

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

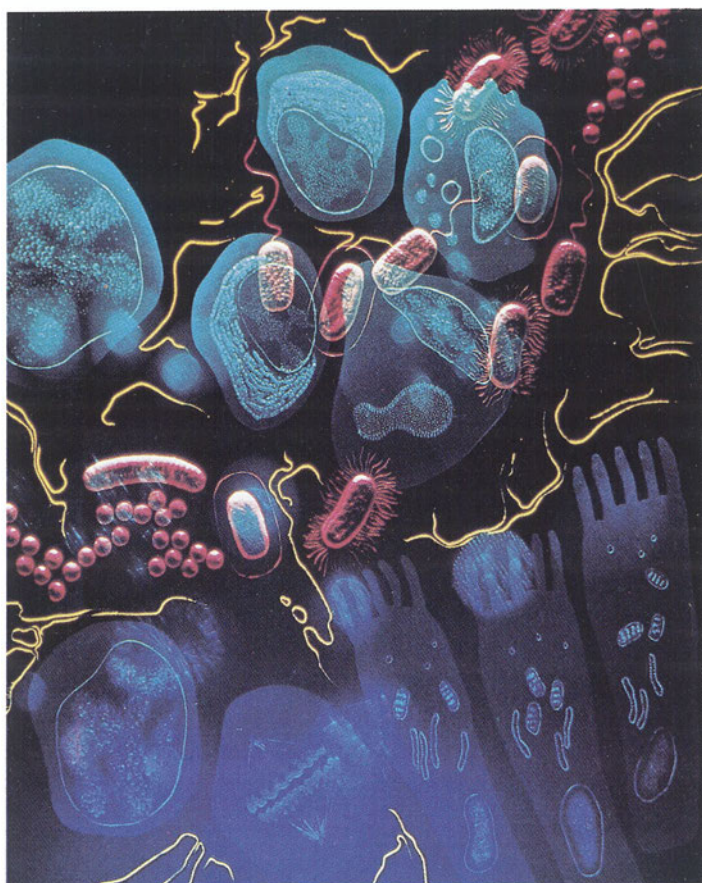
POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

TOM 41, NR 3, 1995

Patogeneza „serca ogłuszonego”	158
Cytoszkieleł komórek mięśniowych	165
Białko MAP-2 w ośrodkowym układzie nerwowym	175
Wrodzony niedobór deaminazy AMP	183
Receptory kolagenu płytek krwi	188
Oddziaływanie białek z uszkodzonym DNA	195
Zmodyfikowane lipoproteiny	201



Odczynniki biochemiczne z następujących działów:

- * Przeciwciała monoklonalne
- * Antybiotyki - substancje do badania *in vitro*
 - * Enzymy i koenzymy
 - * Cytokiny
 - * Genetyka molekularna
 - PCR
 - DNA
 - Plazmidy
 - Enzymy restrykcyjne
 - Primery i linkersy
 - Wzorce ciężaru DNA
 - Nukleotydy
 - * Czynniki wzrostu
 - * Hormony
 - * Lecytyny
 - * Mitogeny
 - * Fitodiagnostyka
 - * Proteazy

Zestawy diagnostyczne:

- * PCR
- * Bioluminescencja/Chemiluminescencja
- * Zestawy ELISA (nieizotopowe metody badania wzrostu i śmierci komórek)
- * Analizy żywności
- * Fitodiagnostyka

Przedstawiciel i wyłączny dystrybutor w Polsce:

Hand-Prod Sp z o.o.
ul. Ulrychowska 26
01-113 WARSZAWA
tel/fax +48 22 374235
fax +48 26 626303

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
Poland

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY

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

REDAKTORZY

Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02

ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234

ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46

JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue

JERZY BAL

(Warszawa)

CELINA JANION

(Warszawa)

LESZEK KACZMAREK

(Warszawa)

ROBERT MAKUCH

(Warszawa)

MAREK NARUSZEWICZ

(Szczecin)

ANNA PUKA

(Warszawa)

ANDRZEJ SOBOTA

(Warszawa)

MARIAN TOMASIK

(Białystok)

ADRES REDAKCJI

Address
REDAKCJA KWARTALNIKA
„POSTĘPY BIOCHEMII”
INSTYTUT BIOLOGII
DOŚWIADCZALNEJ
im. M. Nenckiego PAN
ul. Pasteura 3
02-093 Warszawa
tel (2) 659-85-71 w. 332
fax: (22) 22-53-42
telex: 81-48-92

SPIS TREŚCI CONTENTS

Niektóre biochemiczne aspekty patogenezy „serca ogłuszonego”

Biochemical aspects of pathogenesis of the stunned myocardium
ANNA MOCZARSKA 158

Cytoszkielek komórek mięśniowych

The cytoskeleton of muscle cells
RENATA DĄBROWSKA, MARIA A. GRAŻIEWICZ 165

Białko MAP-2 i jego rola w wielu przejawach plastyczności i stanach patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym

MAP-2 (Microtubule-associated protein-2) and its role in several aspects of plasticity and pathological states in the central nervous system
BARBARA MAJEWSKA 175

Wrodzony niedobór deaminazy AMP — podłoże molekularne defektu

Inherited AMP-deaminase deficiency — molecular basis of the defect
KRYSTIAN KALETHA, MANFRED GROSS 183

Receptory kolagenu płytek krwi

Platelet collagen receptors
URSZULA KRALISZ 188

Oddziaływanie białek z uszkodzonym DNA

Interactions of proteins with damaged DNA
PIOTR WIDŁAK 195

Biologiczne skutki modyfikacji lipoprotein

Biological consequences of lipoprotein modification
HANNA WEHR 201

Doroczna konferencja kierowników Katedr Biochemii Wydziałów Lekarskich w Polsce 1995

Annual Conference of the Medical Schools Biochemistry Teachers Poland 1995
MARIUSZ ŻYDOWO 205

Niektóre biochemiczne aspekty patogenezy „serca ogłuszonego”

Biochemical aspects of pathogenesis of the stunned myocardium

ANNA MOCZARSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Zmiany zachodzące w mięśniu po odwracalnym krótkotrwałym niedokrwieniu
 - II-1. Produkcja i zużycie ATP
 - II-2. Generowanie wolnych rodników tlenowych w ogłuszonym sercu
 - II-3. Zaburzenie homeostazy wapniowej
 - II-4. Zmiany w aparacie skurczu wynikające z zaburzeń homeostazy wapniowej
- III. Złożoność patogenezy serca ogłuszonego

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP-cykliczny monofosforan adenozyne; Pi — fosforan nieorganiczny; PCr — fosfokreatyna; CK — kinaza kreatynowa; $\cdot\text{O}_2^-$ — anionorodnik ponadtlenkowy; $\cdot\text{OH}$ — rodnik hydroksylowy; LC_1 — lekki łańcuch miozyny istotny; LC_2 — lekki łańcuch miozyny regulujący; TN-I — podjednostka I troponiny; SOD — dysmutaza ponadtlenkowa; NADH — dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (postać zredukowana).

I. Wstęp

Określenie „ogłuszony mięsień sercowy” należy rozumieć jako krótkotrwałe, w pełni odwracalne upośledzenie funkcji skurczowej serca, pojawiające się we wcześniej niedokrwionym jego obszarze. Nie występuje przy tym uszkodzenie miocytów, a po przywróceniu przepływu wieńcowego funkcja skurczowa stopniowo powraca do normy.

Zjawisko to, pierwszy opisał Heyndrickx i w s.p. [1] na przykładzie serca psa poddanego 15 min. niedokrwieniu (ischemii), przez podwiązanie tętnicy wieńcowej i następującej po tym reperfuzji. Konsekwencje zmian jakie powstały w rezultacie takiego zabiegu zostały nazwane przez Braunwalda i Klonera *stunned myocardium*, co w do-

Contents:

- I. Introduction
- II. Changes in cardiac muscle after brief reversible period of ischemia
 - II-1. ATP production and utilization
 - II-2. Free radicals generation in stunned myocardium
 - II-3. Derangement of calcium homeostasis
 - II-4. Changes in the contractile machinery as a result of deranged calcium homeostasis
- III. Complexity of pathogenesis of stunned myocardium

słownym tłumaczeniu znaczy ogłuszone serce [2]. Jest to klasyczny i zarazem najbardziej rozpowszechniony eksperymentalny model serca ogłuszonego.

Całkowita odbudowa upośledzonej kurczliwości serca po 15 minutowej okluzji wieńcowej wymaga 12 do 24 godzin reperfuzji [1]. Niektórzy badacze zaobserwowali, że powrót do prawidłowej funkcji po krótkim czasie ischemii wymagał 3-7 dni [3]. Po znacznie dłuższym niedokrwieniu, trwającym 1 godzinę i 2 godziny, co zwykle powoduje trwałe uszkodzenie mięśnia sercowego, zaobserwowano także pewną regenerację jego funkcji, pojawiającą się po wielu tygodniach [4, 5]. Podobnie u pacjentów poddanych chirurgicznej rewaskularyzacji tętnic wieńcowych obserwuje się stopniową poprawę miejscowego zaburzenia kurczliwości po ponownym unaczynieniu ischemicznego fragmentu serca [6].

Przedłużone zaburzenie funkcji skurczowej towarzyszy najczęściej niewydolności serca w chorobach sercowo-naczyniowych, obserwowane jest po angioplastyce wieńcowej, podczas zawału serca z wczesną reperfuzją, a także po krótkich epizodach niedokrwienia (np. zawał zagrażający), gdzie ustępuje samoistnie lub w wyniku zastosowania środków inotropowo dodatkich¹ (dopamina, dobutamina, izoprenalina).

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

¹ czynniki inotropowe (dodatnie lub ujemne) — związki chemiczne zmieniające kurczliwość mięśnia sercowego.

Dobutamina np. podnosi przepływ krwi w reperfundowanym obszarze, a także poprawia zużycie i produkcję energii, co wykazano na podstawie badania poziomu fosfokreatyny i ATP w reperfundowanych po 15 min. niedokrwienia sercach świni [7]. Powrót prawidłowej funkcji skurczowej jest wyraźnie usprawniony przez reperfuzję roztworami o niskim stężeniu Ca^{2+} [8]. Stymulacja inotropowa, której końcowym rezultatem jest poprawa kurczliwości mięśnia sercowego to działanie amin katecholowych. Związki te, łącząc się z receptorami typu B_1 sarkolemy, aktywują zlokalizowaną tam cyklazę adenylową, która syntetyzuje 3'5'adenozynomonofosforan (cAMP). Działanie cAMP polega na aktywacji fosfokinaz. Do białek fosforylowanych przez zależne od cAMP kinazy należą m.in. białka strukturalne sarkolemy wchodzące w skład wolnego kanału wapniowego, fosfolamban — białko charakterystyczne dla siateczki śródbłonkowej mięśnia sercowego, oraz ważne w procesie skurczu podjednostka I troponiny i białko C.

Ogłuszone serca pozostają wrażliwe na katecholaminy co podkreśla dynamiczną naturę osłabienia kurczliwości. Histologiczne badania struktury oraz badania metabolizmu tych serc, nie wykazały objawów nieodwracalnego ich uszkodzenia [8].

Paradoks długo trwającego zaburzenia w zdolnej do życia tkance stanowi zatem interesujące wyzwanie dla fizjologów, biochemików i klinicystów. Pomimo rozlicznych badań i hipotez nie wiadomo, która z wielu obserwowanych w komórce zmian jest bezpośrednią przyczyną zaburzenia funkcji skurczowej serca.

II. Zmiany zachodzące w mięśniu po odwracalnym krótkotrwałym niedokrwieniu

II-1. Produkcja i zużycie ATP

Biochemiczne i fizjologiczne cechy ogłuszenia nie są do końca scharakteryzowane i mechanizm ich powstawania pozostaje wciąż nie wyjaśniony. Jako przyczynę zaburzenia funkcji serca sugerowano obniżenie zawartości związków wysokoenergetycznych przez osłabienie ich wytwarzania lub uszkodzenie transportu utrudniające ich dostępność. Kusok [8] badając wewnątrzkomórkową zawartość fosforanu nieorganicznego (Pi) i fosfokreatyny (PCr) oraz zmiany pH w sercu, obserwował gwałtowny wzrost poziomu Pi oraz spadek poziomu PCr podczas 15 minutowej ischemii, a następnie szybki ich powrót do wartości wyjściowych rozpoczynający się już po 30 sekundach reperfuzji. Podobnie wartość pH obniżała się w czasie trwania niedokrwienia i wracała do normy w momencie przywrócenia przepływu wieńcowego. Jedynie stężenie ATP po znacznym obniżeniu wzrastało powoli i nie osiągało pierwotnego poziomu nawet po przywróceniu przepływu wieńcowego. Także inni badacze wykazali, że 15 minutowe niedokrwienie powoduje obniżenie stężenia tkankowego ATP, a jego powrót do

normy następuje dopiero po trzech dniach, równoległe z regeneracją funkcji skurczowej [9]. Według niektórych autorów, obniżenie poziomu nukleotydów adeninowych i uszkodzenie mechanizmu odbudowy ATP po reperfuzji jest krytycznym czynnikiem, zapoczątkowującym nieodwracalność zaburzenia hemodynamicznej funkcji serca [10]. Badania produkcji fosforanu kreatyny wykazały, że jego poziom wzrasta bardzo szybko po reperfuzji. Ponieważ fosforan kreatyny może powstawać tylko w procesie fosforylacji kreatyny przez ATP z udziałem kinazy kreatynowej (CK), (ATP kreatyno N-fosfotransferaza EC 2.7.3.2.) można przypuszczać, że wytwarzanie ATP rozpoczyna się natychmiast po reperfuzji [11, 12]. Zatem zaburzenia produkcji związków wysokoenergetycznych, nie mogą być głównym elementem w patogenezie ogłuszenia. Istotnym czynnikiem w procesie przekształcania energii w miofibryllach jest związany z nimi izoenzym kinazy kreatynowej (CK) [13]. Izoenzym ten funkcjonalnie połączony z ATPazą miozynową jest ważnym miofibrylarnym składnikiem układu regenerującego ATP w obecności substratów ADP i fosforanu kreatyny. Obniżenie aktywności tego enzymu lub stężenia substratu może zaburzyć produkcję ATP i następnie zmienić funkcję miocytu. Greenfield i Swain [14] w badaniach miofibrilli izolowanych po 15 min. niedokrwienia wykazały mały 17% spadek aktywności CK. Analogiczny spadek aktywności kinazy kreatynowej, po podobnym czasie ischemii, obserwowano wcześniej w mitochondriach [15, 16]. Zdaniem tych autorów, potencjalnym mechanizmem po ischemicznej dysfunkcji, może być obniżona możliwość utylizacji ATP. Jednak pytanie, których wewnątrzkomórkowych procesów ono dotyczy, pozostaje na razie bez odpowiedzi [17, 18].

Mechanizm zmian, które poprzez krótkotrwałe niedokrwienie prowadzą do przedłużonego upośledzenia kurczliwości mięśnia sercowego, nie jest dokładnie poznany. Do tej pory zaproponowano wiele różnych hipotez. Oto niektóre z nich:

II-2. Generowanie wolnych rodników w ogłuszonym sercu

Od kilku lat dużo uwagi poświęca się wolnym rodnikom, sugerując, że reaktywne metabolity tlenowe takie jak anion ponadtlenkowy ($\cdot\text{O}_2^-$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$) odgrywają decydującą rolę w patogenezie serca ogłuszonego. Wolne rodniki to atomy lub cząsteczki z więcej niż jednym niesparowanym elektronem. Nieparzysta liczba elektronów sprawia, że są one bardzo aktywne chemicznie, nietrwałe (okres półtrwania wynosi 10^{-6} - 10^{-9} sekundy) i szybko reagują z innymi rodnikami lub cząsteczkami, przez co trudne są do wykrycia i ilościowego oznaczenia [19].

Rodniki mogą atakować praktycznie wszystkie składniki komórkowe, denaturować białka, inaktywować

enzymy. Uszkadzając białka aparatu kurczliwego mogą przyczynić się do zmiany ich wrażliwości na wapń, a inicjując peroksydację wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład błon komórkowych, uszkadzać ich selektywną przepuszczalność. Praktycznie każde zaburzenie obserwowane w ogłuszonym sercu może być przypisane działaniu rodników tlenowych.

Prawdopodobnymi źródłami wolnych rodników tlenowych w niedokrwionych tkankach są reakcje utleniania zachodzące podczas zaburzenia wewnątrzmitochondrialnego transportu elektronów, aktywowanie wapniem fosfolipazy, która pobudza metaboliczny szlak kwasu arachidonowego do produkcji rodników tlenowych, działanie oksydazy ksantynowej, autoutlenianie katecholamin oraz procesy utleniania zachodzące podczas reakcji wywołanych przez pobudzone w niedokrwionym obszarze granulocyty [20, 21].

Badania *in vitro* wykazały, że wytwarzanie wolnych rodników w niedokrwionym mięśniu sercowym rozpoczyna się już w trakcie upośledzenia przepływu, a największe jest po 2-4 minutach reperfuzji. Następnie ich produkcja spada, i utrzymuje się na niskich poziomach przez około 3 godziny od momentu przywrócenia przepływu wieńcowego [22].

Wykazano, że dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), która jest enzymem katalizującym dysmutację O_2^- do O_2 i H_2O_2 oraz katalaza — enzym, który redukuje H_2O_2 do O_2 i H_2O podane jednocześnie istotnie zmniejszają stopień uszkodzeń obserwowanych w niedokrwieniu i reperfuzji, ponieważ przeciwdziałają powstawaniu rodników hydroksylowych [23]. Także podawanie chelatora desferrioksaminy lub MPG (N-2 merkaptopropionylu glicyna, silny zmiatacz rodników $\cdot OH$) przed niedokrwieniem lub na minutę przed reperfuzją efektywnie hamuje rozwój ogłuszenia [24, 25]. Obserwacje te mają bardzo istotne znaczenie terapeutyczne bowiem wskazują, że rozpoczęta przed reperfuzją terapia antyutleniaczami może chronić serce przed ogłuszeniem. Zatem czasowa niewydolność skurczowa serca może być wynikiem indukowanych reperfuzją uszkodzeń, w powstawaniu których, wolne rodniki tlenowe odgrywają decydującą rolę. O ile ich rola i chemiczny mechanizm działania nie budzą wątpliwości, to szczegóły dotyczące sposobu w jaki przyczyniają się do czasowej niewydolności skurczowej serca pozostają na razie nie wyjaśnione i dyskusyjne.

Szczególnie intrygująca wydaje się możliwość działania wolnych rodników poprzez zaburzenie homeostazy wapniowej.

II-3. Zaburzenie homeostazy wapniowej

Jak już wspomniano, opinie na temat mechanizmu *stunned* są bardzo różnicowane. Wielu badaczy tego zjawiska łączy ze sobą procesy generowania rodników tlenowych w ogłuszonym sercu z zaburzeniem homeostazy wapniowej.

Badanie izolowanych serc poddanych całkowitej ischemii wykazało, że stężenie jonów wapnia wzrasta pomiędzy 10 a 20 minutą trwania niedokrwienia i powraca do wartości wyjściowych w kilka minut po przywróceniu przepływu wieńcowego [26]. Krótkotrwałe przeciążenie wapniem izolowanych serc przy braku niedokrwienia (serca kontrolne) wywołuje mechaniczne i metaboliczne zaburzenia podobne do tych obserwowanych w sercu ogłuszonym [27].

Istnieje hipoteza zakładająca, że rodniki tlenowe powodują upośledzenie funkcji siateczki sarkoplazmatycznej (w ogłuszonym sercu wykazuje ona obniżoną zdolność transportu Ca^{2+}), wzrost przepływu Ca^{2+} przez sarkolemmę na skutek utraty jej selektywnej przepuszczalności i ostatecznie przeciążenie komórki wapniem oraz rozchwianie systemu pobudzeniowo-skurczowego [28].

Niektórzy badacze twierdzą, że wzrost poziomu Ca^{2+} może odbywać się za pośrednictwem wymiany $Na^+ - Ca^{2+}$ jako konsekwencja wewnątrzkomórkowego wzrostu Na^+ obserwowanego podczas niedokrwienia, a spowodowanego inhibicją sarkolemmalnej $Na^+ K^+ ATP$ azy. Może to doprowadzić do przeciążenia komórki jonami sodu i w rezultacie do aktywnej wymiany $Na^+ - Ca^{2+}$ [29]. Inną możliwość wzrostu poziomu wapnia stwarza przejściowe zakwaszenie komórki. Najnowsze badania wykazały, że ostre przeciążenie komórek wapniem i wynikające z tego zaburzenie funkcji skurczowej serca może być konsekwencją szybkiej korekty zakwaszenia [30]. Jak już wcześniej wspomniano, podczas krótkiego niedokrwienia wartość pH spada. Reperfuzja powoduje gwałtowny jego wzrost i powrót do stanu wyjściowego. Szybkie przywrócenie wartości pH związane jest z aktywacją wymiany $Na^+ - H^+$, co z kolei prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów sodu i aktywacji wymiany $Na^+ - Ca^{2+}$. Końcowym tego rezultatem będzie przejściowe przeciążenie komórek wapniem. Potwierdzeniem tego jest fakt, że zablokowanie na okres 3 minut wymiany $Na^+ - H^+$ chroni komórkę przed wzrostem wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} . Także zewnątrzkomórkowe zwiększenie stężenia jonów wodorowych podczas reperfuzji może zabezpieczyć serce przed ogłuszeniem w wyniku osłabienia wymiany $Na^+ - H^+$, co uchroni komórkę przed wzrostem Na^+ i aktywacją wymiany $Na^+ - Ca^{2+}$.

Zaburzenie funkcji siateczki sarkoplazmatycznej (SR) podczas niedokrwienia i reperfuzji może spowodować utratę regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Sugeruje się, że zmniejszenie ilości Ca^{2+} przechowywanych w SR jest wynikiem redukcji aktywności pompy wapniowej ($Ca^{2+} Mg^{2+} ATP$ azy) i w konsekwencji obniżonej zdolności transportu Ca^{2+} , co może mieć wpływ na zmniejszenie aktywacji białek kurczliwych przez zahamowanie uwalniania wapnia podczas skurczu.

W celu sprawdzenia możliwości uszkodzenia transportu wapnia w SR, dokonano pomiaru wychwytu

Ca^{2+} oraz aktywności ATPazy w pęcherzykach siateczki sarkoplazmatycznej, wyizolowanych z serca psa poddanego krótkiemu miejscowemu niedokrwieniu [31]. Maksymalny transport jonów wapnia był zredukowany do 17% przy jednoczesnym spadku maksymalnej aktywności $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ ATPazy. Wykazano także spadek uwalniania Ca^{2+} [32]. Krause [33] badając to zjawisko stwierdził, że obniżenie szybkości uwalniania Ca^{2+} spowodowane jest wzrostem przepuszczalności błony siateczki sarkoplazmatycznej na skutek jej uszkodzenia. Niewielkie, ale istotne, zaburzenia wychwytu Ca^{2+} obserwowano także w siateczce sarkoplazmatycznej serca szczura. Badania przeprowadzone na sercu świni nie potwierdziły jednak uzyskanych wcześniej wyników. Poziom fosforylacji fosfolambanu (fosforylacja ta odbywa się za pośrednictwem kinazy zależnej od jonów wapnia i kalmoduliny i powoduje aktywację ATPazy transportującej Ca^{2+} do wnętrza struktur siateczki) nie był zmieniony, a wychwyt jonów wapnia podwyższony o 17% w stosunku do regionu kontrolnego [34]. Co może być przyczyną uzyskania tak odmiennych wyników? Lammer i w sp. sugerują, że powodem mogą być różnice gatunkowe, a także czas trwania niedokrwienia i reperfuzji.

Przeprowadzone przez Frass i w sp. [35] badania poziomu mRNA dla białek wiążących Ca^{2+} , związanych z siateczką sarkoplazmatyczną, wykazały istotny wzrost poziomu mRNA Ca^{2+} ATPazy, fosfolambanu i kalsekwestryny po 90 i 180 min. reperfuzji. Świadczyć to może o procesach naprawy tych białek, uszkodzonych podczas krótkiego niedokrwienia i jednoznacznie wskazuje na ich udział w patogenezie *stunned*. Jednocześnie poziomy mRNA kalmoduliny oraz α i β ciężkich łańcuchów miozyny pozostawały nie zmienione.

Obserwowany spadek szybkości wychwytu Ca^{2+} , może prowadzić do wzrostu jego poziomu w cytoplazmie, obniżenia uwalniania Ca^{2+} podczas skurczu, i w rezultacie do upośledzenia jego transportu. Nasuwa się więc pytanie czy czułość miofilamentu na obecność jonów wapnia może być zredukowana?

II-4. Zmiany w aparacie skurczu wynikające z zaburzenia homeostazy wapniowej

Odpowiedź funkcjonalna miofilamentu na wolne jony wapnia zależy od czynników regulujących jego wrażliwość na Ca^{2+} . Wrażliwość ta określa granice stężenia jonów wapnia aktywujących skurcz. Można przypuszczać, że zaburzenie homeostazy wapniowej indukuje zmianę właściwości aparatu kurczliwego związaną z wrażliwością na wapń interakcji filamentów aktynowych z miozynowymi. Pojawiające się upośledzenie funkcji skurczowej serca może wynikać ze zmiany wrażliwości na wapń białek kurczliwych.

W izolowanych, pracujących sercach królika, badania właściwości miofibrilli przy jednoczesnej kontroli

funkcji hemodynamicznej serca oraz wpływ izoprenaliny (lek adrenergiczny), pobudzający receptory β_1 w mięśniu sercowym) i chlorku wapnia w ischemicznych i nie ischemicznych warunkach. Podanie izoprenaliny istotnie podnosiło szybkość pracy zdrowego serca do 132% wartości kontrolnych, $+dP/dt = 142\%$, $-dP/dt = 115\%$ ¹. Po ischemii funkcja serca była istotnie obniżona, a wydajność jego pracy spadła do 69% kontrolnych wartości przed ischemicznymi. Podanie 5 mM CaCl_2 odwracało zaburzenie funkcji, natomiast izoprenalina podnosiła szybkość pracy serca do 113%, a więc powyżej normalnie obserwowanej. Aktywność miofibrillarnej ATPazy przy maksymalnym stężeniu jonów wapnia była podwyższona, a jej czułość na obecność wolnych jonów wapnia zredukowana [36]. Hess [37] natomiast w analogicznym doświadczeniu stwierdził spadek maksymalnej aktywności miofibrillarnej ATPazy oznaczanej w obecności wapnia i zmianę jej czułości na Ca^{2+} . Krause [38] nie wykazał zmian tych parametrów po 15 min. niedokrwienia poprzedzającego reperfuzję.

