia podziałowego podczas cytokinezy, utrzymywania napięcia w tzw. włóknach naprężeniowych i mikrokosmkach jelitowych, podczas gdy układy dyneino-tubulinowy i kinezynowo-tubulinowy odgrywają główną rolę w transporcie organelli, a także w segregacji chromosomów podczas mitozy. Podobnie jak

w przypadku miozyny, tylko globularna część cząsteczki dyneiny i kinezyny (tzw. główki) wystarcza do generacji ruchu. W domenie motorycznej dyneiny znajduje się też prawdopodobnie ośrodek dyspozycyjny określający kierunek ruchu organelli wzdłuż mikrotubul. Wiadomo np., że dyneina bierze udział w wstecznym transporcie pęcherzyków z synapsy do centrum aksonu nerwowego, podczas gdy kinezyna transportuje je w kierunku odwrotnym. Ostatnio wykryto całą rodzinę motorycznych białek homologicznych z kinezyną, a także nowe białko motoryczne specyficzne dla tkanki nerwowej, nazwane dynaminą, które również współdziała z mikrotubulami. Mikrofilamenty i mikrotubule, wraz z filamentami pośrednimi, spełniają ponadto statyczną, szkieletową funkcję w utrzymaniu kształtu i asymetrii komórki. Do wypełniania tej roli przyczyniają się liczne białka wiążące mikrofilamenty i mikrotubule modulujące stan ich organizacji, a także łączące ze sobą wszystkie wymienione rodzaje struktur filamentowych.

Badania cytoszkieletu, podobnie jak badania w wielu innych dziedzinach biologii, możliwe są tylko przy użyciu różnych technik. Szkoła była doskonałą okazją spotkania się wszystkich zainteresowanych różnymi zjawiskami ruchliwości komórkowej, głównie biochemików oraz biologów komórki pracujących technikami mikroskopowymi. Autorzy niniejszego sprawozdania, zajmujący się głównie zależnością funkcji od struktury białek, odnotowali coraz powszechniejsze zastępowanie wielu tradycyjnych technik biochemicznych — takich jak np. ograniczona proteoliza i izolowanie poszczególnych fragmentów białkowych, czy identyfikacja regionów odpowiedzialnych za aktywność białka poprzez modyfikowanie poszczególnych reszt aminokwasowych — technikami biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, czyli konstruowaniem mutantów delecyjnych i ukierunkowaną mutagenезą, a następnie ekspresją produktów zmodyfikowanych genów w organizmach prokariotycznych.

**Robert Makuch,
Renata Dąbrowska**

Działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w roku 1991

Władze Towarzystwa

1. Zarząd Główny

Prezydium:

prezes — prof. Zofia Porembka
wiceprezes — prof. Tadeusz Wilkusz
sekretarz — prof. Kazimierz Zakrzewski
członkowie Z. Gł.: doc. Andrzej Guranowski
prof. Maria Gumińska
doc. Jacek Kuźnicki
dr Michał Komoszyński
doc. Henryk Kostyra
prof. Wiesław Makarewicz
doc. Roman Tarnawski
doc. Maria Wojtaś-Wasilewska
dr Teresa Wesołowska
prof. Zofia Walter
prof. Marian Wolny
prof. Krzysztof Zwierz
prof. Mariusz Żydowo
skarbnik — dr Ewa Wieniawska-Szewczyk

2. Komisja Rewizyjna:

przewodniczący — doc. Bogdan Sieliwanowicz
członkowie — doc. Wirginia Janiszowska
dr Lidia Paś-Dzięgielewska

3. Przewodniczący oddziałów terenowych:

Białystok — prof. Krzysztof Zwierz
Gdańsk — prof. Wiesław Makarewicz
Katowice — doc. Roman Tarnawski
Kraków — prof. Zdzisław Żak
Lublin — doc. Marta Stryjecka-Zimmer
Łódź — dr hab. Stanisław Bielecki
Olsztyn — prof. Władysław Damicz
Poznań — prof. Witold Walerych
Szczecin — dr Teresa Wesołowska
Toruń — dr Antoni Leźnicki
Warszawa — prof. Magdalena Fikus
Wrocław — doc. Maria Malicka-Błaszkiwicz

Zarząd Główny przy współpracy z Zarządami Oddziałów prowadził działalność statutową poprzez Komisje i Zespoły powołane do zadań szczegółowych. Jak co roku, w 1991 odbyły się cztery plenarne posiedzenia Zarządu Głównego z udziałem przedstawicieli Oddziałów. Dyżury członków Prezydium odbywały się we wtorki w biurze Zarządu Głównego, w budynku Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, przy ulicy Freta 16 w Warszawie. Kierownikiem biura Zarządu Głównego jest mgr Irena Kamińska.

Ważniejsze Uchwały organów Statutowych Towarzystwa

1. Regulamin przyjmowania studentów w poczet członków Towarzystwa.
2. Podwyższenie rocznej składki członkowskiej z 30 000 do 40 000 zł.

Działalność organizacyjno-naukowa Towarzystwa

1. Doroczny Zjazd, sesje i konferencje:
 - XXVII Zjazd Towarzystwa odbył się w dniach 18-20 września br. w Lublinie, z udziałem około 300 uczestników z kraju i 10 zaproszonych gości z zagranicy. Obrady odbyły się w ramach 6 sympozjów pt.
 - Molekularna regulacja procesów wzrostu i różnicowania komórek somatycznych,
 - Procesy biotechnologiczne w produkcji żywności i ochrony środowiska,
 - Toksyczne oddziaływanie czynników środowiska na organizmy żywe,
 - t-RNA i syntetazy aminoacylo-tRNA,
 - Patobiochemia tkanki łącznej,
 - Metabolizm wapnia.

Przedstawiono 25 referatów sympozjalnych i 374 doniesienia. W zorganizowanej po raz pierwszy sesji polsko-francuskiej, poświęconej metabolizmowi wapnia wzięło udział 7 gości z Francji i 1 z Holandii. Spotkanie i dyskusje naukowe zaowocowały nawiązaniem współpracy pomiędzy placówkami polskimi a francuskimi i holenderskimi. Postanowiono także organizować corocznie podobne konferencje. Najbliższe, poświęcone „Regulacji transportu jonów w tkankach roślin i zwierząt” zamierzamy zorganizować w maju 1992 roku.

- Dwudniowa konferencja pt. *Clinical Biochemistry in Renal Diseases* została zorganizowana w dniach 5-6 września, w Gdańsku, z udziałem zagranicznych gości przez sekcję Biochemii Klinicznej Towarzystwa. Przedmiotem doniesień i dyskusji była patologia i biochemia filtracji kłębkowej, patochemia cewek i metody diagnozowania.
- Uroczyste posiedzenie poświęcone pamięci profesora Włodzimierza Mozołowskiego zostało zorganizowane 23 maja 1991 r. w Gdańsku przez Katedrę Biochemii Akademii Medycznej i miejscowy Oddział Towarzystwa.
- Prace nad zorganizowaniem XXVIII Zjazdu Towarzystwa w Łodzi w 1992 roku zostały rozpoczęte. Przewidywany termin Zjazdu: 16-18 września.
- Konferencja pt.: *Immunologiczne właściwości glikoprotein* przewidziana jest we Wrocławiu we wrześniu 1992 r.

Konkursy i nagrody Towarzystwa

1. Przeprowadzono konkurs na najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład akademicki z dziedziny biochemii i biologii molekularnej. Jury, składające się ze specjalistów z dziedziny nauk biologicznych i medycznych, nagrodziło wykład nt: „Synteza, sekrecja i mechanizm działania insuliny”.
2. Przyznano nagrody imienia profesora Jakuba Karola Parnasa za najlepszą pracę doświad-

czalną wykonaną w kraju i ogłoszoną w 1990 roku, nagrodę imienia profesora Bolesława Skarzyńskiego za najlepszy artykuł opublikowany w „Postęпах Biochemii” w 1990 roku, oraz nagrodę imienia profesora Włodzimierza Mozołowskiego, za najlepsze i dobrze przedstawione doniesienie podczas XXVII Zjazdu Towarzystwa w Lublinie.

Działalność wydawnicza

1. „Postępy Biochemii” — kontynuowano w ubiegłym roku politykę wydawniczą. Opublikowano czekające na publikację artykuły w tomie 36 i pierwszych dwóch zeszytach tomu 37 „Postępów Biochemii”, zeszyt podwójny 3-4 37 przynosi już na ogół prace nadesłane w bieżącym roku. Opublikowano także w języku angielskim dwa mini-reviews, przedstawiające interesujące badania wykonane w kraju przy współpracy z placówkami zagranicznymi; wydrukowano doraźnie opracowane materiały pt. „Leksykon terminów biochemicznych”, przewidując nowe propozycje i uwagi czytelników, które pozwolą na uzupełnienie haseł i ewentualną weryfikację definicji.
2. „Listy do Członków” — wychodzące systematycznie, informują członków Towarzystwa o wydarzeniach naukowych w środowisku biochemicznym.