Pojawia się pytanie czy i jak uzyskane wyniki pokrywają się z obserwowanym zaburzeniem funkcji serca? Zmiana aktywności miofibrillarnej ATPazy nie zawsze jest związana z funkcjonalnymi parametrami skurczu serca. Wcześniejsze badania równoległego pomiaru siły skurczu i aktywności miofibrillarnej ATPazy na pozbawionych błony włóknach mięśnia szkieletowego wykazały, że wzrost napięcia w skurczu izometrycznym pojawia się przy wyższym stężeniu jonów Ca^{2+} niż ma to miejsce w przypadku aktywacji aktomiozynowej ATPazy [39]. Interesującym jest także fakt, że rozbieżności pomiędzy siłą skurczu i aktywnością ATPazy stają się większe przy wyższych stężeniach jonów magnezu, co jest o tyle ważne, że w ischemicznych i następnie reperfundowanych sercach stężenie Mg^{2+} jest podwyższone [40].

W badanych sercach królika poddanych 20 min. niedokrwieniu, podawanie CaCl_2 lub izoprenaliny odbudowuje funkcję hemodynamiczną, ale aktywność ATPazy ciągle pozostaje podwyższona, tak jak w preparatach nie ischemicznych traktowanych w ten sam sposób. Obserwowane przesunięcie krzywej zależności aktywności miofibrillarnej ATPazy od stężenia jonów wapnia w kierunku wyższych stężeń, interpretowane jako obniżenie czułości na Ca^{2+} , zgodne jest z przypuszczeniem, że spadek czułości miofilamentu na wapń jest jednym z czynników wywołujących zaburzenie skurczu [8]. Dodatkowe potwierdzenie stanowi obserwacja, że CaCl_2 i izoprenalina podawane po ischemii zdolne są podwyższyć czułość na wapń miofibrillarnej ATPazy i przywrócić w tym samym czasie prawidłową funkcję serca [36]. Jaki jest mechanizm tego zjawiska nie wiadomo, ale pewną rolę odgrywać tu może fosforylacja białek kurczliwych. Znaczenie fosforylacji

¹ dP/dt — szybkość narastania ciśnienia w fazie skurczu serca, proporcjonalna do szybkości narastania siły.

lekkich łańcuchów miozyny serca nie jest dobrze poznane. Z niektórych jednak badań wynika, że fosforylacja i defosforylacja LC_2 moduluje skurcz mięśnia i jego czułość na wolne jony wapnia [41]. O fosforylacji troponiny I wiadomo, że powoduje zmniejszenie wrażliwości na wapń ATPazy miofibrylli [42], natomiast fosforylacja białka C skraca czas relaksacji skurczu, oraz — jak wykazano *in vitro* — obniża aktywność ATPazy aktomiozynowej [43, 44]. W przeprowadzonych eksperymentach, fosforylacja podjednostki I troponiny nie była istotnie zmieniona (preparaty miofibrylli z ischemicznych i kontrolnych serc nie wykazywały wyraźnych różnic w zawartości ufosforylowanej TN-I). Zauważalny jednak wzrost poziomu fosforylacji TN-I obserwowano w preparatach serc ogłuszonych poddanych działaniu 5 mM $CaCl_2$ lub izoprenaliny. W przypadku lekkich łańcuchów miozyny, poziom ich fosforylacji nie różnił się, podobnie jak w przypadku TN-I, od miofibrylli serc kontrolnych. Podawanie $CaCl_2$ powodowało wzrost poziomu fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, podczas gdy izoprenalina wywoływała tu efekt odwrotny. Na obecnym etapie badań trudno wykazać bezpośrednią zależność pomiędzy obserwowanymi poziomami fosforylacji TN-I i LC_2 , a zmianami miofibryllarnej ATPazy. Zwiększone stężenie Ca^{2+} może zatem przyczyniać się do obserwowanych ischemicznych zmian czułości na Ca^{2+} i maksymalnej siły skurczu, poprzez aktywację kinaz białkowych i fosforylację jednego lub wielu białek kurczliwych.

Innym ważnym następstwem zaburzenia homeostazy Ca^{2+} w ogłuszeniu, może okazać się częściowa degradacja niektórych białek kurczliwych. W testach klinicznych surowicy krwi pacjentów z niedokrwieniem mięśnia sercowego, wykazano np. wzrost poziomu lekkich łańcuchów (LC_1) miozyny, utrzymujący się do 4 dnia od momentu przywrócenia przepływu wieńcowego [45], co wskazuje na możliwość degradacji lekkich łańcuchów i/lub filamentów miozynowych.

Kolejnym prawdopodobnym skutkiem zaburzenia homeostazy wapniowej w ogłuszonym sercu, jest obserwowane po 1 godzinie reperfuzji uszkodzenie mikrotubularnego systemu, przy czym krótkie niedokrwienie (15 min.) nie wywołuje żadnych uszkodzeń tych struktur [46]. Odbudowa rozerwanej sieci mikrotubul w reperfundowanym sercu trwa 1 do 3 dni, a więc pokrywa się z czasem potrzebnym dla odbudowy upośledzonej czynności skurczowej. Mikrotubule występują m.in. w cytoplazmie stanowiąc szkielet komórek i decydując o ich kształcie. Biorą też udział w systemie mikrokrążenia komórkowego. Za ich pośrednictwem ulegają przemieszczeniu niektóre organelle komórkowe np. wakuole, rybosomy, a także ziarenka pigmentu. Uszkodzenie tych struktur może spowodować dysfunkcję i dyslokację organelli wpływając w ten sposób na funkcję miocyty. Mikrotubule nie są trwałe i w wielu komórkach rozpadają się w temperaturze 0°C lub znikają po podaniu kol-

chicyny (np. mikrotubule we wrzecionach mitotycznych i w szkielecie komórkowym). Zwiększone stężenie jonów wapnia także powoduje rozpad tych struktur. Na przykład Ca^{2+} przyspiesza depolaryzację mikrotubul co wykazano w badaniach *in vitro* [47]. Fosforylacja tubuliny i/lub białek związanych z mikrotubulami przez kinazę białkową zależną od Ca^{2+} i kalmodyliny, może hamować polimeryzację tubuliny [48]. Wykazano, że podawanie przez 10 min. $CaCl_2$ sercom nie ischemicznym powoduje niszczenie mikrotubularnej sieci [46]. Indukowane wapniem rozerwanie mikrotubul obserwowano też w komórkach nerki małpy [49] oraz w fibroblastach [50] po mikroiniekcji Ca^{2+} .

W przypadku krótkotrwałego niedokrwienia, wzrost stężenia Ca^{2+} może aktywować neutralne proteazy i przyczyniać się do częściowej degradacji mikrotubul i białek kurczliwych. Jeżeli taka degradacja rzeczywiście zachodzi, to otrzymalibyśmy odpowiedź na pytanie dlaczego *stunning* ulega odwróceniu niekiedy dopiero po upływie kilku dni, a więc w okresie czasu odpowiadającym szybkości rekonstrukcji uszkodzonych białek.

III. Złożoność patogenezy serca ogłuszonego

Obserwowane podczas niedokrwienia mięśnia sercowego i jego reperfuzji zjawiska wydają się być konsekwencją całej kaskady zdarzeń takich jak obniżenie pH, wzrost liczby wolnych rodników, zaburzenie homeostazy wapniowej, prowadzących ostatecznie do upośledzenia funkcji skurczowej serca. Także czynniki takie jak katecholaminy, endotelina, tromboksany¹ i różne katabolity mają swój udział w powstawaniu skutków niedokrwienia mięśnia sercowego [51]. Sugerowano np., że katecholaminy ulegając samoutlenieniu mogą dostarczać elektronów dla formowania się wolnych rodników i przyczyniać w ten sposób do uszkodzenia serca. Nowsze badania wykazały jednak, że proces utleniania katecholamin przy pH odpowiadającym warunkom fizjologicznym przebiega bardzo wolno, a zatem ich rola w powstawaniu rodników w stanach patologicznych nie jest raczej duża.

Interesujące są obserwacje prowadzone nad endoteliną — peptydem zwięzającym naczynia. Występuje on m.in. w zdrowej tkance serca oraz we krwi. Niedokrwienie mięśnia sercowego indukuje wzrost stężenia endoteliny, co z kolei przyczynia się do zwiększenia obszaru tkanki objętej zawałem. Sugeruje się, że działanie tego peptydu polega na stymulacji napływu Ca^{2+} do komórek ze środowiska zewnętrznego, jak i uwalnianiu jego zapasów z wewnątrzkomórkowych magazynów [52]. Na przykładzie mięśnia sercowego szczura, w którym sztucznie wywołano zawał przez podwiązanie na okres 1 godziny lewej

¹ tromboksany — pochodne 20 węglowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

tętnicy wieńcowej i następnie 24 godziną reperfuzy, wykazano, że stężenie endoteliny w osoczu krwi i tkance serca wzrosło 4-7 razy w porównaniu z preparatami kontrolnymi. Neutralizacja endoteliny przeciwciałami, zredukowała w sposób istotny rozległość zawału (43% redukcja obszaru tkanki objętego zawałem) [53].

Badacze, zajmujący się od wielu lat problemem krótkotrwałego niedokrwienia mięśnia sercowego wobec dużej liczby hipotez dotyczących tego zjawiska, próbują określić jeden zwarty mechanizm przyczynowy obserwowanych przez siebie zaburzeń w ischemicznej komórce. Poznanie takiego mechanizmu umożliwiłoby opracowanie odpowiednich działań farmakologicznych zmierzających do szybkiego przywrócenia sprawności mięśnia sercowego po okresie jego niedokrwienia.

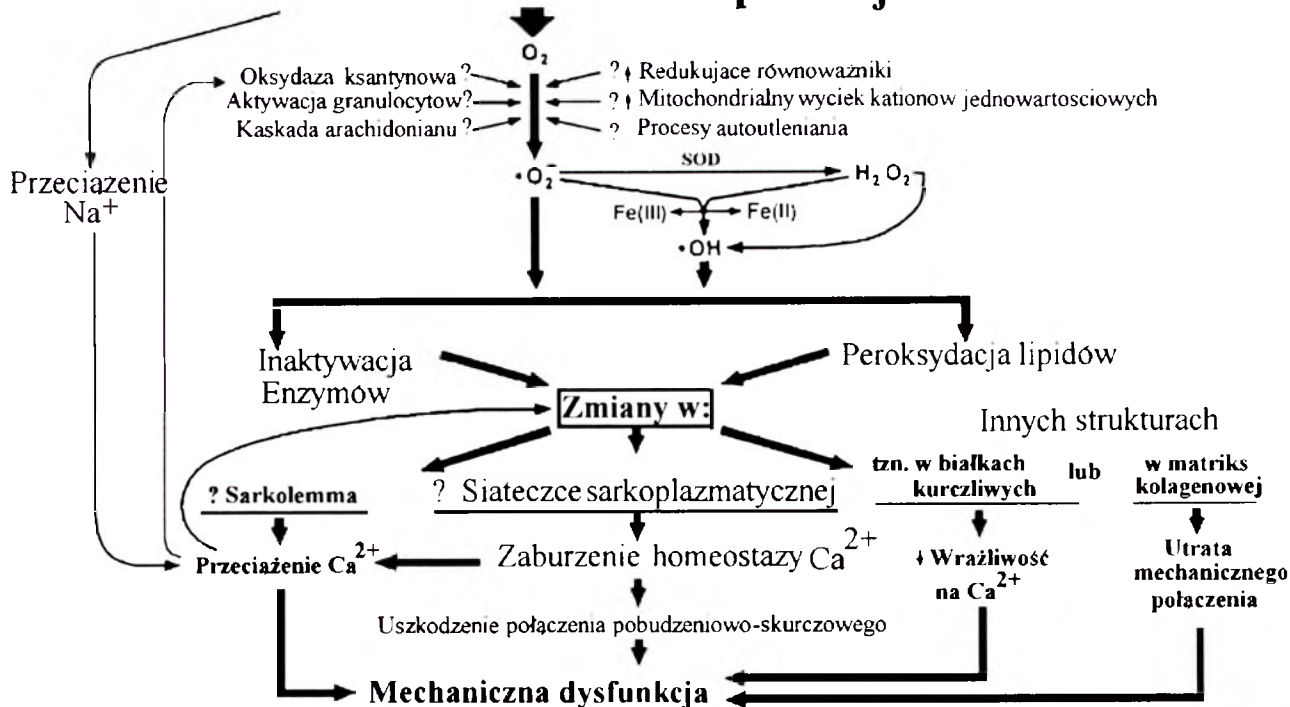
Zebrane w przedstawionym schemacie (Ryc. 1), obserwowane w sercu po ischemii i reperfuzji zaburzenia, które zdaniem Bolliego mogą prowadzić do mechanicznej dysfunkcji serca, wskazują na złożoność problemu. Jak wynika z przedstawionego schematu, hipoteza rodnikowa i wapniowa nie wykluczają się wzajemnie. Ostatnie badania wykazały bowiem, że powstawanie wolnych rodników prowadzi do przeładowania komórki wapniem, choć nie wiadomo jeszcze w jaki sposób [28].

Zwrócono także uwagę na proces glikolizy przebiegający bez zaburzeń w ciągu pierwszych minut ischemii, który jednak hamują postępujący wzrost zakwaszenia tkankowego, akumulacja NADH, cytrynianu i mleczanu [54, 55]. Ograniczony dostęp tlenu nie jest wystarczający dla utrzymania fosforylacji oksydacyjnej, a pirogronian zamiast wejść do cyklu Krebsa, przekształcany jest do kwasu mlekowego. Beztlenowa

produkcja ATP nie może sprostać wymaganiom tkanekowym. Zatem przedłużające się niedokrwienie powoduje, że poziom ATP spada, co zapoczątkowuje serię szkodliwych dla komórki zdarzeń. Glikoliza odgrywa ważną rolę w utrzymaniu transbłonowego gradientu jonów [56-58]. Jej zaburzenie może spowodować wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} , co może być przyczyną późniejszego zaburzenia homeostazy wapniowej. Wolne jony wapnia są łatwo wychwytywane przez mitochondria, które przeciążone nim nie są zdolne do produkcji ATP i w krańcowych przypadkach mogą ulegać lizie [59]. Ischemia i późniejsza reperfuzja prowadzi także do wzrostu produkcji wolnych rodników w mitochondriach. Wapń jest aktywatorem wielu komórkowych proteaz i fosfolipaz. Zatem kolejną szkodliwą konsekwencją jego podwyższonego poziomu jest aktywacja tych enzymów. Fosfolipazy uszkodzają błony komórkowe uwalniając lizofosfolipidy i wolne kwasy tłuszczowe, które z kolei mogą inicjować metabolizm kwasu arachidonowego, skutkiem czego wzrasta produkcja wolnych rodników hydroksylowych [60]. Wolne rodniki inaktywują kluczowy enzym glikolityczny dehydrogenazę aldehydu-3-fosforowego [61]. Coretti [62] wykazał, że hamowanie glikolizy pojawia się równoległe ze wzrostem stężenia Ca^{2+} . Wysunął on zatem hipotezę, że wolne rodniki hamują glikolizę, co prowadzi do zaburzenia homeostazy wapniowej, przeciążenia komórki wapniem i ostatecznie dysfunkcji mięśnia sercowego.

Ogłuszenie mięśnia sercowego jest procesem obejmującym cały szereg zaburzeń komórkowych, między którymi występują wzajemne oddziaływania. Poznanie tego zjawiska jest jednak dotąd tylko fragmentaryczne, żadna bowiem z dotychczas przedstawio-

Odwracalna ischemia /reperfuzja



Ryc. 1 Schemat patogenezy poischemicznej dysfunkcji mięśnia sercowego zaproponowany przez Roberto Bolliego [28].

nych hipotez nie wyjaśnia go całkowicie. Ponieważ hipotezy te nie wykluczają się wzajemnie, można sądzić, że odnoszą się one do różnych elementów tego samego procesu, prowadzącego ostatecznie do upośledzenia funkcji skurczowej serca.

Artykuł otrzymano 6 kwietnia 1995 r.
Zaakceptowano do druku 20 kwietnia 1995 r.

Piśmiennictwo

1. Heyndrickx GR, Millard RW, Mc Ritchie R, Maroko PR, Vatner SF (1975) *J Clin Invest* **56**: 978-9854
2. Braunwald E, Kloner R (1982) *Circulation* **66**: 1146-1149
3. Kloner RA, De Boer LWR, Darsee JR, Ingwall JS, Hale S, Tumas J, Braunwald E (1981) *Am J Physiol* **241**: H591-H599
4. Lavallee M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF (1983) *Circ Res* **53**: 235-247
5. Bush LR, Buja LM, Samowitz W, Rude RE, Wathen M, Tilton GD, Willerson JT (1983) *Circ Res* **53**: 248-263
6. Tyson GS, Olsen CO, Meier GW, Davis JW, Sethi GK, Scott SM, Sabiston DC Jr, Rankin JS (1982) *Circulation* **66** (suppl): 16-25
7. Kida M, Fujiwara H, Uegaito T, Miyamae M, Ohura M, Miura I, Yabuuchi Y (1993) *J Mol Cell Cardiol* **25**: 875-885
8. Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E (1987) *J Clin Invest* **79**: 950-961
9. De Boer L, Ingwall J, Kloner R, Braunwald E (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 5471-5475
10. Neely JR, Grottyhann L W, (1984) *Circ Res* **55**: 816-824
11. Swain JL, Sabina RL, Mc Hale PA, Greenfield JC, Holmes EW (1982) *Am J Physiol* **242**: H818-H826
12. Vial C, Font B, Goldschmidt D, Pearlman AS, Delaje J (1978) *Cardiovasc Res* **12**: 470-476
13. McClellan G, Weisberg A, Winegard S (1983) *AM J Physiol* **245**: C423-C427
14. Greenfield RA, Swain JL (1987) *Circ Res* **60**: 283-289
15. Vial C, Font B, Goldschmit P, Gautheron DC (1979) *Biochem Biophys Res Commun* **88**: 1352-1359
16. Bittl JA, Weifeldt ML, Jacobus WE (1985) *J Biol Chem* **260**: 208-214
17. Hoffmeister H, Mauser M, Schaper W (1986) *Basic Res Cardiol* **81**: 264-269
18. Schaper W, Buchwald A, Hoffmeister H, Ito B (1985) *Circulation* **72**: (Suppl III) 119
19. Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R (1994) *Am J Cardiol* **73**: 2B-7B
20. Czubek UC (1993) *Pol Tyg Lek* **48**: 94-96
21. Braunwald E (1992) W: Heart Disease- A Textbook of Cardiovascular Medicine, W B Saunders Company, Philadelphia
22. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McKay PB (1988) *J Klin Invest* **82**: 476-485
23. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4695-4699
24. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Li X-Y, Triana JF, Lai EK, McCay (1990) *Am J Physiol* **259**: H1901-H 1911
25. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB (1989) *Circ Res* **65**: 607-622
26. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE (1987) *Circ Res* **60**: 700-707
27. Kitakaze M, Weisman HF, Marban E (1988) *Circulation* **80**: II-241 (suppl II)
28. Bolli R (1990) *Circulation* **82**: 723-738
29. Tani M, Neely JR (1989) *Circ Res* **65**: 1045-1056
30. Hata K, Takasago T, Saeki A, Nishioka T, Goto Y (1994) *Circ Res* **74**: 794-805

31. Krause S, Jacobus W, Becker L (1989) *Circ Res* **65**: 526-530
32. Limbruno U, Zucchi R, Ronca-Testoni S, Galbani P, Ronca G (1989) *J Mol Cell Cardiol* **21**: 1063-1072
33. Krause S, Hess ML (1984) *Circ Res* **55**: 176-184
34. Lamers JMJ, Duncker DJ, Bezstarosti K, Mc Falls EO, Sassen LMA, Verdouw P (1993) *Cardiovasc Res* **27**: 520-524
35. Frass O, Sharma HS, Knoll R, Duncker DJ, Schaper W (1993) *Cardiovasc* **27**: 2037-2043
36. Andres J, Moczarska A, Stępkowski D, Kąkol I (1991) *Basic Res Cardiol* **86**: 219-226
37. Hess ML, Krause SM, Greenfield LJ (1980) *J Thorac Cardiovasc Surg* **80**: 293-301
38. Krause SM (1990) *Am J Physiol* **259**: H813-H819
39. Kerrick WGL, Potter JD, Hoar PE (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 53-60
40. Murphy E, Steenbergen C, Levy LA, Raju B, London RE (1989) *J Biol Chem* **264**: 5622-5627
41. Morano I, Ruegg JC (1986) W: Jacob R (red) Controversial issues in cardiac pathophysiology. Steinkopff Verlag, Darmstadt, str 17-23
42. Ray KP, England PJ (1976) *FEBS Lett* **70**: 11-16
43. Hartzel HC (1984) *J Gen Physiol* **83**: 563-588
44. Hartzel HC (1985) *J Mol Biol* **186**: 185-195
45. Mair J, Wagner I, Jakob G, Lechleitner P, Dienstl F, Puschendorf B, Michel G (1994) *Clin Chim Acta* **231**: 47-60
46. Sato H, Hori M, Kitakaze M, Iwai K, Takashima S, Kurihara H, Inoue M, Kamada T (1993) *Circ Res* **72**: 361-375
47. Marcum JM, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 3771-3775
48. Yamamoto H, Fukunaga K, Goto S, Tanaka E, Miyamoto E (1985) *J Neurochem* **44**: 795-768
49. Schliwa M, Euteneur U, Buliński JC, Izant JG (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 1037-1041
50. Keith C, Di Paola M, Maxfield FR, Shelanski ML (1983) *J Cell Biol* **97**: 1918-1924
51. Reimer KA, Jenings RB (1986) W: Fozzard H A (red) Handbook of Physiology. Raven, New York, str 1133-1201
52. Word RA, Kamm KE, Stull JT, Casey ML (1990) *Am J Obstet Gynecol* **162**: 1103-1108
53. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A (1990) *Nature (Lond)* **344**: 114
54. Neely JR, Rovetto MJ, Whitmer JT, Morgan HE (1973) *Am J Physiol* **255**: 651-658
55. Neely JR, Whitmer JT, Rovetto MJ (1975) *Circ Res* **37**: 733-741
56. Owen P, Dennis S, Opie LH (1990) *Circ Res* **66**: 344-345
57. Paul RJ (1989) *Annu Rev Physiol* **51**: 331-349
58. Weiss j, Hiltbrand B (1985) *J Clin Invest* **75**: 436-447
59. Parr DR, Wilmhurst JM, Harris EF (1975) *Cardiovasc Res* **9**: 366-372
60. Murphy E, Aitcon JF, Horras CR, Liberman M (1983) *Am J Physiol* **245**: C316-321
61. Chatham J, Gilbert HF, Radda GK (1989) *Eur J Biochem* **184**: 657-662
62. Coretti MC, Koretsune Y, Kusuoka H, Chacko VP, Zweier JL, Marban E (1991) *J Clin Invest* **88**: 1014-1025

Prenumerata „Postępów Biochemii” w 1995 r.

Prenumerata dla instytucji — 580 zł

Indywidualna — 280 zł

50% zniżki dla członków PTBioch.

Cytoszkieleł komórek mięśniowych

The cytoskeleton of muscle cells

RENATA DĄBROWSKA¹
MARIA A. GRAZIEWICZ²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Organizacja i skład białkowy cytoszkieletu różnego typu mięśni
 - II-1. Cytoszkieleł wewnętrzny i zewnętrzny aparatu skurczu
 - II-1.1. Mięśnie poprzecznie prążkowane
 - II-1.2. Mięśnie gładkie
 - II-2. Cytoszkieleł podbłonowy
 - II-2.1. Mięśnie poprzecznie prążkowane
 - II-2.2. Mięśnie gładkie
- III. Uwagi końcowe

I. Wprowadzenie

Obecność w komórkach mięśniowych aparatu skurczu, złożonego z dwóch białek podstawowych — aktyny i miozyny, oraz szeregu białek regulatorowych, umożliwia zachodzenie wszelkich związanych z ruchem procesów, od przemieszczania się całych organizmów, do przebiegu różnych procesów fizjologicznych, takich jak regulacja ciśnienia i szybkości przepływu krwi, perystaltyka jelit czy skurcze macicy [1]. Sprawne działanie aparatu skurczu uzależnione jest od właściwego ułożenia i integracji białek domeny kurczliwej oraz utrzymania ciągłości i spójności komórki mięśniowej w trakcie wykonywanej pracy. Prowadzone od lat badania wykazały, że funkcje te spełnia złożona, dynamiczna, struktura białkowa cytoszkieletu. Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie organizacji przestrzennej cytoszkieletu komórek mięśniowych kręgowców, oraz jego białkowych składników i roli jaką spełniają.

Komórki dwóch różnych typów tkanki mięśniowej, mięśni poprzecznie prążkowanych (mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego) i mięśni gładkich, znacznie różnią się między sobą zarówno pod względem organizacji, jak i składu białkowego cytoszkieletu [2-4]. Wysoko zorganizowana, stabilna struktura aparatu skurczu komórek mięśni poprzecznie prążkowanych utrzymywana jest przez podporowy cytoszkieleł we-

Contents:

- I. Introduction
- II. Organization and protein composition of cytoskeleton of various muscle types
 - II-1. Intra- and inter-contraction apparatus cytoskeleton
 - II-1.1. Cross-striated muscle
 - II-1.2. Smooth muscle
 - II-2. Subsarcolemmal cytoskeleton
 - II-2.1. Cross-striated muscle
 - II-2.2. Smooth muscle
- III. Concluding remarks

wewnętrzny, złożony z elastycznych filamentów tytynowych (mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy) i filamentów nebulinowych (mięśnie szkieletowe) oraz cytoszkieletu zewnętrznego (na zewnątrz aparatu skurczu) złożonego z filamentów pośrednich. Mniej uporządkowany aparat skurczu komórek mięśni gładkich nie zawiera białek podporowych, a jego architekturę utrzymuje cytoszkieleł zewnętrzny utworzony przez filamety pośrednie i cytoszkielełowe filamety aktynowe oraz białka z nimi związane. W obydwu typach mięśni cytoszkielełowe filamety łączą się z dyskami Z zwanymi również liniami lub prążkami Z, lub odpowiadającymi im ciałkami gęstymi, i z cytoszkieletem podbłonowym co zapewnia integralność mechaniczną komórek mięśniowych.

II. Organizacja cytoszkieletu różnego typu mięśni

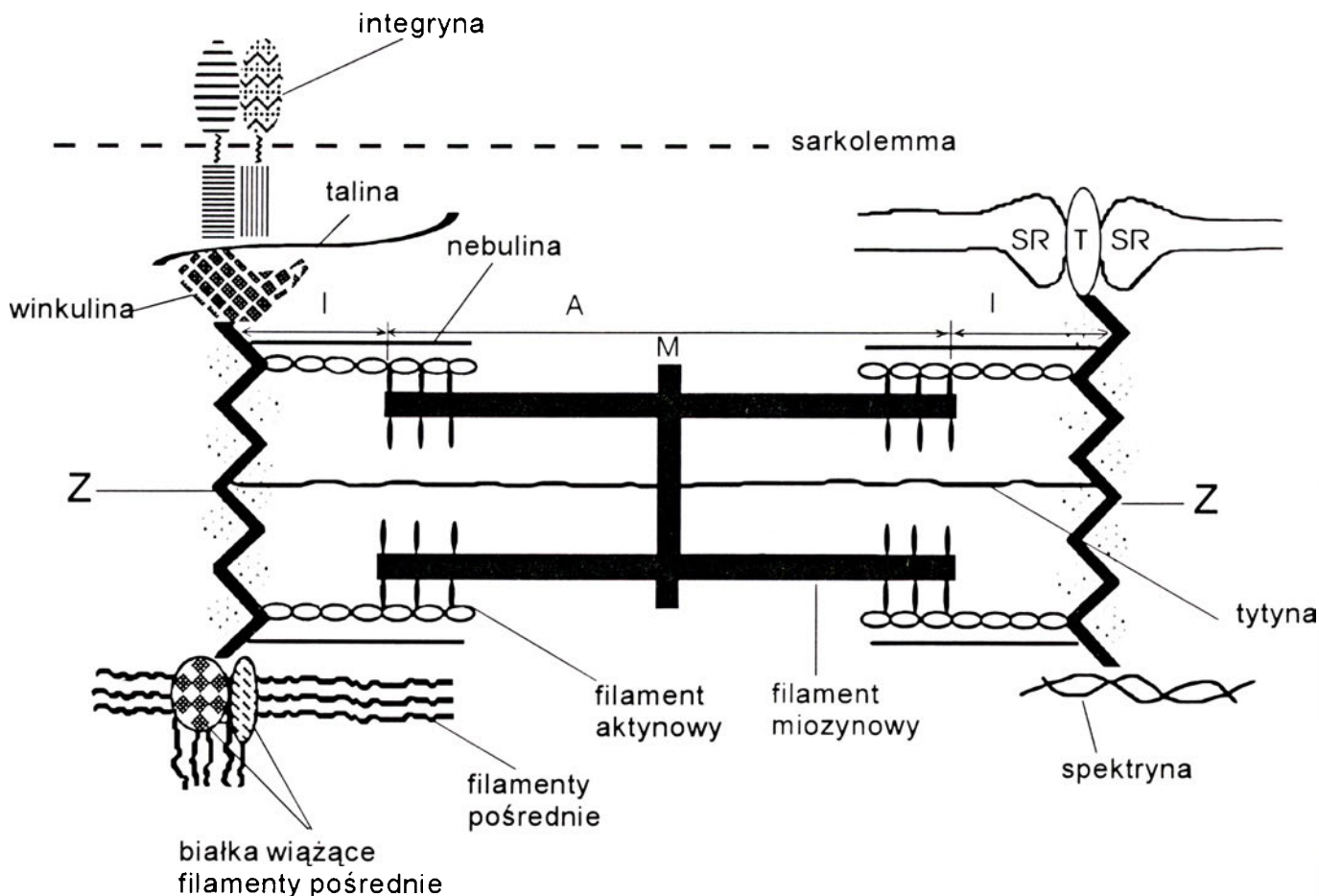
II-1. Cytoszkieleł wewnętrzny i zewnętrzny aparatu skurczu

II-1.1. Mięśnie poprzecznie-prążkowane

Wewnętrzny cytoszkieleł podporowy filamentów miozynowych i aktynowych aparatu skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych tworzą filamentowe struktury nierozpuszczalnych, wysokocząsteczkowych białek tytyny (konektyny) i nebuliny [5, 6].

Tytyna tworzy tzw. filamety elastyczne, które, zakotwiczone w dysku Z (prawdopodobnie poprzez α -aktyninę), przebiegają przez połowę sarkomeru wzdłuż prążka I i A, i łączą się z linią M (prawdopodobnie poprzez białko 190 kDa i miomezynę) [7-12]

¹ Prof. dr hab., Zakład Biochemii Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa, ² mgr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa



Ryc. 1 Schemat sarkomeru mięśni poprzecznie prążkowanych pokazujący w sposób uproszczony organizację struktur komórkowych cytoszkieletu i aparatu skurczu, a także białek związanych z dyskiem Z (wg V i g o r e a x [61]). Z i M obszary sarkomeru o większej gęstości optycznej zwane odpowiednio dyskiem Z i linią M. A, prążek anizotropowy; I, prążek izotropowy; SR, sarkoplazmatyczne retikulum; T, kanalik systemu poprzecznego.

(Ryc. 1). Filamenty tytynowe wiążą się z pałeczkowatą częścią cząsteczek miozynowych na całej długości filamentu miozynowego, a także z białkami C i 86 kDa, które są związane z filamentami miozynowymi [13, 14]. Stąd tylko odcinek tytynowego filamentu w prążku I wykazuje dużą elastyczność [15, 16]. Tytyna pojawia się we wczesnym etapie miofibrilogenezy i bierze w niej czynny udział określając długość filamentów miozynowych i ich organizację [17-19]. W mięśniach dojrzałych odpowiada za naprężenie włókien w stanie spoczynku, a także stabilność rozmieszczenia filamentów miozynowych podczas skurczu mięśni [20-22].

Tytyna stanowi 8-12% białek mięśni szkieletowych i serca [23], ma formę wydłużonej pałeczki (o długości 900 nm i średnicy 3-4 nm) [11], a jej masa cząsteczkowa wynosi 2500 kDa [24]. Częściowa sekwencja aminokwasowa tytyny z mięśni szkieletowych królika ujawniła, że cząsteczka tego białka zbudowana jest z dwóch rodzajów domen z których każda składa się ze 100 reszt aminokwasowych powtarzających się na całej długości białka [25, 26]. Pierwsza z domen wykazuje podobieństwo do domeny typu III fibronektyny, druga, do regionów C-2 immunoglobuliny. Obydwie te domeny ułożone są w powtarzającą się 11-domenową sekwencję, która jest odbiciem powtarzających się regionów helikalnych w filamentach miozyno-

wych [26]. Głównym elementem struktury II-rzędowej tytyny jest struktura β [27, 28].

Białka o analogicznej do tytyny strukturze i funkcji znaleziono także w mięśniach szkieletowych szeregu bezkręgowców. Jednym z nich jest twiczyna, białko o masie 670 kDa występujące u przedstawiciela nicienia *Caenorhabditis elegans*. Podobnie jak tytyna, twiczyna zawiera ułożone w sposób powtarzalny domeny białkowe zbliżone składem aminokwasowym do domen immunoglobulin i fibronektyny [29, 30]. Ze względu na mniejszą długość cząsteczki (w porównaniu z tytiną), twiczyna łączy dysk Z z końcem filamentów miozynowych, nie wchodząc w obszar prążka A [31, 32]. Przypuszcza się, że podobnie jak tytyna, odgrywa ona rolę w regulacji aktywności miozyny [29, 33].

Innym białkiem, które odgrywa zbliżoną do tytyny rolę u organizmów bezkręgowych jest projektyna [31, 34], zwana również mini-tytiną [28, 32] o masie 600-700 kDa, występująca w mięśniach szkieletowych latających owadów.

Nebulina tworzy filamenty nierozciągliwe, które zakotwiczone są w dysku Z i przebiegają wzdłuż filamentów aktynowych [7, 8, 10, 35] (Ryc. 1). Ich występowanie ograniczone jest do mięśni szkieletowych [36, 37]. Nebulina ma masę 600-900 kDa i jest najdłuższym (około 1 μ m) z poznanych dotąd białek

wiązających aktyne [35, 37]. Jej główną funkcją jest stabilizacja i regulacja długości filamentów aktynowych, o czym świadczy ścisła współzależność długości filamentów aktynowych i filamentów nebulinowych [38, 39].

Cząsteczka nebuliny składa się z dwustopniowo ułożonych powtarzających się domen [40, 41]. Pierwszy 35-aminokwasowy motyw powtarza się więcej niż 200 razy wzdłuż cząsteczki, drugi występuje wewnątrz tych powtórzeń w odstępach 245 reszt aminokwasowych co odpowiada siedmiokrotnemu powtórzeniu jednostki 35-aminokwasowej [39, 42]. Przypuszcza się, że te jednostki sekwencji tworzą wiele (100-200) miejsc wiązania aktyny wzdłuż cząsteczki nebuliny [38, 39]. W ten sposób powstaje podobny do zamka błyskawicznego filament aktynowo-nebulinowy [43]. Przy założeniu, że nebulina przyjmuje strukturę helikalną i 35-aminokwasowa jednostka wiąże 1 monomer aktyny, zaproponowano hipotetyczny model budowy kompleksu F-aktyna-nebulina *in vivo*. Wskazuje on, że dwa filamety nebuliny usytuowane są w rowkach podwójnej spirali filamentu aktynowego [44]. Badania sklonowanych fragmentów nebuliny ludzkiej wykazały jednak, że białko to *in vitro* łatwiej wytwarza struktury β niż strukturę helikalną [45]. Nie można jednak wykluczyć konformacyjnych zmian w cząsteczce nebuliny pod wpływem wiązania filamentów aktynowych.

Ostatnie badania wskazują, że nebulina w mięśniach szkieletowych, podobnie jak kaldesmon w mięśniach gładkich [46], może odgrywać rolę w zależnej od Ca^{2+} regulacji skurczu. Przemawia za tym hamowanie aktywności ATPazy aktomiozynowej i ruchu filamentów aktynowych wobec immobilizowanych cząsteczek miozyny przez fragment końca N nebuliny. Fragment ten wykazuje silne powinowactwo nie tylko wobec aktyny ale i wobec miozyny i usytuowany jest w sarkomerze dystalnie w stosunku do dysku Z, tj w miejscu oddziaływania filamentów aktynowych z miozynowymi [47]. Hamowanie tych procesów w obecności Ca^{2+} jest znoszone przez kalmodulinę.

Jednym z głównych elementów włóknistych cytoszkieletu zewnętrznego wszystkich typów mięśni jest białko zwane desminą [48] (lub szkieletyną [2, 49]) tworzące sieć filamentów pośrednich o średnicy około 10 nm [50]. Masa cząsteczkowa desminy z różnych komórek mięśniowych waha się od 52 do 55 kDa [2, 48]. Wszystkie jej izoformy są w wysokim stopniu homologiczne: niewielkie jedynie różnice w składzie aminokwasowym sprawiają, że np. desmina pochodząca z komórek mięśni ssaków ma charakter silniej kwasowy niż desmina wyizolowana z komórek mięśni ptaków [51]. Desmina, podobnie jak inne białka tworzące filamety pośrednie, składa się z centralnej, konserwatywnej domeny helikalnej (47 nm), która dzięki powtarzalności siedmiu hydrofobowych reszt aminokwasowych wytwarza dwuniciowe superhelikalne segmenty, i dwu domen końcowych [52]. Różnice w sekwencji domeny końca N determinują występowanie

nie izoform desminy. Wykazano, że trzon filamentów pośrednich o średnicy 8-9 nm stanowią superhelikalne segmenty, a domeny końcowe wysunięte są na zewnątrz zwiększając w ten sposób średnicę filamentów [53].

Główną funkcją filamentów desminowych jest utrzymywanie przestrzennej organizacji składników komórkowych podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni, ale jako elementy elastyczne odpowiadają, podobnie jak filamety tytinowe, za naprężenie spoczynkowe mięśni [54]. Ścisłe upakowanie miofibrilli sprawia, że w mięśniach poprzecznie prążkowanych dorosłych zwierząt filamety desminowe są prawie niewidoczne [55]. W trakcie miogenezy mięśni poprzecznie prążkowanych można obserwować zmiany w ich organizacji i strukturze. Początkowo są rozproszone w cytoplazmie i dobrze widoczne, w trakcie dalszego rozwoju komórki mięśniowej następuje ich kondensacja w obrębie nowopowstałych dysków Z i na koniec wytwarzają sieć filamentów biegnącą w poprzek włókna mięśniowego łączącą dyski Z kolejnych sarkomerów wzdłuż miofibrilli [56]. Filamety desminowe łączą także dyski Z z błoną plazmatyczną oraz innymi błonowymi strukturami komórki poprzez wysokocząsteczkowe białka: syneminę (230 kDa) [57], paraneminę (280 kDa) [58] i plektynę (300 kDa) (Ryc. 1) [59].

Organizacja strukturalna dysków Z, a także ich skład białkowy w mięśniach poprzecznie prążkowanych jest różny w zależności od rodzaju włókien mięśniowych oraz od gatunku zwierząt [60, 61]. We wszystkich mięśniach poprzecznie prążkowanych dyski Z bogate są w α -aktyninę i penetrowane przez filamety aktynowe pochodzące z sąsiednich sarkomerów, sieciowane na poziomie dysków Z przez α -aktyninę [60]. Obok α -aktyminy w dyskach Z mięśni szkieletowych kręgowców występuje także wiele innych białek, takich jak Z-nina [62], białko 220 kDa [63], białko Z [64], amorfina [65], zeugmatyna [66], Eu-aktynina [67], białko 32 kDa [68] oraz Cap Z, białko składające się z dwóch podjednostek (32 i 36 kDa), które blokuje wzrastające końce filamentów aktynowych [69]. W dysku Z poprzecznie prążkowanych mięśni bezkręgowców występują specyficzne białka: ketyna [70] oraz białka Z (400/600) [71], Z(210) [72] i Z(175) [73]. Charakterystykę molekularną wymienionych białek i ich występowanie podano w tabeli 1. Dokładnego rozmieszczenia poszczególnych białek w dysku Z jeszcze nie poznano, ale wiadomo, że jedne tworzą trudne do ekstrakcji struktury filamentowe, a inne łatwo rozpuszczalną amorficzną matriks wypełniającą przestrzeń między filamentami [74]. Wyniki badań mechanicznych pokazują, że dysk Z nie ulega deformacji podczas biernego rozciągania mięśni, natomiast podlega strukturalnym zmianom w odpowiedzi na aktywne naprężenie. Wyniki te sugerują, że dysk Z zbudowany jest z dwu domen [75]. Jedna z domen działa jako składnik aparatu skurczu, a druga, sztywniejsza jako składnik cytoszkieletu.

Tabela 1.

Strukturalne białka dysku Z.

Białko	Masa cząsteczkowa (kDa)		Występowanie	Piśmiennictwo
	Podjednostka	Natywne białko		
Aktyna	42	filament	wszystkie typy mięśni	[60, 61]
α -aktynina	94-103	homodimer	wszystkie typy mięśni	[60, 89]
Amorfina	85	85	mięśnie szkieletowe	[65]
CapZ	32 (α) 36 (β)	$\alpha\beta$ -heterodimer	mięśnie szkieletowe i sercowy	[69]
Eu-aktynina	42	homodimer (?)	mięśnie szkieletowe i sercowy	[67]
Ketyna	500 700	?	mięśnie skrzydeł i nóg owadów	[70]
220 000	220	220 (?)	mięśnie szkieletowe	[63]
32 kDa	32	32 (?)	mięśnie szkieletowe	[68]
Zeugmatyna	500-1000	2 \times 500-1000	wszystkie typy mięśni	[66]
Z(210)	210	?	mięśnie skrzydeł <i>Drosophila</i>	[72]
Z(400/600)	400 600	?	wszystkie mięśnie owadów	[71]
Z(175)	175 158	?	mięśnie skrzydeł pszczoły	[73]
Z-nina	300-400	?	mięśnie szkieletowe	[62]
Białko Z	55	4 \times 55	mięśnie szkieletowe	[64]

II-1.2. Mięśnie gładkie

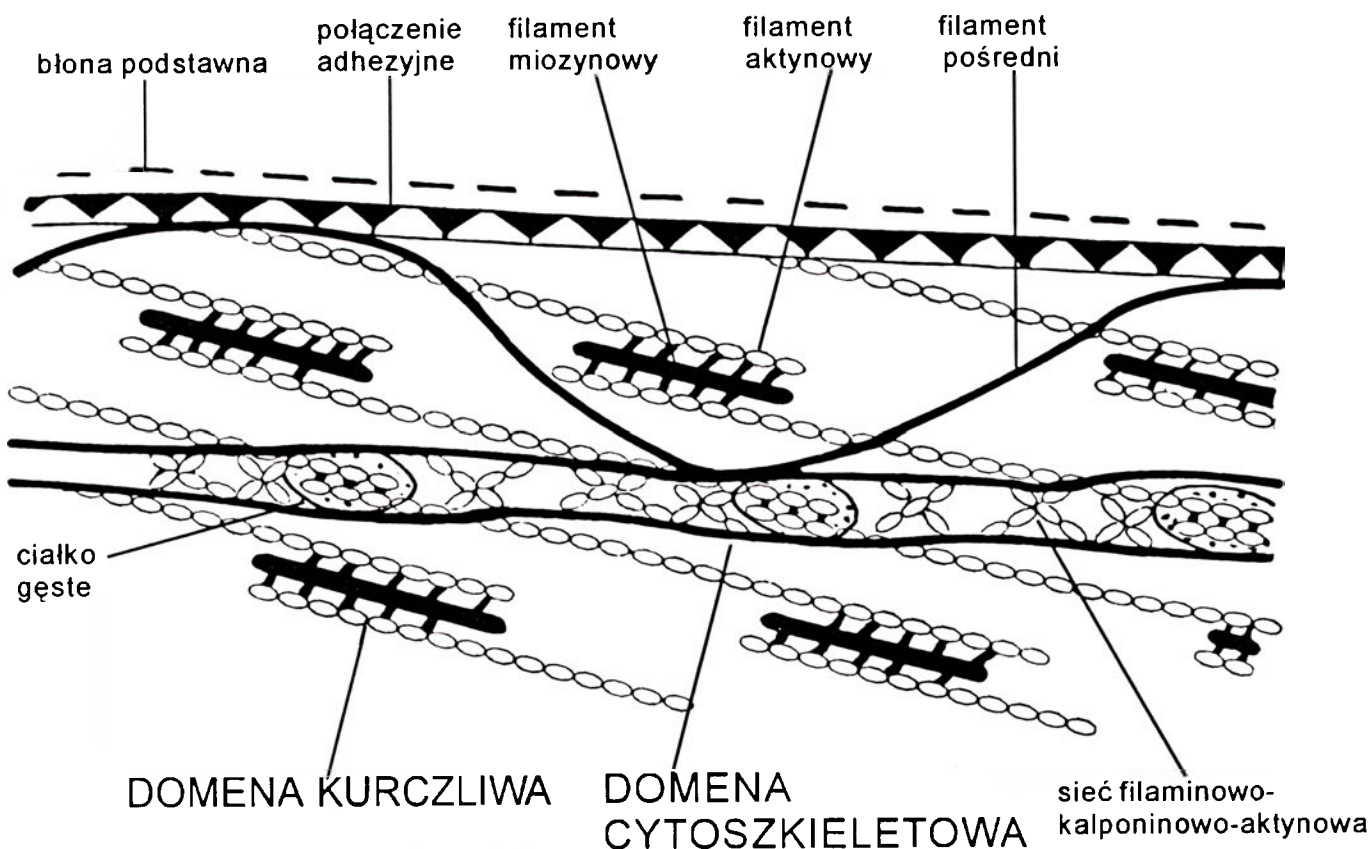
W przeciwieństwie do mięśni poprzecznie prążkowanych, których aparat skurczu ma bardzo regularną, sarkomeryczną budowę, precyzyjna organizacja filamentów miozynowych i aktynowych aparatu skurczu mięśni gładkich nie została jeszcze wyjaśniona [76-78]. Badania ultrastrukturalne pozwoliły w komórce mięśni gładkich rozróżnić tzw. domenę kurczliwą i domenę cytoszkieletową [78, 79] (Ryc. 2). Wewnątrz domeny kurczliwej nie zidentyfikowano dotychczas ani filamentów elastycznych tytyny, ani nebuliny, co pozostaje w zgodzie ze znacznie mniej regularną organizacją aparatu skurczu mięśni gładkich. Domenę cytoszkieletową tworzy sieć filamentów pośrednich biegnąca wzdłuż długiej osi komórki łącząca elektronowo gęste struktury cytoplazmatyczne (ciałka gęste) i błonowe (płytki gęste) oraz cytoszkieletowe filamety aktynowe [80, 81].

Głównym składnikiem filamentów pośrednich w większości komórek mięśni gładkich (mięśnie żołądków ptaków [49, 82], mięśnie macicy i żołądków ssaków [49, 51]), podobnie jak mięśni poprzecznie prążkowanych, jest desmina. Jednakże, w innych mięśniach gładkich (mięśnie ścian naczyń krwionośnych organizmów wyższych, w tym także człowieka) zamiast desminy filamety pośrednie tworzy wimentyna [83, 84]. To białko o masie 52 kDa ma strukturę podobną do desminy [85-87] i może z nią wytwarzać kopolimerowe filamety pośrednie [88]. Miejszem odpowiedzialnym za bezpośrednie połączenie filamentów pośrednich z domeną kurczliwą są cytoplazmatyczne owalne ciałka gęste regularnie rozmieszczone w cytoplazmie, będące odpowiednikami dysków Z w mięśniach poprzecznie prążkowanych [78]. Są one bogate w α -aktyninę (110 kDa), która dzięki tworzeniu dimerów łączy filamety aktynowe w wiązki i przymo-

cowuje je do ciałek gęstych [89]. Wykazano, że miejsce wiązania aktyny znajduje się w końcu N cząsteczki α -aktyniny, podczas gdy region C-końcowy jest odpowiedzialny za jej zdolność do tworzenia dimerów [90]. Innymi zidentyfikowanymi dotychczas składnikami białkowymi odpowiedzialnymi za organizację struktury ciałek gęstych są kalponina [91] i zeugmatyna [66].

Mimo ścisłego połączenia z ciałkami gęstymi, filamety pośrednie nie decydują o ich przestrzennym rozmieszczeniu w komórce. W komórce skróconej obserwuje się *in vitro* regularnie ułożone szeregi ciałek gęstych mimo zaburzenia organizacji filamentów pośrednich [78], co wskazuje, że pozycja ciałek gęstych jest wymuszona przez aparat skurczu. Z filamentami pośrednimi zbudowanymi zarówno z desminy, wimentyny jak i z obu tych białek związane są: wysokocząsteczkowe białko synemina (230 kDa) [57] i epinemina (44 kDa) [92]. Funkcja tych białek nie została jeszcze poznana.

Oprócz filamentów pośrednich cytoszkielet mięśni gładkich tworzą filamety aktynowe, które różnią się od filamentów aktynowych aparatu skurczu tym, że tworzy je cytoplazmatyczna izoforma β -aktyny, a nie izoformy α i γ , charakterystyczne dla filamentów aktynowych domeny kurczliwej [93]. Z cytoszkieletowymi filamentami aktynowymi związane są dwa białka wiążące aktynę i sieciujące filamety aktynowe, wysokocząsteczkowa filamina (250 kDa) [78, 94] i niskocząsteczkowa kalponina (32 kDa) [91, 95]. Ta sieć filamentów aktynowych wypełnia przestrzeń między filamentami pośrednimi, a także występuje w rejonach połączeń typu adhezyjnego (*adherens junction*) (Ryc. 2). Miejszem zakotwiczenia filaminowo-kalponinowo-aktynowej sieci, podobnie jak sieci filamentów pośrednich, są ciałka gęste i płytki gęste [91, 94]. W ten sposób cytoszkielet komórkowy połączony



Ryc. 2 Schematyczna ilustracja organizacji cytoszkieletu i aparatu skurczu mięśni gładkich (wg Smal1'a i inn. [4]).

jest z aparatem skurczu i powierzchnią komórki. Taka organizacja przeciwdziała nadmiernemu rozciąganiu i skracaniu domeny kurczliwej mięśni gładkich. Dowodem na to jest zwiększenie liczby filamentów pośrednich i filaminy w odpowiedzi na eksperymentalnie indukowane zwężenie jelita [96] lub rozszerzenie naczyń krwionośnych [97] czy pęcherza moczowego [98].