3. Jako pomoce naukowe do wykładów z biochemii przygotowano dwa tematy:
 - maszynopisy i rysunki do przezroczy:
 - „Budowa i funkcje błon biologicznych”
 - „ATPazy — budowa i funkcje”Przewidujemy wydawanie kolejnych skryptów przydatnych do wykładów.
4. Przygotowano materiały pt.: „Pytania testowe z biochemii dla studentów medycyny”. Przewiduje się ukazanie ich drukiem w roku przyszłym.

Działania w zakresie upowszechniania nauki

1. Sesja poświęcona popularyzacji biologii molekularnej pt. „Co nowego w biochemii komórki”, organizowana przez Warszawski Oddział P. T. Bioch., Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, Instytut Biochemii i Biofizyki i Instytut Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego, odbędzie się 27 listopada w Warszawie.
2. Zorganizowano w Warszawie kurs w zakresie fizyki, chemii i biologii dla kandydatów zamierzających ubiegać się o indeks w roku 1992 na wydziały o profilu biologicznym. Początek zajęć 12 października 1991 r.
3. Przygotowano sesję pt. „Organizacja genomu” dla nauczycieli szkół średnich województwa warszawskiego — odbędzie się ona w listopadzie br.

Zofia Poremska

Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznane w 1991 roku

1. Nagroda za najlepszy wykład akademicki z biochemii pt.
„Synteza, sekrecja i mechanizm działania insuliny”
JERZY ROGULSKI,
profesor w Akademii Medycznej w Gdańsku
2. Nagroda imienia Jakuba Karola Parnasa za opublikowaną w „Biochimica et Biophysica Acta” 1048, 93-99, 1990 r. najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w kraju pt.
„Isolation and nucleotide sequence analysis of the rat testis specific major heat-shock protein (HSP70) — related gene”
JAN WIŚNIEWSKI,
TOMASZ KORDULA,
ZDZISŁAW KRAWCZYK,
adiunkci w Centrum Onkologii w Gliwicach
3. Nagroda imienia Bolesława Skarzyńskiego za opublikowany w „Postęпах Biochemii” w 1990 roku najlepszy artykuł pt.
„Rola białek szoku termicznego”
BARBARA LIPIŃSKA,
adiunkt w Uniwersytecie Gdańskim
4. Nagroda imienia Włodzimierza Mozołowskiego za przedstawione podczas XXVII Zjazdu Towarzystwa w konkursie młodych biochemików najlepsze doniesienie pt.
„Struktura U5 snRNA z lubinu białego”
JACEK KRAJEWSKI,
asystent w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu



Profesor Jerzy Rogulski otrzymuje nagrodę z rąk Prezesa Towarzystwa

Komunikat



Uprzejmie komunikujemy, że od stycznia 1992 roku **Acta Alimentaria Polonica** będą wydawane i kolportowane przez Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN w Olsztynie pod zmienionym tytułem jako: **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**.

Korespondencję i zapytania prosimy kierować pod adresem: Zakład Nauki o Żywności, Centrum Agrotechnologii i Weterynarii PAN, ul. Heweliusza 8, 10-718 Olsztyn-Kortowo, skr. pocz. 55; tel. 278-922, 278-577; tlx 522-621; fax (89) 278-992.

Wyrażamy nadzieję, że zmiana tytułu wzbudzi zainteresowanie Państwa i będzie przyjęta zyczliwie.