III. Cytoszkielet podbłonowy komórek mięśniowych

III-1.1. Mięśnie szkieletowe

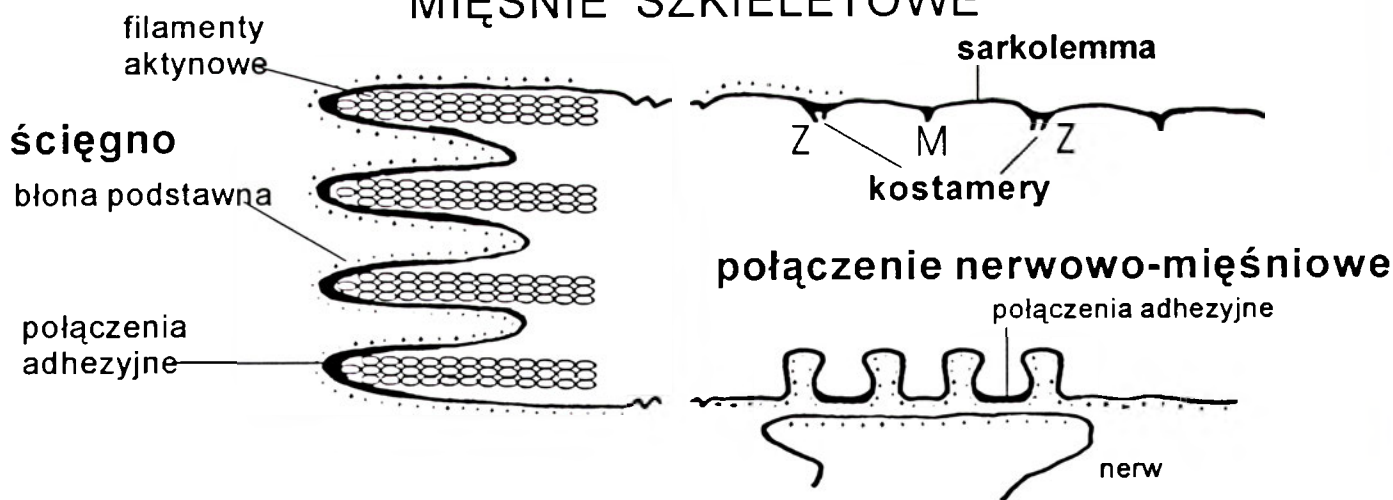
W błonie plazmatycznej komórek mięśniowych można wyróżnić dwa rodzaje na przemian występujących obszarów; tylko w jednym z nich znajdują się miejsca zakotwiczenia filamentów pośrednich i filamentów aktynowych [99]. W przypadku mięśni poprzecznie prążkowanych ten region stanowią połączenia mięśni ze ścięgnami (mięśnie szkieletowe) oraz połączenia sąsiadujących ze sobą komórek (wstawki) (*intercalated disks*) (mięsień sercowy) [4] (Ryc. 3). Białka cytoszkieletu podbłonowego biorą ponadto udział w wytwarzaniu synaps nerwowo-mięśniowych, a także połączeń między miofibrilami i sarkolemmą.

Powiązanie miofibryli z sarkolemmą mięśni szkieletowych poprzez filamenty pośrednie i filamenty aktynowe przebiega na poziomie peryferyjnych dysków Z [100]. W skład tych podbłonowych połączeń, o charakterze połączeń adhezyjnych, wchodzi białka:

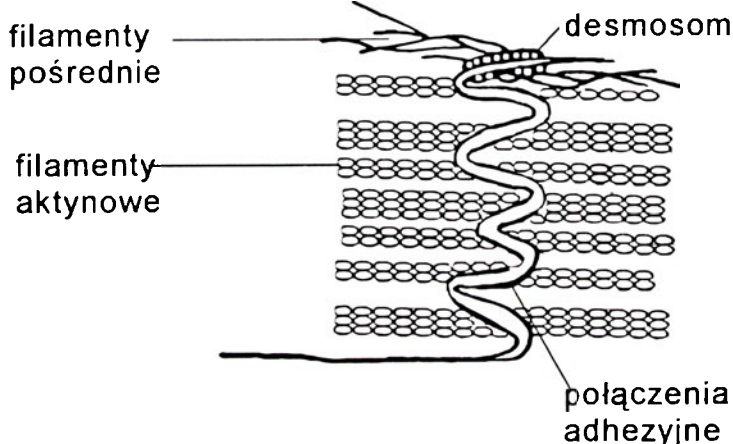
talina [101], winuklina [100, 102], spektryna [102-104], ankiryne [105] i acykulina [106] (Tab. 2). Białka te są bądź skumulowane w regularnych odstępach w postaci poprzecznych linii wzdłuż błony, bądź tworzą kostamery [100]. Przypuszcza się, że istnieje również połączenie podbłonowego cytoszkieletu z linią M peryferyjnych miofibryli [107], chociaż składników struktur łączących jeszcze nie zidentyfikowano.

Powszechnie występującym składnikiem cytoszkieletu podbłonowego mięśni jest dystrofina, białko o masie 400 kDa stanowiące około 5% puli białek cytoszkieletu podbłonowego mięśni szkieletowych, które nadaje sprężystość błonie komórkowej podczas cyklu skurczowo-rozkurczowego [108]. Częsteczką dystrofiny o długości 125 nm [109] składa się z czterech domen: domeny N-końca wiążącej aktynę (homologicznej do konserwatywnych miejsc wiążących aktynę α -aktyniny i spektryny [110]), długiej domeny helikalnej (o powtarzalności reszt aminokwasowych podobnej jak w spektrynie), bogatej w cysteinę domeny wiążącej jony wapnia i domeny C-końcowej [111]. Kompleks dystrofin-aktyna uczestniczy w tworzeniu podbłonowego cytoszkieletu i jest prawdopodobnie odpowiedzialny za utrzymanie stabilności błony komórkowej [112]. Dystrofina wiąże się również z białkami błonowymi i w ten sposób wytwarza połączenie między wewnątrzkomórkowymi filamentami aktynowymi i zewnątrzkomórkową matriks w obszarach błony komórkowej, w których brak jest połączeń typu adhezyjnego [113].

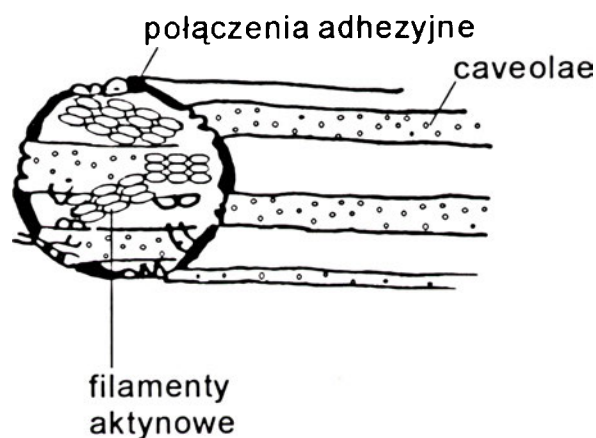
MIĘŚNIE SZKIELETOWE



MIĘŚIEN SERCOWY



MIĘŚNIE GŁADKIE



Ryc. 3 Podbłonowy cytoszkielet komórek mięśni różnego typu (wg S m a 11^a i inn. [4]). Z — połączenie z dyskiem Z, M — połączenie z linią M.

Powiązanie włókno mięśniowe-ścięgno następuje poprzez filamenty aktynowe, wychodzące z końcowego dysku Z miofibryli [114, 115] (Ryc. 3). W połączeniu ich ze ścięgnem biorą udział dwa białka cytoszkieletu podbłonowego talina i winkulina [91, 116], oraz ułożone w poprzek błony plazmatycznej — integryny, które zapewniają połączenie z białkami matriksu błony podstawnej: lamininą i proteoglikanami [117]. Połączenie włókno mięśniowe-ścięgno wzmacnia dystrofina, która skumulowana jest w fałdach sarkolemy i bierze prawdopodobnie udział w przekazywaniu naprężenia z filamentów aktynowych poprzez błonę komórkową do ścięgna [116]. Ostatnio udowodnione oddziaływanie dystrofiny z taliną może służyć dodatkowemu połączeniu cytoszkieletu podbłonowego (poprzez integryny) z białkami zewnątrzkomórkowej matriks [118].

W odróżnieniu od połączenia włókna mięśnia szkieletowego ze ścięgnem, które jest miejscem specyficznego wiązania filamentów aktynowych, wstawki komórek mięśnia sercowego posiadają również domeny zakotwiczenia filamentów pośrednich (typu desmoso-

malnego i typu połączeń adhezyjnych) [119] (Ryc. 3). W skład tych domen wchodzi szereg dodatkowych białek, charakterystycznych dla połączeń międzykomórkowych, takich jak: tenuina [120], radiksyna [121] i białko 220 kDa [122] (Tab. 2).

Białka cytoszkieletu podbłonowego mięśni szkieletowych są również zaangażowane w tworzenie synaps nerwowo-mięśniowych. Błona postsynaptyczna tych połączeń posiada dwa rodzaje domen: domeny obfitujące w receptory acetylocholinowe (AChR), które położone są blisko zakończeń komórek nerwowych, i domeny pozbawione tych receptorów, wpukłone do wnętrza komórki mięśniowej [123]. Nagromadzenie AChR w błonie postsynaptycznej zachodzi pod wpływem białka błony podstawnej, agryny (o masie 220 kDa) [124, 125]. W mechanizmie nagromadzenia AChR i/lub stabilizacji wytworzonych agregatów biorą również udział białka cytoszkieletowe wiążące AChR: białko o masie 43 kDa (na którego agregatach tworzą się mikroagregaty AChR) [126, 127], utrofina, białko homologiczne do dystrofiny o masie 300 kDa, specyficzne dla synaps nerwowo-mięśniowych dojrze-

Tabela 2.

Strukturalne białka cytoszkieletu podbłonowego komórek mięśniowych i ich występowanie.

Białko	Cytoszkielet podbłonowy									Piśmiennictwo
	mięśnie szkieletowe		mięśnie szkieletowe i sercowy			mięsień sercowy	mięśnie gładkie			
	połączenie mięsień-ścięgno	synapsa nerwo-mięśniowa	dysk Z	kostamer	sarkolemma	wstawka	połączenie adhezyjne	<i>caveolae</i>	plytki gęste	
Aktyna	+	+	+	+	+	+	+	+	+	[4, 99]
Winkulina	+	+		+	+	+	+			[100, 102, 132]
Metawinkulina				+		+	+			[140]
α -aktynina		+	+			+	+		+	[89, 90, 99, 110, 132, 139]
Talina	+			+	+		+			[89, 101, 139]
Filamina		+				+	+			[89, 133, 139]
Kalponina									+	[91, 95]
Radiksyna						+				[121]
Tenuina						+				[120]
220 kDa						+				[122]
Zeugmatyna						+	+		+	[66]
Desmina			+			+			+	[2, 48]
Plektyna			+			+	+		+	[59]
Dystrofina					+			+		[108, 111, 112, 136]
Utrofina		+								[128]
Spektryna		+		+	+					[102-104, 135]
Ankiryna		+		+	+					[105, 137]
Integryna	+						+			[117, 142]
Kadheryna						+				[141]
AChR		+								[123]
43 kDa		+								[126, 127]
58 kDa	+	+								[129]
Acykulina	+		+	+			+			[106]

łych mięśni szkieletowych [128] (które sprzyja wzrostowi agregatów AChR [126]), glikoproteina podbłonowa (syntrofina), o masie 58 kDa [129] oraz glikoproteiny błonowe związane z utrofiną, homologiczne do tych, które wiążą dystrofinę [111]. Agryna wiąże się w sposób zależny od jonów wapnia z zewnątrzkomórkowym α -dystroglikanem (156 kDa) i poprzez glikoproteiny błonowe łączy utrofinowy cytoszkielet z zewnątrzkomórkową matriks synapsy [130]. W rejonie błony postsynaptycznej w komórkach mięśni poprzecznie prążkowanych, zarówno u form embrionalnych jak i noworodków kręgowców, stwierdzono obecność białek: winkuliny, α -aktyniny i filaminy [131], co pozwala sądzić, że białka te, podobnie jak agryna, mogą brać udział w procesie różnicowania synaps nerwowo-mięśniowych. Przypuszcza się, że α -aktynina i winkulina biorą udział w połączeniu składników zewnątrzkomórkowej matriks z wewnątrzkomórkowymi filamentami aktynowymi [132], natomiast filamina poprzez sieciowanie filamentów aktynowych stabilizuje to połączenie [133]. Oprócz wymienionych białek w rejonie synaps nerwowo-mięśniowych obecne są również talina [134], spektryna (izoforma β) [135] i dystrofina (obecna w miejscach wpuklonych błony postsynaptycznej) [124, 136] oraz ankiryna [137], pośredniczące w kontaktach między białkami cytoszkieletu i zewnątrzkomórkową matriks (Tab. 2).

III-1.2 Mięśnie gładkie

W mięśniach gładkich podbłonowe połączenia z filamentami aktynowymi cytoszkieletu są wytwarzane na całej długości błony komórkowej przez na przemian usytuowane płytki gęste (należące do typu połączeń adhezyjnych) i pęcherzykowate wpuklenia sarkolemy (*caveolae*) [138] (Ryc. 3). Pierwsze z nich zawierają: α -aktyninę, filaminę winkulinę, talinę [89, 139] oraz dodatkowo metawinkulinę [140] i kalponinę [91] (Tab. 2) i są typowymi miejscami przymocowania filamentów aktynowych do błony komórkowej poprzez ułożone w poprzek błony plazmatycznej białka, kadheryny [141] i integryny [142]. Składnikiem drugich jest dystrofina również wiążąca cytoplazmatyczne filamety aktynowe [136]. Cytoplazmatyczne filamety pośrednie przyłączają się do płytek gęstych prawdopodobnie poprzez plektynę [59].

III. Uwagi końcowe

Mimo stosunkowo krótkiej, bo 20 letniej, historii badań cytoszkieletu komórek mięśniowych uzyskano już bardzo wiele cennych informacji dotyczących jego architektury, składu białkowego i funkcji. Rozwój metod mikroskopowych m.in. przez zwiększenie kontrastu w mikroskopii optycznej przy pomocy techniki

wideo oraz zwiększenie rozdzielczości mikroskopii fluorescencyjnej [143], przyczynił się do znacznego postępu w badaniach organizacji cytoszkieletu komórek mięśniowych, jego dynamiki i powiązań z aparatem skurczu. Rozpoczęto badania nad rolą poszczególnych składników białkowych w funkcjonowaniu cytoszkieletu metodami genetyki molekularnej. Dotychczasowe badania przeprowadzono wyłącznie przy użyciu mięśni bezkręgowców (*C. elegans* i *Drosophila*). Analiza mutantów, które powodują zaburzenia w pracy mięśni wykazała na przykład, że mutacja kodująca go winkulinę genu *deb1* powoduje paraliż *C. elegans* wywołany dezorganizacją mięśni. Może być on cofnięty po wstrzyknięciu do mięśni genu winkuliny typu dzikiego [144]. Mutacje w *Drosophila*, których wynikiem jest zablokowanie lub redukcja syntezy α -aktyniny, powodują niezdolność mutantów do latania [145]. Ich mięśnie mają zaburzoną organizację sarkomerów, szczególnie na poziomie dysków Z i linii M.

Cytoszkielet jest strukturą dynamiczną, ulegającą ciąglej reorganizacji w zależności od stanu fizjologicznego mięśni. Czynniki determinującymi reorganizację cytoszkieletu mogą być procesy modyfikacji, bądź degradacji jego białkowych składników. Jakkolwiek zarówno tytyna jak i nebulina ulegają fosforylacji (*in vivo*) [146], jej wpływ na strukturę tych białek nie został dotychczas opisany. Fosforylacja wimentyny (*in vitro*), przy udziale kinazy zależnej od cyklicznego AMP lub kinezy białkowej C [147], powoduje rozpad jej filamentów [147]. Desmina i wimentyna ulegają ponadto degradacji *in situ* przez zależną od jonów wapnia obojętną proteazę, która odcina 9 kDa peptyd końca N cząsteczek obu białek [148]. Degradacja ta wywołuje defekty w strukturze filamentów i przypuszcza się, że ma ona znaczenie funkcjonalne.

W wielu chorobach mięśniowych obserwuje się zaburzenia struktury cytoszkieletu. Na przykład, w niektórych kardiomiopatiach obserwuje się nadmierną akumulację desminowych filamentów w mięśniu sercowym [149]. Hypertrofia komórek mięśni gładkich również charakteryzuje się przyrostem liczby filamentów pośrednich oraz filaminy [97, 98]. Skład filamentów pośrednich i izoform aktyny posłużył diagnozowaniu różnych nowotworów tkanek miękkich, których obraz histologiczny jest taki sam [150].

Mutacje lub delecje genu ludzkiej dystrofiny prowadzą do progresywnej degeneracji mięśni o różnym stopniu natężenia, od stosunkowo łagodnych przypadków chorobowych dystrofii typu Beckera (BMD) do bardzo ostrych form dystrofii typu Duchenne'a (DMD) [151]. Ostatnio wykazano, że dystrofia o objawach klinicznych pośrednich (pomiędzy BMD i DMD) wywołana jest delecją 53% łańcucha polipeptydowego dystrofiny w regionie jego końca N wiążącego aktynę [152], co może sugerować, że jest on niezbędny dla prawidłowej funkcji dystrofiny. Inne badania wskazują na istotne znaczenie regionu końca C dystrofiny (domeny bogatej w cysteinę i pierwszej

połowy domeny C końca), który oddziałuje z błonowym kompleksem glikoprotein i w ten sposób łączy sarkolemmę z zewnątrzkomórkową matriks [111]. Występująca u niektórych pacjentów z DMD, dystrofina bez końca C wykazuje prawidłową lokalizację w sarkolemmie [153]. Jednakże zawartość glikoprotein błonowych z nią związanych ulega dramatycznemu obniżeniu, co z kolei jest prawdopodobnie przyczyną napływu jonów wapnia do komórki mięśniowej [154] i degradacji białek przez zależne od jonów wapnia proteazy [155, 156].

Artykuł otrzymano 13 marca 1995 r.

Zaakceptowano do druku 20 kwietnia 1995 r.

Piśmiennictwo

1. Dąbrowska R (1987) W: Kuźnicki L (red) Komórka — jej budowa i ruch. Ossolineum, Wrocław, str 93-132
2. Lazarides E (1982) *Ann Rev Biochem* **51**: 219-230
3. Trinick J (1991) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 112-119
4. Small J V, Fürst D O, Thornell L-E (1992) *Eur J Biochem* **208**: 559-572
5. Wang K (1985) W: Shay J W (red) Cell and Muscle Motility, Plenum Press, New York, str 315-369
6. Maruyama K (1986) *Int Rev Cytol* **104**: 81-114
7. Wang S-M, Greaser M L (1985) *J Muscle Res Cell Motil* **6**: 293-312
8. Pierobon-Bormioli S, Betto R, Salviati G (1989) *J Muscle Res Cell Motil* **10**: 446-456
9. Fürst D O, Osborn M, Weber K (1989) *J Cell Sci* **106**: 1563-1572
10. Higuchi H, Suzuki T, Kimura S, Yoshioka T, Maruyama K, Umazume Y (1992) *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 285-294
11. Nave R, Fürst D O, Weber K (1989) *J Cell Biol* **109**: 2177-2188
12. Grove B K, Cerny L, Perriard J-C, Eppenberger H M (1985) *J Cell Biol* **101**: 1413-1421
13. Fürst D O, Nave R, Osborn M, Weber K (1989) *J Cell Sci* **94**: 119-125
14. Gautel M, Leonard K, Labeit S (1993) *EMBO J* **12**: 3827-3834
15. Trombitas K, Pollack G H (1993) *J Muscle Res Cell Motil* **14**: 416-422
16. Trombitas K, Pollack G H, Wang K (1993) *Cell Motil Cytoskel* **24**: 274-283
17. Fürst D O, Osborn M, Weber K (1989) *J Cell Biol* **106**: 5217-5228
18. Whiting A, Wardale J, Trinick J (1989) *J Mol Biol* **205**: 263-268
19. Isaacs W B, Kim I S, Struve A, Fulton A B (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 7496-7500
20. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchel R (1991) *Biophys J* **64**: 1161-1171
21. Horowitz R, Podolsky R J (1987) *J Cell Biol* **105**: 2217-2300
22. Funatsu T, Higuchi I, Ishiwata S (1990) *J Cell Biol* **110**: 53-62
23. Wang K (1982) *Methods Enzymol* **85**: 264-274
24. Kurzban G P, Wang K (1988) *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 1155-1161
25. Labeit S, Barlow D P, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh C-L, Leonard K, Wardale J, Trinick J (1990) *Nature (Lond)* **345**: 273-276
26. Labeit S, Gautel M, Lakey A, Trinick J (1992) *EMBO J* **11**: 1711-1716
27. Maruyama K, Itoh Y, Arisaka F (1986) *FEBS Lett* **202**: 353-355

28. Nave R, Fürst DO, Vinkemeier V, Weber K (1991) *J Cell Sci* **98**: 441-449
29. Benian GM, Kiff JE, Neckelman N, Moerman DR, Waterston RH (1989) *Nature (Lond)* **342**: 45-50
30. Benian GM, Hernault SW, Morris ME (1993) *Genetics* **134**: 1097-1104
31. Ayme-Southgate A, Vigoreaux J, Benian GM, Pardue ML (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7973-7977
32. Nave R, Weber K (1990) *J Cell Sci* **95**: 535-544
33. Moerman DR, Benian GM, Barstead RJ, Schriefer LA, Waterston RH (1988) *Genes Dev* **2**: 93-105
34. Fyrberg CC, Labeit S, Bullard B, Leonard K, Fyrberg E (1992) *Proc R Soc London B* **192**: 33-40
35. Wang K, Wright J (1988) *J Cell Biol* **107**: 2199-2112
36. Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K (1988) *J Cell Biol* **106**: 1563-1572
37. Hu DH, Kimura S, Maruyama K (1986) *J Biochem (Tokyo)* **99**: 1485-1492
38. Kruger M, Wright J, Wang K (1991) *J Cell Biol* **115**: 97-107
39. Labeit S, Gibson T, Lakey A, Leonard K, Zeviani M, Knight P, Trinick J (1991) *FEBS Lett* **282**: 313-316
40. Jin J-P, Wang K (1991) *FEBS Lett* **281**: 93-96
41. Stedman H, Browning K, Oliver N, Oronzi-Scott M, Fischbeck K, Sarkar S, Sylvester J, Schmickel R, Wang K (1988) *Genomics* **2**: 1-7
42. Wang K, Knipfer M, Huang QO, Hsu L, Browning K, Quian X, Stedman HJ (1990) *J Cell Biol* **11**: 428a
43. Chen M-JG, Shih C-L, Wang K (1993) *J Biol Chem* **268**: 20327-20334
44. Pfuhl M, Winder SJ, Pastore A (1994) *EMBO J* **13**: 1782-1789
45. Chen M-JG, Wang K (1994) *Archiv Biochem Biophys* **310**: 310-317
46. Makuch R, Dąbrowska R (1993) *Post Biochem* **38**: 90-97
47. Root DD, Wang K (1994) *Biochemistry* **33**: 12581-12591
48. Lazarides E, Hubbard BD (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4344-4348
49. Small JV, Sobieszek A (1977) *J Cell Sci* **23**: 243-268
50. Jakubiec-Puka A (1981) *Post Biochem* **27**: 319-325
51. Geisler N, Weber K (1980) *Eur J Biochem* **111**: 425-433
52. Steinert PM, Steven AC, Roop DR (1985) *Cell* **42**: 411-419
53. Conway JF, Parry DAD (1990) *Int J Biol Macromol* **12**: 328-384
54. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R (1993) *Biophys J* **64**: 1161-1172
55. Page SG (1969) *J Physiol* **205**: 131-145
56. Granger BL, Lazarides E (1979) *Cell* **18**: 1053-1063
57. Granger BL, Lazarides E (1980) *Cell* **22**: 727-738
58. Price MG, Lazarides E (1983) *J Cell Biol* **97**: 1860-1874
59. Wiche G, Krepler R, Artlieb U, Pytela R, Denk H (1984) *J Cell Biol* **97**: 887-901
60. Yamaguchi M, Izumimoto M, Robson RM, Stromer MH (1985) *J Mol Biol* **184**: 629-644
61. Vigoreaux JO (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 237-255
62. Suzuki A, Saito M, Okitani A, Nonami Y (1981) *Agric Biol Chem* **45**: 2535-2542
63. Muguruma M, Kobayashi K, Fukazawa T, Ohashi K, Maruyama K (1981) *J Biochem (Tokyo)* **89**: 1981-1986
64. Ohashi K, Mikawa T, Maruyama K (1982) *J Cell Biol* **95**: 85-90
65. Chowrashi PK, Pepe FA (1982) *J Cell Biol* **94**: 505-573
66. Mahler PA, Cox GF, Singer SJ (1985) *J Cell Biol* **101**: 1871-1883
67. Kuroda M, Tanaka T, Masaki T (1981) *J Biochem (Tokyo)* **89**: 297-310
68. Chen W Y J, Dhoot GJ, Perry SV (1986) *J Muscle Res Cell Motil* **7**: 517-526
69. Casella JF, Maack DJ, Brown AE (1987) *J Cell Biol* **105**: 371-373
70. Lakey A, Labeit S, Gautel M, Ferguson C, Barlow DP, Leonard K, Bullard B (1993) *EMBO J* **12**: 2863-2871
71. Saide JD, Chin-Bow S, Hogan-Sheldon J, Busquets-Turner L, Vigoreaux JO (1989) *J Cell Biol* **109**: 2157-2167
72. Vigoreaux JO, Saide JD, Pardue ML (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 340-354
73. Saide JD, Chin-Bow S, Hogan-Scheldon J, Busquets-Turner L (1990) *J Muscle Res Cell Motil* **11**: 125-136
74. Takahashi K, Hattori A (1989) *J Biochem (Tokyo)* **105**: 529-536
75. Goldstein MA, Schroeter JP, Michael LH (1991) *FASEB J* **5**: 2167-2174
76. Bagby R (1986) *Int Rev Cytol* **105**: 64-126
77. Small JV, Herzog M, Barth M, Draeger A (1990) *J Cell Biol* **111**: 2451-2461
78. Draeger A, Amos WB, Ikebe M, Small JV (1990) *J Cell Biol* **111**: 2463-2473
79. Fürst DO, Cross RA, De Mey J, Small JV (1986) *EMBO J* **5**: 251-257
80. Somylo AV, Francini-Armstrong C (1985) *Eperientia* **41**: 841-856
81. Kargacin GJ, Cooke PH, Abramson SB, Fay FS (1989) *J Cell Biol* **108**: 1465-1475
82. Hubbard BD, Lazarides E (1979) *J Cell Biol* **80**: 166-182
83. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Capponier C, de Chastonay C, Vanderkerkhove J, Weber K, Franke WW (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 298-302
84. Frank ED, Warren L (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3020-3024
85. Geisler N, Weber K (1982) *EMBO J* **1**: 1649-1656
86. Geisler N, Plessmann U, Weber K (1982) *Nature (Lond)* **296**: 448-450
87. Johnson P, Williams RR (1983) *Biochim Biophys Acta* **747**: 1-9
88. Steinert PM, Idler WW, Cabral F, Gottesman MM, Goldman RD (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3692-3696
89. Geiger B, Dutton AH, Tokuyasu KT, Singer SJ (1981) *J Cell Biol* **91**: 614-628
90. Imamura M, Endo T, Kuroda M, Tanaka T, Masaki T (1988) *J Biol Chem* **263**: 7800-7805
91. North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV (1993) *J Cell Sci* **107**: 437-444
92. Lawson D (1983) *J Cell Biol* **97**: 1891-1905
93. North AJ, Gimona M, Lando Z, Small JV (1993) *J Cell Sci* **107**: 445-455
94. Small JV, Fürst DO, De Mey J (1986) *J Cell Biol* **102**: 210-220
95. Kołakowski J, Makuch R, Stępkowski D, Dąbrowska R (1995) *Biochem J* **306**: 199-204
96. Gabella G (1979) *Cell Tissue Res* **201**: 277-288
97. Malmquist U, Arner A (1990) *Circ Res* **66**: 832-845
98. Malmquist U, Arner A, Uvelius B (1991) *Am J Physiol* **260**: C1085-C1093
99. Geiger B, Ginsberg D (1991) *Cell Motil Cytosk* **20**: 1-6
100. Prado JV, Siliciano JD, Craig SW (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 1008-1012
101. Tidball TG, O'Holloran T, Burridge K (1986) *J Cell Biol* **103**: 1465-1472
102. Craig SV, Prado JV (1983) *Cel Motil* **3**: 449-462
103. Sikorski J, Białkowska K, Bisikirska B, Szopa J (1993) *Post Biochem* **39**: 50-60
104. Nelson WJ, Lazarides E (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 3363-3367
105. Nelson WJ, Lazarides E (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 3292-3296
106. Belkin AM, Burridge K (1994) *J Cell Sci* **107**: 1993-2003
107. Pierobon-Bormioli S (1981) *J Muscle Res Cell Motil* **2**: 401-413
108. Ohlendieck K, Campbell KP (1991) *FEBS Lett* **283**: 230-234
109. Pons R, Augier N, Heiling R, Leger J, Mornet D, Leger TJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7851-7855

110. Hartwig JH, Kwiatkowski DJ (1991) *Curr Opin Cell Biol* 3: 87-97
111. Ervasti JM, Campbell KP (1993) *Curr Opin Cell Biol* 5: 82-87
112. Hutter OF, Burton FL, Bovell DL (1991) *J Muscle Res Cell Motil* 12: 585-589
113. Ibraghinov-Beskvoynaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) *Nature (Lond)* 355: 696-702
114. Tidball TG (1987) *Exp Cell Res* 170: 469-482
115. Trinick J (1992) *Curr Biol* 2: 75-77
116. Tidball TG, Low DJ (1991) *Am J Pathol* 138: 17-21
117. Swadison S, Mayne R (1989) *Cell Tissue Res* 257: 537-543
118. Senter L, Luise M, Presotto C, Betto R, Teresi A, Ceoldo S, Salviati G (1993) *Bochem Biophys Res Commun* 192: 899-904
119. Severs NJ (1990) *Int J Cardiol* 26: 137-173
120. Tsukita S, Itoh M, Tsukita S (1989) *J Cell Biol* 109: 2905-2915
121. Tsukita S, Hieda Y, Tsukita S (1989) *J Cell Biol* 108: 2369-2382
122. Itoh M, Yanamura S, Nagafuchi A, Tsukita S, Tsukita S (1991) *J Cell Biol* 115: 1449-1462
123. Fertuck HC, Salpeter MM (1976) *J Cell Biol* 69: 144-158
124. Hoch W, Campanelli JT, Scheller RH (1994) *J Cell Biol* 126: 1-4
125. Filipek A (1994) *Post Biochem* 40: 55-58
126. Phillips WD, Noakes PG, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP (1993) *J Cell Biol* 123: 729-740
127. Walker JH, Boustead CM, Witzemann V (1984) *EMBO J* 3: 2287-2290
128. Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SD, Leveille CJ, Campbell KP (1991) *Neuron* 7: 499-508
129. Bloch RJ, Resneck WG, O'Neil A, Strong J, Pumplin DW (1991) *J Cell Biol* 115: 435-446
130. Gee S, Montaro F, Lindebaum M, Carbonetto S (1994) *Cell* 77: 675-686
131. Bloch RJ, Zach WH (1983) *J Cell Biol* 97: 217-223
132. Geiger BK, Tokuyasu T, Dutton AH, Singer SJ (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 4127-4131
133. Wang KJ, Ash F, Singer SJ (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 4483-4486
134. Rochlin MW, Chen Q, Tobler M, Turner CE, Burridge K, Peng HB (1989) *J Cell Sci* 92: 461-472
135. Bloch RJ, Morrow JS (1989) *J Cell Sci* 108: 481-493
136. Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC (1991) *J Cell Biol* 115: 411-421
137. Flucher BE, Daniels MP (1989) *Neuron* 3: 163-175
138. Gabella G (1984) W: Stephens NL (red) *Smooth muscle contraction*, Marcel Dekker Inc, New York, str 21-45
139. Draeger A, Stelzer EHK, Herzog M, Small JV (1989) *J Cell Sci* 94: 703-716
140. Siliciano JD, Craig S (1982) *Nature (Lond)* 300: 533-535
141. Takeichi M (1991) *Science* 251: 1451-1455
142. Hynes RO (1992) *Cell* 69: 11-25
143. Allen RD (1985) *Ann Rev Biophys Chem* 14: 265-290
144. Barstead RJ, Waterson RH (1991) *J Biol Chem* 11: 715-724
145. Roulier EM, Fyrberg C, Fyrberg E (1992) *J Cell Biol* 116: 911-922
146. Somerville LL, Wang K (1987) *Biochem Biophys Res Commun* 147: 986-992
147. Ando S, Tanabe K, Gonda Y, Sato C, Inagaki M (1989) *Biochemistry* 28: 2974-2979
148. Nelson J, Traub P (1983) *Mol Cell Biol* 3: 1146-1156
149. Tanaka M, Kawahara Y, Motomiya T, Sakamoto M, Sugiura M, Toyoda T, Kajita A, Osamura Y (1989) *Acta Pathol Jpn* 39: 266-273
150. Schurch W, Skalli O, Seemayer TA, Gabbiani G (1987) *Am J Pathol* 128: 91-103
151. Hoffman EP, Brown RG, Kunkel LM (1987) *Cell* 51: 919-928
152. Takeshima Y, Nishio H, Narita N, Wada H, Ishikawa Y, Minami E, Nakamura H, Matsuo M (1994) *Neurology* 44: 1648-1651
153. Matsumura K, Campbell KP (1994) *Muscle & Nerve* 17: 2-15
154. Turner RP, Fong P, Denetclaw WP, Steinhardt RA (1991) *J Cell Biol* 115: 1701-1712
155. Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA (1988) *Nature (Lond)* 335: 735-738
156. Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brutis JJ, Mohammad-pour M, Leger J, Ducastaing A (1992) *Biochimie* 74: 565-570

**Upzejmie zawiadamiamy PT Koleżanki i PT Kolegów
o przeniesieniu siedziby Zarządu Głównego
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
na teren Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
pokój 632 i 633**

Obecny adres:

**Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa
Tel. bezpośredni 658 20 99
Tel. przez centralę 659 85 71 w. 352
Fax 22 53 42**

**Dyżury biura Zarządu odbywać się będą jak dotychczas
we wtorki w godz 12-18**

Białko MAP-2 i jego rola w wielu przejawach plastyczności i stanach patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym

MAP-2 (Microtubule-associated protein-2) and its role in several aspects of plasticity and pathological states in the central nervous system

BARBARA MAJEWSKA*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Izoforny, występowanie, funkcja
- III. Budowa cząsteczki
- IV. Procesy fosforylacji
- V. MAP-2 w zjawiskach plastycznych
- VI. MAP-2 w zjawiskach patologicznych
- VII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Isoforms, occurrence, function
- III. Molecular structure
- IV. Phosphorylation processes
- V. MAP-2 in plastic phenomena
- VI. MAP-2 in pathology
- VII. Summary

Wykaz stosowanych skrótów: MAPs — białka związane z mikrotubulami (ang. *microtubule associated proteins*); NMDA — kwas N-metylo-D-asparaginowy; APV — kwas 5-aminofosfonowalerianowy; CNOX — 6-cjano-5-nitrochinosalino-2,3-dion; cAMP — cykliczny adenylozynomonofosforan; PKA — kinaza białkowa A (ang. *protein kinase A*); PKC — kinaza białkowa C (ang. *protein kinase C*); CaM II — kinaza białkowa II zależna od wapnia/kalmoduliny; LTP — długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (ang. *long-term potentiation*); CS₂ — siarczek węgla.

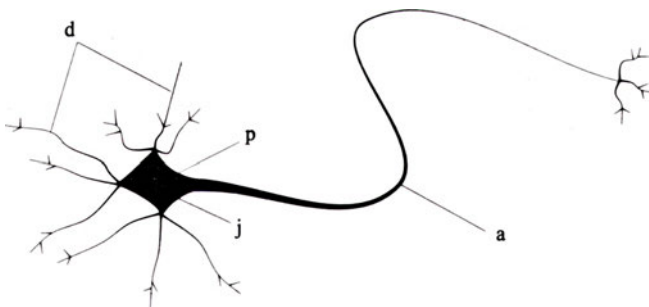
I. Wprowadzenie

W ośrodkowym układzie nerwowym pod wpływem rozmaitych czynników może dochodzić do zmian plastycznych, które polegają na reorganizacji połączeń międzyneuronalnych lub zmianie ich efektywności (zwiększenie lub zmniejszenie siły synaps). Wydaje się oczywiste, że podstawą zmian o charakterze morfologiczno-anatomicznym są procesy, jakim podlegają elementy szkieletowe komórki nerwowej. W skład cytoszkieletu neuronu wchodzi włókna trzech podstawowych rodzajów; mikrotubule, neurofilamenty i mikrofilamenty aktynowe. Jak dotąd najlepiej poznano mikrotubule, struktury nadające kształt komórkom i wypustkom nerwowym oraz warunkujące transport substancji wewnątrz wypustek komórek nerwowych. Naturalną właściwością mikrotubul jest ich labilność. Mikrotubule zbudowane są z tubuliny wy-

stępującej w postaci dimerów, które tworzą ścianę mikrotubuli. W komórkach nienerwowych mikrotubule znajdują się w stanie „dynamicznej niestabilności” (ang. *dynamic instability*), tzn. na przemian rosną lub kurczą się w wyniku procesów polimeryzacji i depolimeryzacji. W cytoszkiecie neuronów mikrotubule są związane z białkami towarzyszącymi (*microtubule-associated proteins, MAPs*), które regulują dynamikę tych przemian i tym samym mogą w pewnym stopniu stabilizować mikrotubule. MAPs ponadto tworzą mostki łączące mikrotubule z pozostałymi elementami cytoszkieletu, jak również z niektórymi organellami komórkowymi (np. z mitochondriami), co znacznie wpływa na usztywnienie cytoszkieletu.

Komórka nerwowa jest ściśle spolaryzowana morfologicznie (Ryc. 1) i funkcjonalnie. Można w niej wyróżnić występujące na ogół pojedynczo, długie aksony przewodzące informację w kierunku od ciała komórki nerwowej, oraz krótsze, licznie reprezentowane dendryty, niosące informację do ciała neuronu. Polaryzacja morfologiczno-funkcjonalna jest wynikiem występowania poszczególnych białek w obrębie jednego lub drugiego typu wypustek nerwowych. I tak wśród białek zaliczanych do rodziny MAPs na szczególną uwagę zasługują białko MAP-2, które stabilizuje cytoszkielet w przedziale somatodendrytycznym neuronu, oraz białko Tau związane z cytoszkieletem aksonów. Powinowactwo do struktur wewnątrzkomórkowych zależy od stopnia ufosforylowania białek MAP-2 i Tau. Dla zachowania właściwej struktury, a zatem i funkcji neuronu konieczne jest ustalenie

* Mgr, Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



Ryc. 1 Schemat budowy neuronu, a — akson; d — dendryty; p — perykarion (ciało komórki nerwowej); j — jądro.

subtelnej równowagi między procesami fosforylacji i defosforylacji, zachwianie której może prowadzić do zmian w strukturze cytoskieletu neuronów, a w konsekwencji do zmian morfologiczno-anatomicznych w strukturach ośrodkowego układu nerwowego.

W niniejszym artykule starano się przedstawić zgromadzoną dotychczas wiedzę na temat białka MAP-2 w ośrodkowym układzie nerwowym oraz podać przykłady jego udziału w procesach plastycznych i patologicznych.

II. Izoforny, występowanie, funkcja

MAP-2 jest białkiem termostabilnym, które występuje w trzech izoformach; dwie z nich to wysokocząsteczkowe MAP-2a i MAP-2b, o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 288 kDa i 280 kDa, trzecia, MAP-2c, jest formą niskocząsteczkową (70 kDa) [1, 2] (Tab. 1). Wszystkie izoforny są produktami jednego genu [3]. MAP-2b i MAP-2c powstają w wyniku odmiennej obróbki pierwotnego transkryptu, tzw. alternatywnego składowania (ang. *alternative splicing*) (Ryc. 2). Nie jest natomiast jasne, czy MAP-2a powstaje w ten sam sposób, czy też tworzy się na drodze potranslacyjnej modyfikacji MAP-2b [2, 4].

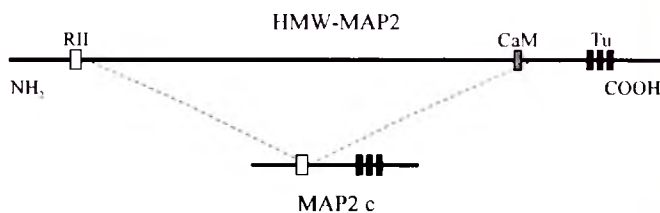
MAP-2 w ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych zwierząt występuje przede wszystkim w przedziale somatodendrytycznym neuronów [5], przy czym pod pojęciem MAP-2 rozumie się w tym przypadku łącznie formy MAP-2a i -2b. Jest to powszechnie stosowana praktyka nomenklaturowa, wynikająca ze zbliżonego ciężaru cząsteczkowego obu polipeptydów oraz z ich współwystępowania w dojrzałej tkance nerwowej [1]. MAP-2c występuje nie tylko w dendrytach, ale również w aksonach rozwijających się neuronów [6] oraz w komórkach glejowych [7]. MAP-2b u szczura pojawia się w późnym okresie embrionalnym i jest obecne przez całe życie zwierzęcia. MAP-2a pojawia się dopiero około 10 dnia po urodzeniu, to jest w czasie, gdy zanika MAP-2c obecne w niedojrzałej tkance [4]. W opuszkach węchowych i siatkówce procesy wzrostu i różnicowania neuronów czuciowych zachodzą przez całe życie. W tych strukturach stwierdza się obecność niskocząsteczkowej formy MAP-2, którą wielu badaczy utożsamia z MAP-2c [8, 9]. Ostatnio jednak, wykryto w mózgu szczura inną izoformę niskocząs-

Tabela 1.

Ogólna charakterystyka izoform białka MAP-2.

izoforma	ciężar cząsteczkowy (kDa)	występowanie	specyficzność komórkowa
wysokocząsteczkowa			
MAP-2a	288	od około 10 dnia po urodzeniu, we wszystkich obszarach mózgu	neurony
MAP-2b	280	od późnego okresu embrionalnego przez całe życie, we wszystkich obszarach mózgu	neurony
niskocząsteczkowa			
MAP-2c	70	od okresu embrionalnego do około 10 dnia po urodzeniu we wszystkich obszarach mózgu oraz w dorosłej tkance opuszek węchowych i siatkówki	neurony i komórki glejowe
MAP-2d	około 70	w okresie embrionalnym i wczesnym okresie po urodzeniu we wszystkich obszarach mózgu oraz w dorosłej tkance kory mózgowej, mózdzku, hipokampa i opuszek węchowych	neurony i komórki glejowe

teczkową, którą nazwano MAP-2d [10]. Badacze uważają, że ta właśnie niskocząsteczkowa forma MAP-2 występuje w tkance dorosłych zwierząt. Przemawia za tym, stwierdzony podczas rozwoju, wzrost poziomu MAP-2d w takich strukturach jak kora mózgowa, mózdzek, opuszki węchowe, któremu towa-



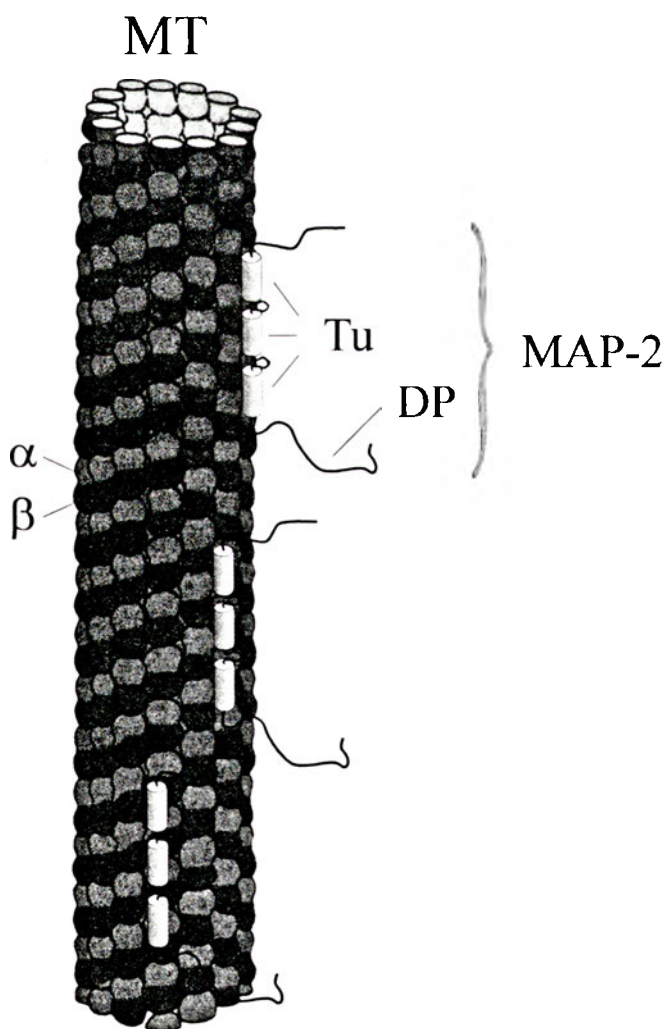
Ryc. 2 Schemat budowy cząsteczki wysokocząsteczkowej i niskocząsteczkowej formy białka MAP-2. HMW-MAP2 — wysokocząsteczkowa forma białka MAP-2 (ang. High Molecular Weight MAP-2); RII — miejsce wiążące podjednostkę regulatorową RII kinazy białkowej A; CaM — miejsce wiążące kalmodulinę; Tu — domena wiążąca tubulinę; linia przerywana wskazuje fragment cząsteczki wysokocząsteczkowej formy MAP-2b (między RII, a domeną wiążącą tubulinę), który zostaje usunięty w procesie alternatywnego składowania mRNA i którego nie zawiera niskocząsteczkowa forma MAP-2c.

rzyszy obniżenie poziomu MAP-2c. Jedynie w hipokampie, gdzie również następuje spadek poziomu MAP-2c podczas rozwoju postnatalnego zwierząt, to właśnie MAP-2c zdaje się dominować ilościowo nad obecnym tam również MAP-2d.

W mózgu dorosłych zwierząt występowanie MAP-2 ogranicza się do dendrytów i ciał komórek nerwowych i na ogół nie obserwuje się go w aksonach [11]. Co ciekawsze, w dendrytach wykrywa się również obecność mRNA MAP-2 [12], podczas gdy mRNA innych białek cytoszkieletu występuje jedynie w ciele neuronu [13] lub, co najwyżej, w początkowych odcinkach wypustek nerwowych, jak to ma miejsce w przypadku mRNA Tau w aksonach [14]. Warto przypomnieć, że biosynteza białek zachodzi w ciałach neuronów, a tylko nieliczne białka (w tym MAP-2) mogą być syntetyzowane w dendrytach, dzięki obecności polirybosomów pod błoną postsynaptyczną [15]. Komórki nerwowe dysponują systemem transportu mRNA, który to system jest obecny w wypustkach dendrytycznych, ale nie występuje w aksonach [16]. Stwierdzono, że zakotwiczenie w dendrytach lub w początkowych odcinkach aksonów jest wynikiem związania się

mRNA MAP-2 lub mRNA Tau z mikrotubulami wypustek nerwowych [14].

Badania nad rozwojem kory mózgowej szczura wykazują, że wzrostowi stężenia białka MAP-2 w okresie między narodzinami, a trzecim tygodniem życia, nie towarzyszy wzrost poziomu mRNA MAP-2 [17]. Obserwacje te mogą świadczyć o tym, że mRNA MAP-2 występuje w okresie rozwoju w komórkach nerwowych na stałym poziomie, natomiast w określonych warunkach fizjologicznych wzrostowi może ulegać intensywność syntezy białka. Lokalna translacja w dendrytach może zatem stanowić wyjaśnienie charakterystycznego rozmieszczenia MAP-2 w neuronie. Ponadto, możliwość szybkiego uruchomienia syntezy w dendrytach, na których znajdują się liczne synapsy odbierające informację niesioną przez aksony komórek presynaptycznych, może mieć decydujące znaczenie np. w procesach plastyczności synaptycznej (patrz dalej). Badania *in vitro* wykazują, że wstrzyknięcie MAP-2 do ciała komórki nerwowej prowadzi do przemieszczenia się tego białka zarówno do aksonów, jak i do dendrytów, choć ostatecznie lokuje się ono w przedziale somatodendrytycznym [18]. Wydaje się prawdopodobne, że przedziałowość występowania MAP-2 jest wynikiem nie tylko charakterystycznego rozmieszczenia jego mRNA w neuronie, ale również powinowactwa tego białka cytoszkieletowego do struktur wewnątrz komórki nerwowej [1], głównie do mikrotubul. Sugeruje się również, że obecność MAP-2 w dendrytach może być wynikiem działania mechanizmu, który *in vivo* miałby zapobiegać wejściu białka do aksonów dojrzałych neuronów lub prowadzić do degradacji MAP-2 w tym obszarze komórki nerwowej [6].



Ryc. 3 Schemat stabilizacji mikrotubul przez MAP-2. MAP-2 — cząsteczka białka MAP-2; MT — mikrotubula; Tu — domena wiążąca tubulinę; DP — domena projekcyjna; α, β — podjednostki alfa i beta dimeru tubulinowego.

III. Budowa cząsteczki

Podstawową rolą MAP-2 jest stabilizacja mikrotubul w dendrytach komórek nerwowych [19] (Ryc. 3). W łańcuchu polipeptydowym MAP-2 przy końcu C cząsteczki wyróżnia się miejsca wiążące tubulinę [20]. Są to 18-aminokwasowe motywy połączone fragmentami 13-aminokwasowymi, które jako luźne łączniki nie związane z tubuliną pozwalają na nieznaczne wyginanie mikrotubul [21]. Taki 31-aminokwasowy (18 + 13) fragment powtarza się trzykrotnie w cząsteczce MAP-2 [22] i tworzy domenę wiążącą tubulinę. Ostatnio wykazano obecność izoform białka z czterema takimi powtórzeniami w mózgu człowieka i szczura [23]. Stwierdzono, że przy końcu C cząsteczki MAP-2 znajduje się ponadto miejsce wiążące kalmodulinę [24]. Kalmodulina jest białkiem wiążącym wapń, które po przyłączeniu co najmniej trzech jonów wapnia ma zdolność aktywowania m.in. kinazy białkowej nazywanej kinazą II zależną od Ca^{2+} kalmoduliny (CaM II) [25]. Jest zatem prawdopodobne, że wiązanie CaM II z cząsteczką MAP-2, w pobliżu domeny wiążącej tubulinę, odgrywa rolę w regulacji przyłączania MAP-2 do mikrotubul. Przeciwny frag-

ment białka, przy końcu N cząsteczki, tworzy domene projekcyjną, czyli wolny odcinek zdolny do łączenia się z innymi strukturami komórkowymi (Ryc. 2). W jej obrębie zidentyfikowano miejsce wiązania podjednostki regulatorowej RII kinazy białkowej zależnej od cAMP (kinaza białkowa A, PKA) [26]. Domena projekcyjna może odgrywać rolę w wiązaniu MAP-2 z pozostałymi elementami cytoszkieletu [27], chociaż wydaje się, że w interakcje MAP-2 zarówno z neurofilamentami, jak i z filamentami aktynowymi, zaangażowana jest raczej domena wiążąca tubulinę [28]. Możliwe jest również, że MAP-2 ma więcej niż jedno miejsce wiązania aktyny [28], tzn. zarówno w pobliżu końca C, jak i przy końcu N cząsteczki. *In vitro* wykazano zdolność MAP-2 do tworzenia dimerów [29] oraz do wiązania się z mitochondriami [30] i innymi składnikami komórki (patrz [28]). Nie jest jasne, czy za wiązanie się różnych organelli komórkowych z MAP-2 odpowiada błonowa tubulina tych struktur, czy też inne białka.