Redakcja

Stacja Naukowa PAN
w centrum Wiednia
ma 1 i 2-osobowe pokoje
z kuchnią i łazienką.
Tanio, wygodnie i przyjemnie!
1030 Wien Boerhaavegasse 25
Tel. 713 59 29 lub 713 03 831
Fax 713 03 838



ORDER FORM

ISSN 0032-5422

- Please enter my subscription for 1992 at: institutional rate US \$ 60 or personal rate US \$ 30 (including postage and handing)
- I enclose my cheque (bank draft) for US \$
- I am interested in receiving further information (a free sample) copy of „Postępy Biochemii”

NAME:
Address:

POSTAL CODE: DATE

Cheques should be made payable or remittance transferred to:

Polish Biochemical Society
16 Freta Street, 00-227 Warszawa
Bank Handlowy, PBK XIII O Warszawa
37 00 44 — 1225 — 139 — 11

Send orders to:
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Odcinek dla poczty lub banku

zł

słownie

wpłacający

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł.

podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.

podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.

podpis przyjmującego



praca - employment

Dr Brett Hambly z Uniwersytetu w Sydney, w Zakładzie Anatomii, poszukuje współpracownika ze stopniem doktora. Wymagana jest znajomość biochemii hodowli bakterii i biologii molekularnej.

Tematyka:

Ekspresja genów białek mięśniowych w bakteriach.

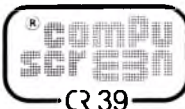
Kontakt dr K. Turlejski,

Dept. of Anatomy, University of Sydney,

N. S. W. 2006, Australia,

fax. 61 255 22 026.

Okulary ochronne firmy PEROCCHI



- maksymalna ochrona oczu przed szkodliwym działaniem monitora komputerowego i telewizyjnego
- włoskie wzornictwo i styl

W okularach i nasadkach na okulary optyczne COMPU SCREEN zastosowano specjalny typ filtrów powstrzymujących przenikanie promieni ultrafioletowych w szerokim paśmie 280—380 nm. Dzięki temu intensywna i długotrwała praca przy komputerze NIE POWODUJE: zmęczenia wzroku, utraty ostrości widzenia, zaczerwienienia i opuchlizny oczu.

Zamówienia przyjmuje firma PEROCCHI
04-141 Warszawa, skr. poczt. 5
Informacja handlowa:
Warszawa, ul. Francuska 16A tel. 17-98-05

Eighth International Symposium on Calcium-Binding Proteins in Health and Disease 23-27 August 1992 Davos-Switzerland

Institute of Biochemistry
Swiss Federal Institute of Technology (ETH)
8092 Zurich, Switzerland
Tel. 01-256 30 12
Fax. 01-252 63 23

Wydawca prosi o kontakt tych, którzy chcieliby wykorzystać łamy „Postępy Biochemii” do reklamowania swych produktów i usług związanych z biochemią, biologią molekularną i biologią komórki.

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

imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu wraz z kodem pocztowym (DRUKOWANYMI LITERAMI) na wszystkich trzech odcinkach przekazu.

Prenumerata krajowa dla instytucji:
270 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
120 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii” wspierasz swoje czasopismo!

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

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

ILUSTRACJE: Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „gó-ra-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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



BIO-TELEFONY

(dzwoniąc do firmy nie zapomnij pochwalić się, że numer telefonu znalazłeś w „Postęпах Biochemii”)

AMICON I BIBBY STERILIN — POLTRADE LIMITED jest wyłącznym dystrybutorem na Polskę, Warszawa, tel. (022) 23-58-52, fax. (022) 23-53-06

BAKER — Łódź, tel. 81-31-40, fax. 81-52-83
BIO — RAD — Wiedeń tel. (222) 82-89-010, fax. (222) 82-85-629, Warszawa tel. (022) 23-58-52, fax. (022) 23-53-06

CALBIOCHEM (pharm Supply AG) — odczynniki chemiczne, reagenty biochemiczne i immunologiczne, Warszawa tel./fax. 642-87-77

CHEMINST — przedstawiciel **APPLIED BIOSYSTEMS SORVALL, GILSON, HAMILTON** i in., Warszawa tel. 13-92-19, Wiedeń tel. 43-59-080, 43-45-000, fax. 43-44-83-26

GIBCO-BRL — Life Technologies, Warszawa tel. 25-34-56

HAND-PROD — dystrybutor odczynników chemicznych firm: **BOEHRINGER MANNHEIM, RIEDEL-de HAËN**, Warszawa tel./fax. 37-42-35

PEROCCHI — okulary ochronne, Warszawa tel. 17-98-05

RIVER — biuro handlu zagranicznego, Kraków tel. (12) 33-66-76, fax. (12) 33-66-76

SIGMA chem. comp., USA, E. Merck, Niemcy — wyspecjalizowany importer odczynników „Aurum”, Warszawa tel. 35-20-55