Cząsteczka MAP-2c jest pozbawiona domeny projekcyjnej, ponieważ kodująca ją sekwencja zostaje usunięta z mRNA w procesie potranskrypcyjnej obróbki (alternatywne składanie). Niektórzy badacze wysuwają hipotezę, że funkcją MAP-2c jest zapobieganie wiązaniu się form wysokocząsteczkowych MAP-2 z mikrotubulami [31]. Cząsteczka MAP-2c zawiera domenę wiążącą tubulinę, a zatem MAP-2c może zajmować miejsca przyłączania MAP-2b lub MAP-2a. Wysokocząsteczkowe formy MAP-2 nie mogą wówczas wiązać się z mikrotubulami i tworzyć poprzecznych mostków między nimi, ani wiązać ich z pozostałymi elementami cytoszkieletu. Taki mechanizm pozwalałby na utrzymanie plastyczności szkieletu komórki nerwowej jeszcze w początkowym okresie rozwoju postnatalnego (w okresie, kiedy MAP-2c współwystępuje z pojawiającym się MAP-2a), oraz w dojrzałym układzie nerwowym, w obszarach, gdzie zachodzą procesy różnicowania i wzrostu i gdzie obecne są zarówno formy wysoko- jak i niskocząsteczkowe MAP-2.

IV. Procesy fosforylacji

Oddziaływanie MAP-2 z innymi elementami cytoszkieletu, w tym głównie z mikrotubulami, zależy od stopnia ufosforylowania cząsteczki [32]. Badania Tsuyama i wsp. [33] wskazują, że zawartość 10-16 moli reszt fosforanowych na mol cząsteczek MAP-2 nie zapobiega jeszcze wiązaniu się białka z mikrotubulami, natomiast większe ufosforylowanie (25 lub 46 moli reszt fosforanowych) znacznie utrudnia łączenie się MAP-2 z tubuliną. W doświadczeniach *in vitro* ufosforylowane MAP-2 pochodzące z mózgu szczura i zawierające 10 lub 25 moli reszt fosforanowych na mol białka całkowicie łączy się z mikrotubulami po wstrzyknięciu do hodowanych fibroblastów (fibroblasty nie zawierają endogennego MAP-2). Natomiast

zmiana zawartości reszt fosforanowych do 2 lub 22 moli/mol białka przez enzymatyczną defosforylację lub fosforylację *in vitro*, hamuje przyłączanie MAP-2 do mikrotubul [34]. Wynik doświadczenia wskazuje, że endogennie ufosforylowane MAP-2 łatwo wiąże się z mikrotubulami, natomiast proces wiązania ulega zakłóceniu, gdy stopień ufosforylowania jest modyfikowany *in vitro*. Jest prawdopodobne, że *in vitro* fosforylacji ulegają inne miejsca w cząsteczce MAP-2, niż *in vivo*. Sugeruje się zatem, że nie tylko ilość związanych reszt fosforanowych, ale i miejsce ich przyłączenia decyduje o zdolności MAP-2 do wiązania się z mikrotubulami. Stwierdzono również, że fosforylacja MAP-2 znacznie obniża jego zdolność do oddziaływania z aktyną [35] oraz do indukowania polimeryzacji tubuliny [33]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że fosforylacja MAP-2 zachodzi przy udziale wielu kinaz: kinazy białkowej A [36], kinazy białkowej II zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny (CaM II) [37], kinazy białkowej C [35], kinazy tyrozynowej, m.in. receptora insulinowego i receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor, EGF*) [38]. Istnieją dane wskazujące, że przynajmniej niektóre z tych procesów przebiegają w żywym ustroju np. fosforylacja przez kinazę białkową C [39] lub kinazę białkową A [40]. *In vitro* kinazy te fosforylują niemal wyłącznie reszty serynowe, ale miejsca działania każdego z tych enzymów są odrębne w cząsteczce MAP-2 [35]. Z kolei CaM II katalizuje fosforylację zarówno reszt serynowych jak i treoninowych [35], przy czym wydaje się, że reszty serynowe fosforylowane przy jej udziale mogą być również substratem kinazy białkowej A. Uważa się, że *in vivo* fosforylacji ulegają reszty serynowe, treoninowe i tyrozynowe [33], ale dokładne miejsca fosforylacji nie zostały zidentyfikowane. Zaangażowanie różnych kinaz w procesie fosforylacji MAP-2, oraz występowanie zależności między stopniem ufosforylowania MAP-2, a jego zdolnością do oddziaływania z innymi białkami sugeruje, że procesy fosforylacji regulują biologiczną funkcję MAP-2 oraz że odmiennie ufosforylowane izowarianty mogą odgrywać różną rolę dzięki zmiennemu powinowactwu do struktur wewnątrzkomórkowych.

V. MAP-2 w zjawiskach plastycznych

Właściwości MAP-2 sugerują, że białko to może uczestniczyć w procesach plastycznych w ośrodkowym układzie nerwowym. Jak wspomniano, odpowiednio ufosforylowane białko MAP-2 traci zdolność wiązania się z mikrotubulami, a wówczas mikrotubule tracą sztywność i stają się strukturami labilnymi. Dlatego procesy fosforylacji/defosforylacji MAP-2 mogą mieć znaczenie dla reorganizacji cytoszkieletu w zjawiskach plastycznych, dla wzrostu wypustek nerwowych lub też zmian właściwości połączeń synaptycznych [41]. W hodowlach neuronów rdzenia kręgowego i kory mózgowej stwierdzono, że pobudzenie receptorów

glutaminianu powoduje reorganizację cytoszkieletu monitorowaną immunoreaktywnością MAP-2 i tubuliny. W doświadczeniach tych zaobserwowano, że MAP-2, początkowo dyfuzyjnie rozmieszczone w dendrytach i ciałach neuronów, po zadziałaniu glutaminianu przyjmuje organizację włókien i pęczków. Proces reorganizacji jest hamowany przez antagonistów receptorów glutaminianowych. Po podaniu glutaminianu zaobserwowano ponadto stabilizację mikrotubul oraz współwystępowanie immunoreaktywności MAP-2 i tubuliny, co wskazuje na zwiążanie się MAP-2 z mikrotubulami [42].

Aktywacja receptora glutaminianu typu NMDA (receptor, którego agonistą jest kwas N-metylo-D-asparaginowy) prowadzi do defosforylacji MAP-2 w skrawkach hipokampa [43]. Odmienne, depolaryzacja neuronu zachodząca pod wpływem jonów K^+ w wysokich stężeniach w środowisku zewnątrzkomórkowym, prowadzi do zwiększenia stopnia ufosforylowania MAP-2 w skrawkach hipokampalnych [44]. Efektem tak wywołanej depolaryzacji neuronu jest otwarcie kanałów wapniowych typu L zależnych od potencjału błony, podobnie jak efektem pobudzenia przez glutaminian jest otwarcie kanału wapniowego zwiążanego z receptorem NMDA. Sugeruje się, że w neuronie występuje przedziałowość rozmieszczenia enzymów, takich jak kinazy i fosfatazy, pozwalająca na ich aktywację w zależności od miejsca wnikięcia jonów Ca^{2+} do komórki [45]. Możliwe jest także, że określone stężenie wapnia w danym momencie determinuje, który z enzymów zostanie zaktywowany [46]. Przykładem procesu, w którym aktywacja kinazy, bądź fosfatazy zależy od określonego stężenia jonów Ca^{2+} , jest działanie pompy wapniowo-sodowej. Kinaza aktywująca pompę jest stymulowana przez jony Ca^{2+} tylko do pewnej wartości ich stężenia, powyżej której aktywacji ulega fosfataza zależna od Ca^{2+} , hamująca pracę pompy [25]. Również zmiany wewnątrzkomórkowego pH mogą odpowiadać za indukcję procesów fosforylacji/defosforylacji. Są doniesienia o występowaniu w mózgu tzw. czynnika aktywującego fosfatazę (ang. *ATP Mg-dependent type-1 protein phosphatase activating factor*), który w środowisku alkalicznym działa jako kinaza, ale przy obniżonym pH może pełnić funkcję aktywatora fosfatazy MAP-2 [47]. Wewnątrzkomórkowe zakwaszenie wywołane glutaminianem rejestrowano w hodowlach neuronów hipokampa [48]. Efekt ten jest blokowany przez antagonistę receptora NMDA (CGS 19755) i wymaga obecności zewnątrzkomórkowego wapnia. Można zatem wyobrazić sobie mechanizm, w którym pobudzenie receptorów NMDA prowadzi do obniżenia wewnątrzkomórkowego pH i do uruchomienia enzymu o aktywności fosfatazy katalizującego defosforylację MAP-2.

Są dane dotyczące udziału MAP-2 w długotrwałym wzmocnieniu synaptycznym (ang. *long-term potentiation*, LTP). Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne jest

jednym ze zjawisk plastycznych, występującym w óśrodkowym układzie nerwowym, które polega na wzmocnieniu efektywności synaps przejawiającym się wzmocnieniem odpowiedzi postsynaptycznej po zadziałaniu na zakończenie presynaptyczne bodźcem o wysokiej częstotliwości (tzw. tetanizacja) [49]. Obecnie wielu badaczy uznaje długotrwałe wzmocnienie synaptyczne za zjawisko podstawowe dla tworzenia śladu pamięciowego na poziomie komórkowym [50]. Oprócz aktywacji wapniowo-zależnych kinaz i fosfataz [51], podczas długotrwałego wzmocnienia synaptycznego dochodzi do aktywacji kalpajny [52]. Kalpajna jest enzymem proteolitycznym aktywowanym przez jony wapnia, który katalizuje degradację MAP-2 w sposób zależny od stanu jego ufosforylowania [53]. Stwierdzono, że fosforylacja wzmacnia oporność MAP-2 na proteolityczne działanie kalpajny [54], stąd sugeruje się, że katabolizm MAP-2 w cytozolu jest regulowany przez stan ufosforylowania cząsteczki, w przeciwieństwie do proteolizy lizosomalnej zachodzącej przy udziale katapsyny D niezależnie od stopnia fosforylacji MAP-2 [55]. Wiadomo, że niektóre formy długotrwałego wzmocnienia synaptycznego wymagają pobudzenia receptorów typu NMDA [56] oraz, że w utrzymaniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego są zaangażowane zmiany ekspresji genów [57]. W badaniach komórek ziarnistych hipokampa obserwuje się wzrost ekspresji genu MAP-2 pod wpływem kwasu N-metylo-D-asparaginowego lub tlenu azotu (tlenek azotu jest wydzielany po aktywacji receptora typu NMDA i postuluje się jego udział w powstawaniu długotrwałego wzmocnienia synaptycznego w zakręcie zębatym hipokampa) [58, 59]. Do podniesienia poziomu mRNA MAP-2 dochodzi zarówno w ciałach neuronów jak i w dendrytach. Sugeruje się, że synteza nowego białka może być odpowiedzią na wzmoczoną proteolizę wywołaną aktywacją kalpajny, i zapewnia utrzymanie odpowiedniego poziomu MAP-2.

Do doświadczeń mających na celu wyjaśnienie molekularnych podstaw uczenia się należy warunkowanie klasyczne, w którym kojarzy się potencjalny bodziec warunkowy (np. bodziec słuchowy) z bodźcem bezwarunkowym (np. szokiem elektrycznym). U szczurów można wytworzyć warunkową reakcję „zamierania” (ang. *freezing*) w odpowiedzi na, obojętny przed warunkowaniem, bodziec słuchowy. Stwierdzono, że u szczurów, wobec których stosowano bodziec słuchowy skojarzony z szokiem elektrycznym, w korze skroniowej (kora słuchowa wyższego rzędu) oraz w ciele migdałowatym (struktura uczestnicząca w wytwarzaniu awersyjnych reakcji warunkowych) dochodzi do spadku zawartości nienaruszonego MAP-2 z jednoczesnym wzrostem ilości produktów jego rozpadu [60]. W doświadczeniach tych obserwuje się ponadto wzrost immunoreaktywności kinazy białkowej C [61]. Można przypuszczać, że procesowi degradacji MAP-2 towarzyszy fosforylacja produktów rozpadu katalizowana tę kinazę. Zaobserwowano również zmiany

o charakterze morfologicznym, tj. powiększenie komórek piramidowych w korze skroniowej i czołowej (kora asocjacyjna), co może stanowić podstawę zmian funkcjonalnych w tych obszarach kory mózgowej [60]. Jest zatem prawdopodobne, że podczas warunkowania klasycznego w komórkach nerwowych zachodzą procesy, których wynikiem jest wzrost labilności cytoszkieletu. Możliwe jest wtedy wystąpienie zmian plastycznych, takich jak zmiana morfologii neuronów, czy wzrost ilości kolców dendrytycznych (główne miejsca lokalizacji postsynaptycznej części połączenia międzyneuronalnego).

Badania MAP-2 w zjawiskach takich jak długotrwałe wzmocnienie synaptyczne i warunkowanie klasyczne, w których zachodzą zmiany w sile przekazywania synaptycznego wskazują, że białko to bierze udział w plastyczności neuronalnej już na poziomie synaptycznym, uczestnicząc w strukturalnej reorganizacji zakończeń dendrytycznych. Należy także przypuszczać, że ze względu na swój udział w procesach stabilizacji oraz tworzenia i rozpadu mikrotubul [36] białko MAP-2 jest istotne dla wzrostu, rozgałęziania i ustalania morfologii dendrytów.

W kontekście udziału MAP-2 w zjawiskach plastycznych w ośrodkowym układzie nerwowym szczególnie interesujące są doniesienia o powiązaniu procesów fosforylacji MAP-2 ze zjawiskiem plastyczności kolumn dominacji ocznej u kotów. W pierwotnej korze wzrokowej komórki nerwowe odpowiadające na pobudzenie danego oka (prawego lub lewego) są ułożone w taki sposób, że tworzą kolumny biegnące przez całą grubość kory [62]. Kolumny te, zwane kolumnami dominacji ocznej (ang. *ocular dominance columns*), można zidentyfikować elektrofizjologicznie rejestrując odpowiedzi komórek elektrodą umieszczoną prostopadle do powierzchni i penetrującą w głąb kory wzrokowej, lub nastrzykując siatkówkę jednego oka np. barwnikiem fluorescencyjnym. W tym ostatnim przypadku na przekrojach poprzecznych przez korę wzrokową widoczny jest wzór naprzemiennie występujących jasnych i ciemnych prążków, czyli kolumn otrzymujących połączenia odpowiednio z oka nastrzykniętego i kontrolnego. W początkowym okresie życia zwierzęcia, tzw. okresie krytycznym (u kota do trzeciego miesiąca życia), można wywołać zmianę plastyczną zwaną przesunięciem dominacji ocznej (ang. *ocular dominance shift*). Jeśli nowonarodzonemu kotu unie możliwi się odbieranie bodźców wzrokowych przez zakrycie powieki jednego oka (deprywacja jednooczna), to po zakończeniu okresu krytycznego w korze wzrokowej obserwuje się ekspansję kolumn reprezentujących oko aktywne kosztem kolumn odpowiadających oku deprywowanemu [63]. U zwierząt deprywowanych obustronnie, tj. takich które są pozbawione dopływu bodźców wzrokowych do obu oczu, ten okres krytyczny ulega wydłużeniu i zmiany w organizacji kory wzrokowej można wywołać u starszych zwierząt [64]. W 1985 roku Aoki i Siekevitz [65] zaob-

serwowali, że w tkance pobranej od kociąt hodowanych w ciemności, a więc u których opóźniono początek okresu krytycznego, fosforylacja MAP-2 *in vitro* przy udziale kinazy białkowej A zachodzi znacznie trudniej niż w tkance pochodzącej od zwierząt, których widzenie nie było zaburzone. Oznacza to, że w mózgu kociąt doświadczalnych MAP-2 znajdowało się w stanie wysokiego ufosforylowania. Po ekspozycji zwierząt na światło następował natomiast ogromny wzrost fosforylacji MAP-2 badany *in vitro*, co sugeruje, że po zadziałaniu bodźca świetlnego dochodzi do defosforylacji białka *in vivo*. Badania plastyczności kolumn dominacji ocznej wskazują wyraźnie na udział receptora typu NMDA w tym zjawisku [66]. Byłoby zatem interesujące sprawdzenie, czy defosforylacja MAP-2 *in vivo*, jaką obserwowali Aoki i Siekevitz, była wynikiem aktywacji receptora NMDA po zadziałaniu bodźca wzrokowego.

VI. MAP-2 w zjawiskach patologicznych

Zmiany w poziomie MAP-2 obserwuje się w wielu eksperymentalnych i klinicznych stanach patologicznych.

MAP-2 szczególnie łatwo ulega degradacji w warunkach niedoboru tlenu. W badaniach, w których *in vivo* u gerbili wywoływano niedotlenienie przez ischamię, stwierdzono znaczny spadek immunoreaktywności MAP-2 w hipokampie [67]. Podobnie, w doświadczeniach *in vitro*, zaobserwowano obniżenie immunoreaktywności MAP-2 po inkubacji skrawków hipokampa szczura przy niedoborze tlenu [68]. Stwierdza się również spadek poziomu MAP-2 w doświadczeniach, w których wytwarza się u zwierząt stan odpowiadający udarowi mózgu. Obniżenie immunoreaktywności występuje w obszarach, gdzie rejestruje się degenerację neuronów (kora mózgowa i hipokamp). Procesowi temu przeciwdziała podanie antagonisty aminokwasów pobudzeniowych (kwas kinurenowy) [69]. Są dane wskazujące, że podawanie antagonisty receptora typu NMDA (APV) na godzinę przed uszkodzeniem nie hamuje spadku poziomu MAP-2, natomiast zastosowanie antagonisty receptora typu nie-NMDA (CNQX) prowadzi do wzrostu immunoreaktywności [70]. Wyniki te wskazują, że neurotoksyczne działanie aminokwasów pobudzeniowych prowadzące do obniżenia immunoreaktywności MAP-2 odbywa się za pośrednictwem receptorów typu nie-NMDA.

Na poziom MAP-2 w mózgu oraz na jego fosforylację wpływają liczne neurotoksyny. Wzrost fosforylacji, z jednoczesnym spadkiem poziomu białka, następuje pod wpływem glinu [55] oraz neurotoksycznych organicznych estrów fosforowych [72]. Zjawiskom tym nie towarzyszą zmiany w poziomie pozostałych białek cytoszkieletu neuronów, w tym tubuliny i białek neurofilamentów [55]. Wdychanie siarczku węgla (CS₂) prowadzi u szczurów do wzrostu poziomu fos-

forylacji MAP-2 [72]. Proces fosforylacji jest w tym przypadku zależny od wapnia i kalmoduliny. Warto przypomnieć, że CS₂ jest substancją toksyczną powszechnie stosowaną w przemyśle. U ludzi wdychanie CS₂ prowadzi do zaburzeń psychogennych, a już niewielkie stężenia tego związku mogą powodować zmiany w funkcjach poznawczych i psychomotorycznych. W doświadczeniach na szczurach z użyciem silnej toksyny, trimetylocyny, obserwuje się obniżenie immunoreaktywności MAP-2 w pewnych obszarach hipokampa oraz jej podwyższenie w innych [73]. Ten ostatni efekt można tłumaczyć rozrostem dendrytów, ponieważ uznaje się MAP-2 za znacznik dendrytów i uważa się, że intensywność immunoreakcji koreluje z ilością tych wypustek. Byłby to przykład zjawiska kompensacji w odpowiedzi na odnerwienie tych obszarów pod wpływem toksyny, w którym MAP-2 odgrywałoby istotną rolę jako czynnik wpływający na tworzenie nowych odgałęzień wypustek dendrytycznych. Spadek immunoreakcji na MAP-2 pojawia się też w hipokampie szczura po dohipokampalnym podaniu NMDA [74] lub dokomorowym podaniu kainianu [75]. Obie substancje w wyższych stężeniach wykazują działanie neurotoksyczne.

Badania patologii układu nerwowego wskazują na występowanie zaburzeń w cytoszkielecie. Na przykład, w hipokampie i w korze śródwęchowej chorych cierpiących na schizofrenię stwierdza się *post mortem* deficyt MAP-2. Badacze spekulują, że niedobór MAP-2 może oddziaływać na strukturę i funkcję dendrytów prowadząc do zaburzeń przekazywania synaptycznego i dając w efekcie zmiany behawioralne [76].

VII. Podsumowanie

Dzięki swoim oddziaływaniom z pozostałymi elementami cytoszkieletu MAP-2 bierze udział w kształtowaniu morfologii dendrytów, może zatem wpływać na tworzenie struktury zakończeń nerwowych. Dlatego też postuluje się jego rolę w zjawiskach, w których dochodzi do zmian w połączeniach między neuronami (np. zmiany kompensacyjne) oraz w procesach, których efektem jest zmiana siły połączeń komórek nerwowych (np. procesy uczenia się). Zmiany, jakim podlegają wypustki neuronów pod wpływem wielu czynników fizjologicznych i patologicznych, wydają się zależeć w znacznym stopniu od procesów jakim podlegają białka cytoszkieletu. Mechanizmy tych zjawisk ciągle pozostają niewystarczająco wyjaśnione, jednak badania prowadzące do ich poznania otwierają ciekawy kierunek w neurobiologii, w którym uwaga badaczy jest kierowana na rolę cytoszkieletu komórki nerwowej w plastyczności neuronalnej.

Artykuł otrzymano 31 marca 1995 r.
Zaakceptowano do druku 26 maja 1995 r.

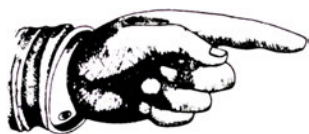
Podziękowanie

Grąco dziękuję Pani doc. Jolancie Skan-giel-Kramskiej za krytyczne uwagi i cenne wskazówki udzielone w czasie pracy nad tekstem oraz mgr Pawłowi Pomorskiemu za pomoc w wykonaniu rycin.

Piśmiennictwo

- Schoenfeld TA, Obar RA (1994) *Int Rev Cytol* **151**: 67-129
- Garner CC, Matus A (1988) *J Cell Biol* **106**: 779-783
- Lewis SA, Villasante A, Sherline P, Cowan N (1986) *J Cell Biol* **102**: 2098-2105
- Binder LI, Frankfurter A, Kim H, Caceres A, Payne MR, Rebhun LI (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5613-5617
- Matus A, Bernhardt R, Hugh-Jones T (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 3010-3014
- Meichsner M, Doll T, Reddy D, Weisshaar B, Matus A (1993) *Neuroscience* **54**: 873-880
- Nunez J (1988) *Trends Neurosci* **11**: 477-479
- Viereck C, Tucker RP, Matus A (1989) *J Neurosci* **9**: 3547-3557
- Tucker RP, Matus AI (1988) *Dev Biol* **130**: 423-434
- Ferhat L, Bernard A, Ribas de Pouplana L, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M (1994) *Neurochem Int* **25**: 327-338
- Bernhardt R, Matus A (1984) *J Comp Neurol* **226**: 203-221
- Garner CC, Tucker RP, Matus A (1988) *Nature (Lond)* **336**: 674-677
- Tucker RP, Garner CC, Matus A (1989) *Neuron* **2**: 1245-1256
- Litman P, Barg J, Ginzburg I (1994) *Neuron* **13**: 1463-1474
- Steward O, Banker GA (1992) *Trends Neurosci* **15**: 180-186
- Kleiman R, Banker G, Steward O (1994) *J Neurosci* **14**: 1130-1140
- Charrière-Bertrand C, Garner C, Tardy M, Nunez J (1991) *J Neurochem* **56**: 385-391
- Okabe S, Hirokawa N (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 4127-4131
- Matus A (1994) *Trends Neurosci* **17**: 19-22
- Ennulat DJ, Liem RKH, Hashim GA, Shelanski ML (1989) *J Biol Chem* **264**: 5327-5330
- Butner KA, Kirschner MW (1991) *J Cell Biol* **115**: 717-730
- Joly JC, Flynn G, Purich DL (1989) *J Cell Biol* **109**: 2289-2294
- Kindler S, Garner CC (1994) *Mol Brain Res* **26**: 218-224
- Lee YC, Wolff (1984) *J Biol Chem* **259**: 1226-1230
- Michaluk J (1994) W: Przewlocka B, Lason W (red) *Problemy Neuropsychofarmakologii*, Instytut Farmakologii PAN, Kraków, str 29-38
- Obar RA, Dingus J, Bayley H, Vallee RB (1989) *Neuron* **3**: 639-645
- Goedert M, Crowther RA, Garner CC (1991) *Trends Neurosci* **14**: 193-199
- Wiche G (1989) *Biochem J* **259**: 1-12
- Wille H, Mandelkow EM, Dingus J, Vallee RB, Binder LI, Mandelkow E (1992) *J Struct Biol* **108**: 49-61
- Linden M, Nelson BD, Leterrier J (1989) *Biochem J* **261**: 167-173
- Kindler S, Schultz B, Goedert M, Garner CC (1990) *J Biol Chem* **265**: 19670-19684
- Nishida E, Hoshi M, Miyata Y, Sakai H, Kadowaki T, Kasuga M, Saijo S, Ogawara H, Akiyama T (1987) *J Biol Chem* **262**: 16200-16204
- Tsuyama S, Terayama Y, Matsuyama S (1987) *J Biol Chem* **262**: 10886-10892
- Brugg B, Matus A (1991) *J Cell Biol* **114**: 735-743

35. Akiyama T, Nishida E, Ishida J, Saji N, Ogawara H, Hoshi M, Miyata Y, Saka H (1986) *J Biol Chem* **261**: 15648-15651
36. Vallee RB (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3206-3210
37. Yamauchi T, Fujisawa H (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **110**: 287-291
38. Akiyama T, Kadowaki T, Nishida E, Kadooka T, Ogawara H, Fukami Y, Sakai H, Takaku F, Kasuga M (1986) *J Biol Chem* **261**: 14797-14803
39. Tsuyama S, Bramblett GT, Huang KP, Flavin M (1986) *J Biol Chem* **261**: 4110-4116
40. Murthy ASN, Bramblett GT, Flavin M (1985) *J Biol Chem* **260**: 4364-4370
41. Friedrich P, Aszódi A (1991) *FEBS Lett* **295**: 5-9
42. Bigot D, Matus A, Hunt SP (1991) *Eur J Neurosci* **3**: 551-558
43. Halpain S, Greengard P (1990) *Neuron* **5**: 237-246
44. Diaz-Nido J, Montoro RJ, Lopez-Barneo J, Avila J (1993) *Eur J Neurosci* **5**: 818-824
45. Regher WG, Connor JA, Tank DW (1989) *Nature (Lond)* **341**: 533-536
46. Klee CB (1991) *Neurochem Res* **16**: 1059-1065
47. Yang SD, Song JS, Liu HW, Chan WH (1993) *J Protein Chem* **12**: 393-402
48. Wang GJ, Randall RD, Thayer SA (1994) *J Neurophysiol* **72**: 2563-2569
49. Izquierdo I (1994) *FASEB J* **8**: 1139-1145
50. Maren S, Baudry M (1995) *Neurobiol learning and memory* **63**: 1-18
51. Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC (1988) *Neuron* **1**: 97-103
52. Denny JB, Polan-Curtain J, Ghuman A, Wayner MJ, Armstrong DL (1990) *Brain Res* **534**: 317-320
53. Johnson GVW, Litersky JM, Jope RS (1991) *J Neurochem* **56**: 1630-1638
54. Chen M, Stracher A (1989) *J Biol Chem* **264**: 14282-14289
55. Johnson GVW, Jope RS (1992) *J Neurosci Res* **33**: 505-512
56. Bliss TVP, Collingridge GL (1993) *Nature (Lond)* **362**: 31-39
57. Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF (1989) *Nature (Lond)* **340**: 474-476
58. Johnston HM, Morris BJ (1994) *J Neurochem* **63**: 379-382
59. Johnston HM, Morris BJ (1994) *Neurosci Lett* **177**: 5-10
60. Woolf NJ, Young SL, Johnson GVW, Fanselow MS (1994) *NeuroReport* **5**: 1045-1048
61. Woolf NJ, Oh JD, Edwards RH (1994) *Soc Neurosci Abstr* **20**: 429
62. Hubel D, Wiesel TN (1963) *J Neurophysiol* **26**: 994-1002
63. Hubel D, Wiesel TN (1970) *J Physiol (Lond)* **206**: 419-436
64. Cynader M, Mitchell DE (1980) *J Neurophysiol* **43**: 1026-1040
65. Aoki C, Siekevitz P (1985) *J Neurosci* **5**: 2465-2483
66. Gu Q, Bear MF, Singer W (1989) *Dev Brain Res* **47**: 281-288
67. Yamashita T, Tada K, Sobue K, Niigawa H, Suzuki H, Hariguchi S, Nishimura T (1986) *Neurochem Res* **11**: 1728-1729
68. Zhou Q, Nowak TS Jr (1994) *Soc Neurosci Abstr* **20**: 1038
69. Hicks RR, Smith DH, McIntosh TK (1994) *Soc Neurosci Abstr* **20**: 423
70. Armstrong DM, Kharlamov A, Sheffield R, Grayson DR, Maney H (1994) *Soc Neurosci Abstr* **20**: 185
71. Suwita L, Lapadula DM, Abou-Donia MB (1986) *Brain Res* **374**: 199-203
72. Wilmarth KR, Viana ME, Abou-Donia MB (1993) *Brain Res* **628**: 293-300
73. Koczyk D (1994) *Acta Neurobiol Exp* **54**: 55-58
74. Rush DK, Lartius RK, Aschmies SH, Uemura E (1991) *Soc Neurosci Abstr* **17**: 1068
75. Siman R, Noszek JC (1988) *Neuron* **1**: 279-287
76. Arnold SE, Lee VM-Y, Gur RE, Trojanowski JQ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 10850-10854



Do członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Zarząd P.T.Bioch. uprzejmie prosi wszystkich członków o wpłatę zaległych i bieżących składek członkowskich. Zachęcamy także do zaprenumerowania „Postępów Biochemii”.

Wrodzony niedobór deaminazy AMP — podłoże molekularne defektu

Inherited AMP-Deaminase deficiency — molecular basis of the defect

KRYSTIAN KALETHA¹,
Manfred Gross²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Izoenzymy
- III. Geny i transkrypty
- IV. Wrodzony niedobór enzymu mięśniowego
- V. Wrodzony niedobór enzymu erytrocytarnego

Wykaz stosowanych skrótów: *AMPD* (1-3) — geny ludzkie kodujące odpowiednie izoenzymy deaminazy AMP; *Ampd* (1-3) — geny szczurze kodujące odpowiednie izoenzymy deaminazy AMP; AMPD — deaminaza AMP; kz — kilozasady.

I. Wstęp

Deaminaza AMP (AMP-aminohydrolaza; EC 3.5.4.6), katalizuje reakcję hydrolitycznej deaminacji kwasu adenylogowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP). Znaczenie fizjologiczne tej reakcji wiązane jest głównie z regulacją wartości ładunku energetycznego adenylanów [1] tkanek. W mięśniach szkieletowych, gdzie aktywność enzymu jest rzad, dwa rzędy wielkości, wyższa aniżeli w pozostałych tkankach [2], znaczenie fizjologiczne enzymatycznej deaminacji AMP wiązane jest dodatkowo z funkcjonowaniem tzw. cyklu nukleotydów purynowych [3].

U człowieka niedobór mięśniowej deaminazy AMP występować może w postaci wrodzonej (pierwotnej) lub nabytej (wtórnej).

W postaci wrodzonej homozygotycznej niedobór enzymu jest niemal całkowity — mierzona aktywność deaminazy AMP nie przekracza 5% wartości prawidłowej. Postać ta przebiega niekiedy bezobjawowo, częściej jednak towarzyszy jej rozmaicie nasilony ze-

Contents:

- I. Introduction
- II. Isoenzymes
- III. Genes and transcripts
- IV. Inherited deficiency of muscle enzyme
- V. Inherited deficiency of erythrocyte enzyme

spół objawów, na który składają się spoczynkowe osłabienie mięśni szkieletowych, łatwa powysiłkowa ich męczliwość oraz bolesne skurcze [4, 5]. W postaci wrodzonej heterozygotycznej niedobór enzymu jest tylko częściowy — mierzona aktywność mięśniowej deaminazy AMP z reguły przewyższa 40% wartości prawidłowej. Postać ta, o ile nie towarzyszą jej schorzenia układu mięśniowo-nerwowego, przebiega bezobjawowo [5].

W postaci nabytej niedobór mięśniowej deaminazy AMP jest niespecyficzny i wynika, podobnie jak niedobory innych enzymów, z uszkodzeń strukturalnych mięśnia szkieletowego towarzyszących różnorodnym schorzeniom układu nerwowo-mięśniowego.

Postaci niedoboru mięśniowej deaminazy AMP, ich symptomatologia, diagnostyka laboratoryjna, a także implikacje metaboliczne opisane zostały w jednym z wcześniejszych numerów *Postępów Biochemii* [6]. W artykule obecnym przedstawiono rezultaty ostatnich badań wyjaśniające podłoże molekularne tego defektu. Zagadnienie to było tematem okolicznościowego wykładu poświęconego pamięci Prof. Dr W ł o d z i m i e r z a M o z o ł o w s k i e g o. Wykład który wygłoszony został w maju ubiegłego roku w Gdańsku przez Doc. Dr M a n f r e d a G r o s s a. Zasadnicze tezy wykładu opublikowane zostały w ubiegłorocznym numerze *Pharmacy World & Science* [7].

II. Izoenzymy

Deaminaza AMP w tkankach ssaków występuje w postaci wielorakich form molekularnych [8]. W doj-

¹ Doc. dr hab., Katedra i Zakład Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk,
² Priv.-Doz. Dr., Medizinische Poliklinik der Universität Munchen, Pettenkoferstrasse 8a, 80336 Munchen, Germany

rzalnych tkankach ludzkich występują trzy immunologiczne odmienne, strukturalnie homogenne formy molekularne deaminazy AMP. W największych ilościach znajdujemy je odpowiednio w wątrobie (izoenzym L), mięśni szkieletowym (izoenzym M) i erytrocytach (izoenzym E). Izoenzym erytrocytarny występuje w dwu formach, różniących się właściwościami chromatograficznymi i kinetycznymi: E1 i E2 [8].

Skład izoenzymowy tkanek zwierzęcych, w tym również ludzkich, nie jest stały — w trakcie rozwoju osobniczego podlega on wyraźnym, genetycznie zaprogramowanym zmianom [9, 10].

III. Geny i transkrypty

Deaminazę AMP szczura i człowieka koduje rodzina co najmniej trzech, niezależnych genów [7]. W mięśni szkieletowym szczególnie intensywnej ekspresji ulega gen *Ampd1*, odpowiedzialny za syntezę izoenzymu mięśniowego (M). Komplementarny DNA (cDNA) dla szczurzego genu *Ampd1* sklonowano w roku 1987 [11]. Zsyntetyzowane na jego matrycy białko enzymatyczne miało masę cząsteczkową 80 kDa i wykazywało wysoką specyficzność immunologiczną. Pełną sekwencję nukleotydową genu *Ampd1* szczura i człowieka wyznaczono w roku 1990 [12].

U człowieka gen *AMPD1* zlokalizowany jest w ramieniu krótkim chromosomu 1, w regionie p13-p21 [12]. Geny szczurzy i ludzki mają zbliżoną wielkość (odpowiednio 21 i 23 kb) i cechuje je daleko idące podobieństwo strukturalne i organizacyjne [12]. Sekwencje kodujące obu genów składają się z 16 eksonów i są w 88% homologiczne. Wielkości poszczególnych eksonów są różne i zawierają od 103 (ekson 1) do 220 (ekson 6) nukleotydów. Wyjątkowy w tym względzie ekson 2 zawiera zaledwie 12 nukleotydów. Wielkości eksonów, usytuowanie miejsc zapoczątkowujących transkrypcję, a także granice między eksonami i intronami są w genach szczurzym i ludzkim identyczne. Na swych końcach 3' geny te zawierają krótkie sekwencje nukleotydowe (licząc 13 nukleotydów w genie ludzkim a 17 nukleotydów w genie szczurzym), nie podlegające translacji. Podobne sekwencje na końcach 5' są dłuższe i w każdym z genów liczą po 81 nukleotydów [12, 13].

Badania ekspresji genu *Ampd1* w mięśni szkieletowym szczura [14] i człowieka [15] wykazały obecność w tej tkance dwu rodzajów transkryptów, nierozróżnialnych techniką Northern blot, liczących po około 2500 nukleotydów. Transkrypty charakteryzuje niemal identyczna sekwencja nukleotydowa, a jedyna między nimi różnica dotyczy obecności minieksonu 2. Transkrypty te powstają w wyniku alternatywnego składania transkryptu pośredniego, zawierającego na pograniczu eksonu 1 z eksonem 2 dodatkowe, nieobecne w transkrypcie pierwotnym miejsce donorowe 5' [16]. Proporcje ilościowe wytwarzanych rodzajów transkryptów podlegają ścisłym, ontogenetycznie za-

Tabela 1.

Właściwości zrekombinowanych cząsteczek mięśniowej deaminazy AMP, kodowanych przez cDNA zawierający ekson 2 i cDNA nie zawierający eksonu 2.

wektor ekspresyjny	aktywność AMPD (mU/mg białka)	K _M AMP (mM)	Reaktywność z surowicą anty-AMPD	
			mięsień szkieletowy	serce
			(%)	
pKK	< 0.1	—	—	—
pKKrAMPD	147	3.1	88	< 10
pKKrAMPD (bez eksonu 2)	108	3.0	93	< 10

≠ Dane wzięte z pracy [15]

programowanym, tkankowo specyficznym mechanizmem regulacyjnym [16, 17].

W dojrzałym, zróżnicowanym, mięśni szkieletowym szczura jedynie ułamek (0.6-2.0%) wytworzonego przez gen *Ampd1* całkowitego mRNA stanowi transkrypt niekompletny (nie zawierający eksonu 2). W mięśni sercowym, w którym ekspresja genu *Ampd1* jest znacznie słabsza, transkrypt niekompletny stanowi aż 90% kodowanego przez ten gen mRNA. W mięśni gładkim, wątrobie, nerkach i śledzionie ilości wytworzonego transkryptu niekompletnego sięgają 100%. Duże ilości transkryptu niekompletnego znajdujemy również w niedojrzałym, płodowym mięśni szkieletowym, a także w hodowli niezróżnicowanych komórek mięśniowych [16].

Białka enzymatyczne zsyntetyzowane na matrycy obydwu transkryptów nie różnią się immunoreaktywnością i specyficznością substratów; enzym zsyntetyzowany na matrycy transkryptu niekompletnego, jest jednak blisko 25% mniej aktywny [15] (Tab. 1).

Izoenzym wątrobowy (izoenzym L) deaminazy AMP szczura i człowieka kodowany jest przez gen *Ampd2* [18]. Gen ten, podobnie jak gen *Amd1*, umiejscowiony jest w chromosomie 1 [19]. Komplementarny DNA ludzkiego genu *AMPD2*, zawierający jego pełną, otwartą ramkę odczytu, sklonowano w roku 1992 [20]. Liczące około 3400 nukleotydów (u szczura) i około 4000 nukleotydów (u człowieka) transkrypty pierwotne, po przeniesieniu do odpowiedniego wektora ekspresyjnego, kodowały syntezę 760 aminokwasowego białka o masie cząsteczkowej 88.1 kDa.

Przeprowadzona przy użyciu techniki Northern blot analiza wykazała, że produkowany przez gen *Ampd2* transkrypt, występuje w znacznie większych ilościach w wątrobie, nerkach oraz w aorcie dorosłego szczura i człowieka [18]. Jego niewielkie ilości znaleźć można również w mięśni szkieletowym i sercowym [18].

Izoenzymy erytrocytarne (izoenzymy E) deaminazy AMP szczurzej i ludzkiej kodowane są przez gen *Ampd3* [21]. Trzy warianty komplementarnego DNA różniące się sekwencjami nukleotydowymi w krań-

cowych fragmentach końców 5', sklonowane zostały niemal jednocześnie w dwu niezależnych laboratoriach w roku 1992 [21, 22]. Sekwencje nukleotydowe tych wariantów obejmowały pełną (liczącą ponad 2300 par zasad) otwartą ramkę odczytu genu *Ampd3*, kodującego 767 aminokwasowe, immunologicznie specyficzne białko enzymatyczne o masie cząsteczkowej 89 kDa [21, 22].

Obydwie znajdowane w komórkach krwi ludzkiej formy molekularne (E1 i E2) izoenzymu erytrocytarnego wydają się być posttranskrypcyjne zmodyfikowanymi (być może alternatywnie składanymi) produktami jednego genu [23].

Wrodzony niedobór deaminazy AMP jest specyficzny tkankowo i jak na to wskazują dotychczasowe badania, dotyczy on jedynie mięśnia szkieletowego oraz erytrocytów.

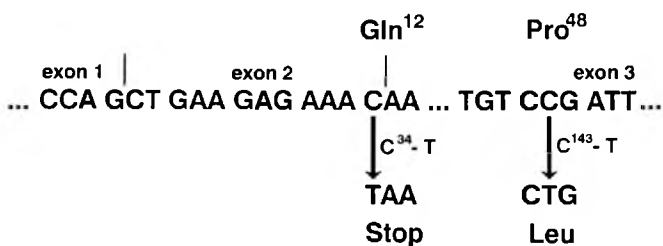
IV. Wrodzony niedobór mięśniowej deaminazy AMP

Wrodzony niedobór mięśniowej deaminazy AMP opisano po raz pierwszy w roku 1978 [4]. Przeprowadzone potem przesiewowe badania biopsyjne wykazały, że w obrębie populacji amerykańskiej i europejskiej defekt ten jest częsty i w postaci homozygotycznej obserwuje się go u około 2% ogółu osobników [5].

Wrodzony niedobór mięśniowej deaminazy AMP charakteryzuje się autosomalnym typem dziedziczenia i dotyczy wyłącznie mięśnia szkieletowego [5]. Poziomy aktywności enzymu w krwinkach osób dotkniętych tego rodzaju defektem wykazują wartości nie odbiegające od normy [5].

U pacjentów z wrodzonym niedoborem mięśniowej deaminazy AMP analiza materiału biopsyjnego techniką Southern blot nie wykazała widocznych odchyłeń od normy [7, 24]. Analiza techniką Northern blot przyniosła rezultat podobny — materiał biopsyjny zawierał prawidłową, a nawet zwiększoną ilość transkryptu pierwotnego [7, 25]. Analiza z użyciem techniki Western blot dała jednak wynik odmienny — materiał biopsyjny nie zawierał immunologicznie specyficznego, aktywnego białka enzymatycznego [7, 25].

W celu wyjaśnienia przyczyny obserwowanego zjawiska, materiał biopsyjny pacjentów dotkniętych niedoborem mięśniowej deaminazy AMP, poddano szczegółowej analizie porównawczej. Sekwencję nukleotydową cDNA, zsyntetyzowanego na matrycy mRNA z materiału biopsyjnego osób dotkniętych niedoborem, porównywano z sekwencją cDNA, zsyntetyzowanego na matrycy mRNA z biopłatu ludzi zdrowych. Porównania te wskazały dowodnie na obecność w genie *AMPDI* dwu mutacji punktowych, z których jedna (C34T) zachodzi w obrębie eksonu 2, a druga (C143T) w obrębie eksonu 3 [7, 25, 26] (Ryc. 1). Wszystkie przebadane do tej pory przypadki pierwotnego niedoboru deaminazy AMP okazały się, ze



Ryc. 1 Wpływ mutacji punktowych: C34T i C143T w genie *AMPDI* na przewidywaną strukturę deaminazy AMP u osób z wrodzonym niedoborem enzymu mięśniowego.

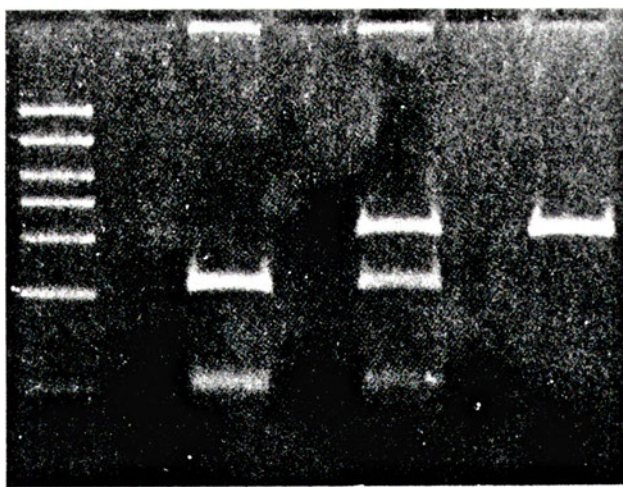
względu na wymienione wyżej mutacje, homozygotyczne [7].

Mutacja pierwsza (C34T; Gln-STOP) powoduje podstawienie cytozyny przez tyminę w tryplecie kodującym glutaminę (Gln). Podstawienie takie generuje wytworzenie kodonu kończącego translację (sygnału STOP), hamując w ten sposób syntezę 767 aminokwasowego białka enzymatycznego na etapie 11 aminokwasowego oligopeptydu. Oligopeptyd ten nie wykazuje żadnej aktywności katalitycznej i nie jest wykrywalny techniką Western blot [25]. Niezależnie od wytworzenia sygnału STOP, mutacja (C34T) niszczy jedyną w eksonie 2 sekwencję specyficzną rozpoznawaną przez enzym restrykcyjny Mae II [7].

Mutacja druga (C143T; Pro48-Leu) powoduje podstawienie proliny przez leucynę w pozycji 48 łańcucha peptydowego. Podstawienie takie nie prowadzi jednakże, jak to wykazały przeprowadzone z udziałem cDNA ludzkiego genu *AMPDI* badania, do zmiany stabilności i aktywności katalitycznej syntetyzowanego białka enzymatycznego [7, 25].

Fakt, że mutacja (C34T) likwiduje specyficzną dla enzymu restrykcyjnego Mae II sekwencję, wykorzystano do analizy porównawczej struktury eksonu 2 [25]. Przeprowadzone z udziałem enzymu Mae II trawienie zamplifikowanego (przy użyciu techniki PCR) eksonu 2 ujawniło w rozdziale elektroforetycznym, w zależności od źródła pochodzenia biopłatu, fragmenty DNA integralne (jeżeli wyizolowany DNA pochodził z biopłatu pacjentów homozygotycznych), lub pocięte (jeżeli wyizolowany DNA pochodził z biopłatu osób zdrowych) albo jedne i drugie (jeżeli wyizolowany DNA pochodził z biopłatu pacjentów heterozygotycznych) (Ryc. 2).

Przeprowadzona na bogatszym losowo pobieranym materiale biopsyjnym analiza, oparta na rezultatach opisanego wyżej postępowania oraz na allelo-specyficznej metodzie dot-blot, dała wyniki (Tab. 2) pozwalające wyliczyć częstość występowania form allelicznych mutacji, a także (w oparciu o prawo Hardy-Weinberga) oczekiwaną częstość występowania homozygotycznej postaci niedoboru. Jak to wynika z przedstawionych w tabeli 2 wyliczeń, homozygotycznej postaci wrodzonego niedoboru mięśniowej deaminazy AMP oczekiwać można u 3,7% amerykańskich Murzynów oraz 1,5% osobników rasy kaukaskiej. U Azjatów, rzecz interesująca, przypadków występowania



A B C D

Ryc. 2 Analiza elektroforetyczna produktów trawienia eksonu 2 enzymu restrykcyjnym Mae II.

Uzyskany z bioptatów mięśniowych cDNA genu *AMPD1* zamplifikowano, po czym fragment nukleotydowy obejmujący obszar eksonu 2 poddano trawieniu enzymem Mae II.

Panele A-D przedstawiają odpowiednio: nukleotydowe fragmenty markerowe (A) oraz produkty otrzymane w wyniku trawienia eksonu 2, obecnego w cDNA u osoby zdrowej (B), osoby heterozygotycznej (C) i homozygotycznej (D) ze względu na mutację C34T. # Dane wzięte z pracy [7].

wrodzonego niedoboru mięśniowej deaminazy AMP dotąd nie zanotowano.

Tabela 2.

Częstość występowania zmutowanego allelu genu *AMPD1* (mutacja C34T) u przypadkowych osobników różnych populacji

populacja	n	nukleotyd 34			częstość występowania alleli	oczekiwana częstość występowania osobników homozygotycznych
		C/C	C/T	T/T		
Amerykanie — populacja kaukaska	59	47	10	2	0.12	1.4%
Amerykanie — Murzyni	13	9	3	1	0.19	3.7%
Japończycy	106	—	—	0	0	
Niemcy	106	83	20	3	0.12	1.5%

≠ Dane dotyczące populacji amerykańskiej wzięte z pracy [25].

Jak to wynika z przedstawionych oszacowań, przewidywana częstość występowania homozygotycznej postaci defektu przewyższa znacznie częstość odnotowywanych przypadków objawowych [5]. Przyczyna dość częstego bezobjawowego przebiegu defektu chociaż niezupełnie jasna, ma prawdopodobnie związek za specyfiką obróbki posttranskrypcyjnej transkryptu pierwotnego.

Jak już wspomiano uprzednio, w następstwie alternatywnego składania transkryptu pierwotnego, od

0,6% do 2% całości wytworzonego przez ludzki gen *AMPD1* mRNA stanowi transkrypt niekompletny (transkrypt nie zawierający eksonu 2) [7, 15]. Ponieważ zachodząca w obrębie eksonu 2, mutacja punktowa C34T transkryptu niekompletnego nie dotyczy, przeto synteza katalitycznie aktywnego białka enzymatycznego na matrycy tego transkryptu wydaje się być prawdopodobna. Prawdopodobieństwo takie staje się tym bardziej realne jeśli pod uwagę wziąć fakt, że mutacja druga (C143T) nie wpływa istotnie na stabilność i na właściwości kinetyczne syntetyzowanego białka enzymatycznego (Tab. 2). U osobników z wrodzonym homozygotycznym typem niedoboru, alternatywne cięcie eksonu 2 mogłoby więc stanowić swoisty fenotypowy mechanizm zabezpieczający [14]. Obserwowana u pacjentów z niedoborem tego typu prawidłowa, a często nawet zwiększona w porównaniu z osobami zdrowymi, ekspresja genu *AMPD1*, wyjaśnienie takie zdaje się potwierdzać. Niezależnie od powyższego, w mięśniu szkieletowym ma miejsce również szczątkowa ekspresja genów pozostałych (*AMPD2* i *AMPD3*). Wytwarzane przez nie izoenzymy wpłynąć mogą dodatkowo na złagodzenie metabolicznych skutków niedoboru i łagodniejszy (być może asymptomatyczny) przebieg schorzenia.

V. Wrodzony niedobór erytrocytarnej deaminazy AMP

Wrodzony niedobór erytrocytarnej deaminazy AMP, stwierdzony po raz pierwszy w populacji japońskiej w roku 1984 [27], występuje również wśród ludności europejskiej [28]. Defekt ten, jak to wykazały przeprowadzone badania, dziedziczony jest w sposób autosomalny-recesywny i przebiega całkowicie bezobjawowo również u homozygot [27, 28]. W erytrocytach homozygot aktywność deaminazy AMP jest niemierzalna, w erytrocytach heterozygot natomiast jest ona wyraźnie obniżona [28].

Przeprowadzona analiza porównawcza sekwencji DNA komplementarnej wobec genu *AMPD3*, wykazała, że u osób wykazujących homozygotyczny typ niedoboru, przyczyną defektu jest pojedyncza mutacja punktowa (C1717T), powodująca w łańcuchu peptydowym wytwarzanego białka enzymatycznego podstawienie argininy przez cysteinę [23]. Mutacja ta dotyczy zapewne zachowawczego fragmentu genu, ponieważ syntetyzowane białko, chociaż stabilne, nie wykazuje aktywności enzymatycznej.

Podziękowania

Panu Profesorowi M. Żydowo, za przeczytanie manuskryptu i merytoryczne uwagi autorzy składają podziękowania. Praca dotowana w ramach pracy własnej W-93 oraz statutowej ST-41

Artykuł otrzymano 31 marca 1995 r.
Zaakceptowano do druku 29 maja 1995 r.

1. Chapman AG, Atkinson DE (1973) *J Biol Chem* **248**: 8309-8312
2. Purzycka J (1962) *Acta Biochim Polon* **9**: 83-93
3. Lowenstein JM (1972) *Physiol Rev* **52**: 382-414
4. Fishbein WN, Armbrustmacher VW, Griffin JL (1978) *Science* **200**: 545-548
5. Fishbein WN (1985) *Biochem Med* **33**: 158-169
6. Kaletha K, Nowak G, Adrych K, Makarewicz W (1991) *Post Biochem* **37**: 58-62
7. Gross M (1994) *Pharmacy World Sci* **16**: 55-61
8. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Watanabe T, Asano T (1982) *Biochim Biophys Acta* **714**: 298-306
9. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Watanabe T (1978) *Eur J Biochem* **87**: 297-304
10. Kaletha K, Nowak G (1988) *Biochem J* **249**: 255-261
11. Sabina RL, Marquetant R, Desai N, Kaletha K, Holmes EW (1987) *J Biol Chem* **262**: 12397-12400
12. Sabina RL, Morisaki T, Clarke P, Eddy R, Shows TB, Morton CC, Holmes EW (1990) *J Biol Chem* **265**: 9423-9433
13. Kingsmore SF, Moseley WS, Watson ML, Sabina RL, Holmes EW, Seldin MF (1990) *Genomics* **7**: 75-83
14. Sabina RL, Ogasawara N, Holmes EW (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 2244-2246
15. Morisaki M, Morisaki T, Newby K, Holmes EW (1993) *J Clin Invest* **91**: 2275-2280
16. Mineo I, Clarke PRH, Sabina RL, Holmes EW (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 5271-5278
17. Sabina RL, Ogasawara N, Holmes EW (1989) *Mol Cell Biol* **9**: 2244-2246
18. Morisaki T, Sabina RL, Holmes EW (1990) *J Biol Chem* **265**: 11482-11486
19. Moseley W, Morisaki T, Sabina RL, Holmes EW (1990) *Genomics* **6**: 572-574
20. Bausch-Jurken MT, Mahnke-Zizelman DK, Morisaki T, Sabina RL (1992) *J Biol Chem* **267**: 22407-22413
21. Mahnke-Zizelman DK, Sabina RL (1992) *J Biol Chem* **267**: 20866-20877
22. Yamada Y, Goto H, Ogasawara N (1992) *Biochim Biophys Acta* **1171**: 125-128
23. Yamada Y, Goto H, Ogasawara N (1994) *Human Molec Gen* **3**: 331-334
24. Gross M, Morisaki T, Pongratz D, Holmes EW, Zollner N (1990) *Klin Wocheschr* **68**: 1084-1088
25. Morisaki T, Gross M, Morisaki H, Pongratz D, Zollner N, Holmes EW (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6457-6461
26. Sabina RL, Fishbein WN, Pezeshkpour G, Clarke PRH, Holmes EW (1992) *Neurology* **42**: 170-179
27. Ogasawara N, Goto H, Yamada Y, Nishigaki I, Itoh T, Hasegawa I (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **122**: 1344-1349
28. Żydowo MM, Purzycka-Preis J, Ogasawara N (1989) *Adv Exp Med Biol* **253A**: 31-34

INFORMACJA

ATRAKCYJNA PRACA

Zatrudnimy absolwenta znającego metody biologii molekularnej, zainteresowanego pracą badawczą w dziedzinie regulacji ekspresji genów i terapii genowej. Kandydatów prosimy o zgłaszanie się do dr Wiesławy Leśniak — Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa, pok. 326, 335, tel. 659 31 34, lub do prof. Jacka Kuźnickiego, email - jotka@helix.nih.gov

Receptory kolagenu płytek krwi

Platelet collagen receptors

URSZULA KRALISZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Techniki badania adhezji płytek krwi
- III. Ogólna charakterystyka adhezji płytek krwi do kolagenu
- IV. Receptory pierwszorzędowe
 - IV-1. Podobieństwo receptorów glikoproteinowych GPIa-IIa do receptorów integrynowych
 - IV-2. GPIa-IIa jako receptor kolagenu
 - IV-3. Charakterystyka GPIV
 - IV-4. Funkcje biologiczne GPIV
 - IV-5. Antygen Nak⁴
 - IV-6. GPVI jako receptor kolagenu
 - IV-7. Udział GPIb w adhezji płytek krwi do kolagenu
- V. GPIIb-IIIa jako receptor drugorzędowy
- VI. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: GPIa-IIa — płytkowa glikoproteina Ia-IIa; GPIb — płytkowa glikoproteina Ib; GPIIb-IIIa — płytkowa glikoproteina IIb-IIIa; GPIV — płytkowa glikoproteina IV; GPVI — płytkowa glikoproteina VI; vWF — czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*); PAF — czynnik aktywujący płytki (ang. *Platelet Activating Factor*), TxA₂ — tromboksan A₂ (ang. *thromboxane A₂*); CD — antygen różnicowania komórek (ang. *cell differentiation antigen*); VLA — bardzo późno pojawiający się antygen (ang. *Very Late Antigen*); Fab — fragment przeciwciała wiążący się z antygenem (ang. *antigen binding fragment*).

I. Wstęp

W warunkach fizjologicznych płytki krwi nie przylegają do komórek śródbłonka wyścielających naczynia krwionośne. Przerwanie ciągłości komórek śródbłonka powoduje odsłonięcie warstwy podśródbłonka i natychmiastową adhezję płytek krwi [1-3]. Adhezja płytek krwi do składników podśródbłonka, m.in. do kolagenu, fibronektyny i czynnika vWF początkuje proces hamowania krwawienia. Adhezja płytek jest też przyczyną trombozy, gdy zawodzą skomplikowane mechanizmy regulujące krzepnięcie krwi i rozpuszczanie zakrzepu. Ponieważ kolagen jest najbardziej trombogenny ze wszystkich składników podśródbłonka [1], poznanie mechanizmów adhezji płytek do kolagenu jest niezmiernie ważne. Od wielu lat trwają badania białek płytkowych odpowiedzialnych za pro-

Contents:

- I. Introduction
- II. Techniques used to study adhesion of platelets to collagen
- III. General characteristics of platelets adhesion to collagen
- IV. Primary receptors
 - IV-1. Similarity of GPIa-IIa to integrin receptors
 - IV-2. GPIa-IIa as a collagen receptor
 - IV-3. Characteristics of GPIV
 - IV-4. Biological functions of GPIV
 - IV-5. Nak⁴ antigen
 - IV-6. GPVI as a collagen receptor
 - IV-7. Involvement of GPIb in platelet adhesion to collagen
- V. GPIIb-IIIa as a secondary receptor
- VI. Concluding remarks

ces adhezji do kolagenu. Badania te wyłoniły szereg receptorów płytkowych, które biorą udział w pierwszorzędowej i drugorzędowej adhezji. Adhezja pierwszorzędowa zależy od receptorów działających na powierzchni niezaaktywowanych płytek krwi i bezpośrednio łączących się z kolagenem, jakimi są obecne w błonach płytek glikoproteiny, np. GPIa-IIa, GPIV i GPVI. Szczególnym przypadkiem jest GPIb, która jest czynna na niezaaktywowanych płytkach, a łączy

Tabela 1.

Receptory kolagenu płytek krwi.

GP	kDa		Ilość cząsteczek na powierzchni płytki
	Warunki nieredukujące	Warunki redukujące	
Ib	170	Ib α 143 Ib β 23	25 000 [17]
Ia	165	150	800-1 800 [4, 21, 27, 31, 33]
IIa	130	145	nb [4, 21, 27, 31, 33]
IIb	145	IIb α 130 IIb β 23	40 000-60 000 [21]
IIIa	90	115	40 000-60 000 [21]
IV	88	88	12 000-27 000 [47-49, 64, 67]
VI	57	62	nb [14, 23]

* Dr, Urszula Kralisz, Zakład Biofizyki Instytutu Fizjologii i Biochemii, A.M. ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź

nb — nie badano ilości glikoprotein na powierzchni płytki. W nawiasach podano l.p. odnośnych pozycji w wykazie piśmiennictwa.

się z kolagenem za pośrednictwem czynnika vWF. W adhezji drugorzędowej biorą udział receptory drugorzędowe, których działanie zależy od aktywacji płytek np. GPIIb-IIIa. Udział receptorów II rzędowych w bezpośrednim połączeniu płytki z kolagenem jest niewielki, ale zwiększa się on w obecności fibronektyny, czynnika vWF i fibrynogenu, które łączą zaaktywowany receptor z kolagenem [4-6]. Poznane dotychczas receptory kolagenu płytek krwi zebrane są w tabeli 1. Złożoność procesu adhezji polega nie tylko na występowaniu wielu receptorów płytkowych i wielu miejsc na kolagenie łączących się z nimi, ale również na udziale wielu białek pośredniczących pomiędzy płytką a kolagenem, które reagują ze sobą. Tak na przykład fibronektyna łączy się z trombospondyną, czynnik vWF z kolagenem, fibronektyną i trombospondyną [7-9]. Ponadto, białka adhezyjne tworzą połączenia pomiędzy receptorami płytkowymi np. fibrynogen i trombospondyna łączą GPIIb-IIIa z GPIV na powierzchni płytek, a cały kompleks łączy się z kolagenem [10]. Zainicjowany, przez początkowe połączenie kolagenu z wieloma receptorami pierwszorzędowymi, słaby kontakt pomiędzy płytką krwi a kolagenem ulega wielokrotnemu wzmocnieniu i stabilizacji, dzięki interakcjom receptorów drugorzędowych z kolagenem i innymi białkami adhezyjnymi. Ponadto, kolagen wywołuje uwalnianie z ziarnistości płytkowych wielu biologicznie czynnych substancji m.in. serotoniny, ADP, białek adhezyjnych: fibrynogenu, trombospondyny, czynnika vWF, które potęgują adhezję i są niezbędne dla wytworzenia agregatów płytkowych, także inicjuje krzepnięcie osocze. Wynikiem tych interakcji jest utworzenie mocnego usieciowania pomiędzy płytką a kolagenem i utworzenie czopu hemostatycznego [3, 5-6, 11].

Celem tej pracy jest opisanie receptorów kolagenu płytek krwi, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów pierwszorzędowych, takich jak GPIa-IIa i GPIV, ponieważ badania ostatnich kilku lat umożliwiły poznanie ich struktury i funkcji.

II. Techniki badania adhezji płytek krwi

Stosuje się obecnie dwa rodzaje technik badania adhezji: przepływowe i statyczne. Komora przepływowa, wynaleziona przez Baumgartnera i Haunderschildta [12], a zmodyfikowana przez Sakariassena [13] umożliwia badanie *in vitro* w pełnej krwi adhezji płytek do podśródbłonka naczyń krwionośnych, lub do izolowanych jego składników w warunkach przepływu. Warunki adhezji płytek w komorze przepływowej są zbliżone do adhezji *in vivo* i umożliwiają określenie wpływu na adhezję takich czynników jak np.: szybkość przepływu krwi, hematokryt, składniki osocza. Ze względu na złożoność procesu adhezji, tj. udział wielu receptorów płytkowych reagujących równocześnie z wieloma białkami adhezyjnymi, stosuje się różnorodne techniki badania adhezji w warunkach

statycznych [4, 6, 14-16]. W odróżnieniu od technik przepływowych, pozwalają one na badanie procesu adhezji z całkowitym wyeliminowaniem tworzenia agregatów płytkowych. Techniki statyczne, gdzie kontakt płytek krwi z kolagenem zachodzi na skutek siły grawitacji (np. opadanie płytek zawieszonych w roztworach na dno naczyń, które są pokryte warstwą kolagenu), i gdzie przyległe płytki nie są narażone na siły ścierania (*shear stress*) występujące w płynącej krwi, są mniej zbliżone do adhezji *in vivo* niż techniki przepływowe. Dostarczają one jednak wielu cennych informacji np. umożliwiają badanie izolowanych receptorów płytkowych odpowiedzialnych za pierwszy kontakt z kolagenem.

III. Ogólna charakterystyka adhezji płytek krwi do kolagenu

Opisano dotychczas 12 genetycznie różnych typów kolagenu. W ścianie naczyń krwionośnych stwierdzono obecność kolagenu typów I, III, IV i V [4, 17-18]. Płytki krwi przylegają do fibrylarnego i monomerycznego kolagenu, ale tylko przyleganiu do fibrylarnego towarzyszy aktywacja płytek i uwalnianie zawartości z ziarnistości płytkowych [4]. W największym stopniu (około 25% adhezji) płytki krwi przylegają do kolagenu typów I i III, w nieco mniejszym (20%) do kolagenu typu IV. Przyleganie do kolagenu typu V jest bardzo niewielkie (2%) i nie towarzyszy mu rozplaszczanie płytek, ich aktywacja i tworzenie agregatów [4, 17-18]. Płytki krwi nie przylegają do zdenaturowanego kolagenu (żelatyny) [4]. Reakcja uwalniania i aktywacja płytek nie są konieczne do zainicjowania adhezji, ale zwiększają ją kilkukrotnie poprzez uczynianie receptorów drugorzędowych [3-6, 19]. Adhezja zależy od obecności jonów; jony Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{+2} i Zn^{+2} zwiększają adhezję, jony Sr^{+2} nie mają na nią wpływu, a jony Ca^{+2} hamują adhezję zależną od Mg^{+2} [4, 6, 15, 20-21]. Adhezja płytek przy fizjologicznych wartościach stężeń jonów wapnia i magnezu jest niższa o około 50%, niż adhezja badana w obecności samych jonów magnezu [4]. Adhezja płytek wywołuje szereg zmian metabolicznych m.in. zwiększanie wewnątrzkomórkowego poziomu jonów wapnia, uwalnianie kwasu arachidonowego z fosfolipidów błonowych i jego przekształcanie w tromboksan A_2 , fosforylacje wielu białek płytkowych, zwiększanie przemiany fosfolipidów inozitolowych, obniżanie poziomu cAMP i zwiększanie poziomu cGMP [14-15, 22-23]. Zmiany te są konieczne do zapoczątkowania aktywacji i agregacji płytek. Energia metaboliczna nie jest potrzebna do utworzenia początkowego kontaktu płytka-kolagen, natomiast jest ona niezbędna dla następującego później rozplaszczania płytek i ich agregacji [16, 24]. W przeciwieństwie do innych procesów płytkowych, np. reakcji uwalniania i agregacji, wzrost poziomu cAMP i hamowanie syntezy TxA_2 nie mają wpływu na adhezję [4, 21, 25].

IV. Receptory pierwszorzędowe

IV-1. Podobieństwo receptorów glikoproteiny GPIa-IIa do receptorów integryny

Heterodimer GPIa-IIa (integryna $\alpha_2\beta_1$) jest jednym z bardzo późno pojawiających się antygenów rodziny VLA₂ (ang. *Very Late Antigen*), początkowo opisanych odnośnie limfocytów T. GPIa jest homologiczna z łańcuchem α_2 VLA₂, a GPIIa jest homologiczna z łańcuchem β_1 [26]. Pierwszorzędowa struktura GPIa została poznana. Wykazuje ona około 25% homologii sekwencji aminokwasowej z innymi podjednostkami α integryn [27]. Homologia ta nie jest duża, zważywszy na fakt, że homologia łańcuchów β różnych integryn wynosi około 45% [28].

GPIa zawiera zbudowaną ze 191 reszt aminokwasowych, tzw. domenę I, która występuje tylko w nielicznych białkach, np. w vWf, w czynnikach dopełniacza B i C2, podjednostkach β_2 integryn oraz w podjednostkach α receptorów adhezyjnych leukocytów Mac-1 i p150,95. Domena I nie występuje w wielu integrinach zawierających podjednostkę α_2 . Sugeruje się, że domena ta jest ważna dla wytworzenia połączenia GPIa z kolagenem [27].

GPIa jest połączona z białkami cytoszkieletu płytkowego; około 50% GPIa znajduje się w nierozpuszczalnym w Tritonie X 100 lizacie płytkowym, podczas gdy prawie cała GPIIa znajduje się w lizacie rozpuszczalnym [29-30]. GPIa-IIa w płytkach nieaktywowanych obecna jest w błonie plazmatycznej i błonach ziarnistości α . GPIa błon ziarnistości α znajduje się w błonie plazmatycznej dopiero po aktywacji płytek [30]. Zawartość GPIa-IIa w błonie plazmatycznej płytek różnych dawców wykazuje dużą zmienność warunkując stopień adhezji płytek do kolagenu [31].

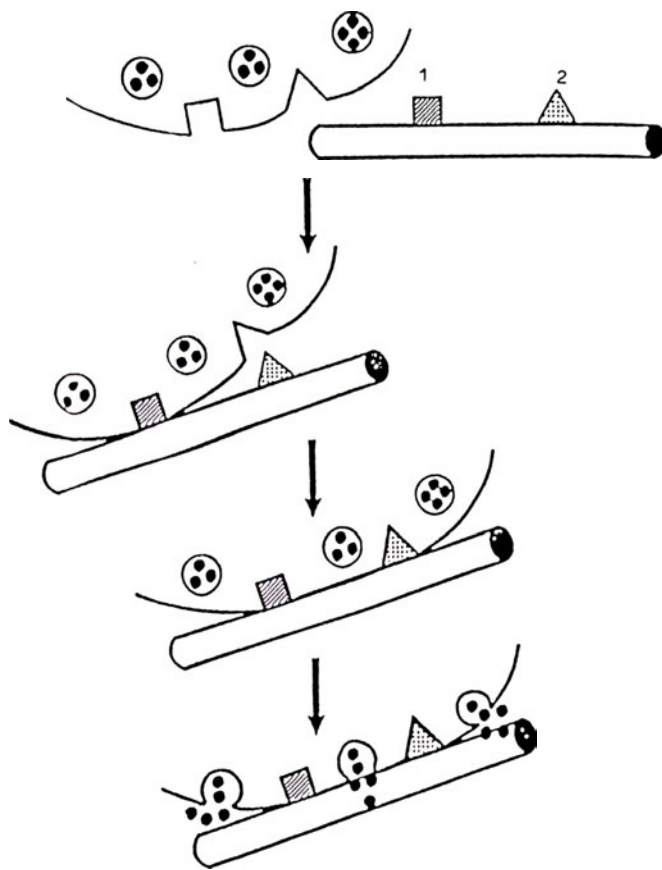
GPIIa płytek krwi tworzy również heterodimeryczne połączenie z GPIc, która jest analogiczna z łańcuchem α VLA-5 limfocytów. GPIc-IIa jest najprawdopodobniej receptorem fibronektyny i lamininy [26].

IV-2. GPIa-IIa jako receptor kolagenu

Bardzo liczne są dane doświadczalne przemawiające za funkcjonowaniem GPIa-IIa jako zależnego od Mg^{+2} receptora uczestniczącego w pierwszorzędowej adhezji płytek do kolagenu. Dane te wskazują, że udział GPIa-IIa w adhezji płytek krwi jest największy pod nieobecność białek osocza, w ich obecności natomiast również inne receptory płytkowe uczestniczą w adhezji [4, 32, 20]. Adhezja płytek do chemicznie zmodyfikowanego kolagenu oraz jego fragmentów peptydowych wykazała, że miejscem inicjującym połączenie GPIa-IIa z kolagenem jest tetrapeptyd DGEA, występujący we fragmencie CB3 łańcucha $\alpha 1(I)$ kolagenu (pozycje 435-438). Adhezja płytek do innych miejsc

kolagenu, tj. do peptydów CB7 i CB8, jest częściowo zależna od GPIa-IIa, a częściowo od innych receptorów płytkowych [33]. Połączenie GPIa-IIa z tetrapeptydem DGEA nie wywołuje aktywacji płytek [5, 34-35]. Boczne grupy karboksylowe reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego są niezbędne dla prawidłowej adhezji w której pośredniczy GPIa-IIa, przy czym zarówno długość łańcucha bocznego oraz jego ujemny ładunek odgrywają ważną rolę. Modyfikacja ϵ -aminowych grup lizyny nie ma wpływu na adhezję zależną od jonów Mg^{+2} . Obniża ona natomiast adhezję niezależną od jonów magnezu, w której biorą udział receptory płytkowe o niższym niż GPIa-IIa powinowactwie do kolagenu. Receptory te są niezbędne dla sekrecji i agregacji następującej po początkowej adhezji [5]. Model adhezji płytek krwi, z udziałem GPIa-IIa, przedstawiono na rycinie 1.

Pierwszy przypadek defektu hemostazy związany z GPIa-IIa opisał Nieuwenhuis i wsp. [36]. Płytki krwi płacjentki z objawami znacznie przedłużo-



Ryc. 1 Schemat ilustrujący zapoczątkowanie adhezji płytek krwi do kolagenu (wg. [5], zmodyfikowano)

Płytki krwi początkowo przylegają do włókien kolagenu w sposób zależny od jonów dwuwartościowych. Adhezja pierwszorzędowa pośredniczona jest przez GPIa-IIa, receptor o dużym powinowactwie do kolagenu, wiążący się z sekwencją DGEA kolagenu-1. Adhezja pierwszorzędowa umożliwia i przyspiesza równoczesne łączenie się wielu receptorów o niskim powinowactwie z miejscami na kolagenu zawierającymi boczne grupy aminowe-2. Połączenie się receptorów o niskim powinowactwie z kolagenem jest niezbędne dla uwolnienia zawartości ziarnistości płytkowych do środowiska zewnątrzkomórkowego i dla aktywacji GPIIb-IIIa.

nego czasu krwawienia (30 min) (normalny czas do 8 min) i częstym występowaniem sińców, nie zmieniały kształtu oraz nie agregowały pod wpływem różnych typów kolagenu. Adhezja tych płytek do kolagenu była bardzo niska i wynosiła tylko 4%, podczas gdy adhezja płytek osób zdrowych wynosiła 80% [37]. Oznaczanie zawartości glikoprotein powierzchniowych w płytkach krwi pacjentki wykazało obniżony poziom GPIIa, wynoszący około 15% poziomu normalnego, podczas gdy poziom innych glikoprotein był bez zmian [36]. Objawy kliniczne opisane w przypadku pacjentów z defektami GPIa-IIa wskazują na ważną funkcję tego receptora w oddziaływaniu płytek z kolagenem i potwierdzają wyniki badań *in vitro* [36-39]. Ponieważ objawy te należą do łagodnych, wskazują jednocześnie na ważne znaczenie w krzepnięciu krwi innych receptorów kolagenu płytek krwi oraz czynników krzepnięcia np. trombiny, fibrynogenu czy czynnika vWF. Należy dodać, że integryna $\alpha_2\beta_1$, która jest elektroforetycznie i immunochemicznie identyczna z GPIa-IIa płytek krwi, bardzo późno aktywującym się antygenem 2 limfocytów i z receptorami klasy II białek matrycy pozakomórkowej komórek fibroblastycznych, funkcjonuje wyłącznie jako receptor kolagenu w tych komórkach [40-41]. Integryna $\alpha_2\beta_1$ fibroblastów nie tylko łączy się z kolagenem, ale również zmienia strukturę kolagenu wywołując jego kurczenie się. Ma to ogromne znaczenie w procesie gojenia się ran i tworzenia blizn [40]. W innych komórkach np. śródbłonna czy komórkach linii czerniaka, integryna $\alpha_2\beta_1$ wykazuje szersze działanie i spełnia funkcje receptora kolagenu i lamininy [41-42]. W komórkach czerniaka integryna $\alpha_2\beta_1$ bierze udział w ich zdolnościach metastatycznych [41].

IV-3. Charakterystyka GPIV

GPIV (opisywana też jako GPIIb i GP88) [43], immunologicznie podobna do antygeny CD36 leukocytów [44], jest zbudowana z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, a więc nie należy do klasy receptorów integrynowych. Cechą charakterystyczną GPIV w płytkach krwi i w komórkach nabłonka jest niezwykle wysoka oporność na działanie wielu enzymów proteolitycznych takich jak chymotrypsyna, trypsyna, pepsyna, elastyna czy pronaza [45-47]. Ilość GPIV w płytkach osób zdrowych wynosi średnio 0.23 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ białka całkowitego płytek i ulega znacznym wahaniom [48]. Jak wykazały ostatnie badania, w błonie plazmatycznej płytek krwi znajduje się około 75% całkowitej GPIV, a w ziarnistościach α około 25% [49]. Antygen CD36 występuje na powierzchni komórek wielu typów jak np. monocyty, komórki nabłonka, niektóre komórki naskórka, płytki krwi, erytrocyty płodowe i komórki wielu hodowanych hematopoetycznych linii [44-47, 49-52]. Względna masa cząsteczkowa CD36 z różnych źródeł waha się od 78 kDa do 88 kDa, co wynika głównie z różnic zawartości cuk-

rowców, a nie różnic rodzaju i zawartości aminokwasów [47, 50, 53]. GPIV płytek krwi o masie cząsteczkowej 88 kDa, zawiera ok. 26% cukrowców. Po deglikozylacji jej masa cząsteczkowa wynosi 57 kDa, tak jak masy cząsteczkowe innych deglikozylowanych antygenów CD36 z różnych komórek [50, 54]. GPIV zawiera dwa krótkie regiony hydrofobowe, charakterystyczne dla regionów transbłonowych białek. Regiony te znajdują się blisko C- i N-końca cząsteczki. Sugeruje się, że GPIV składa się z jednej domeny zewnątrzpłytkowej i dwóch wewnątrzpłytkowych zawierających C- i N- koniec GPIV [54]. Takie ułożenie GPIV w błonie byłoby wyjątkiem wśród białek eukariotów, o ile zostanie ono potwierdzone przez inne badania.

IV-4. Funkcje biologiczne GPIV

Funkcja GPIV płytek krwi jako receptora kolagenu wynika z następujących obserwacji [6]:

1. Fragmenty Fab przeciwciał poliklonalnych przeciwko GPIV hamują całkowicie zmianę kształtu, agregację i uwalnianie zawartości ziarnistości α płytek krwi przez kolagen,
2. Izolowana GPIV hamuje całkowicie aktywację płytek pod wpływem kolagenu,
3. Izolowana GPIV wiąże się silnie z kolagenem (K_d 0.34 nM),
4. Fragmenty Fab przeciwciał poliklonalnych przeciwko GPIV hamują w największym stopniu początkową adhezję, wskazując na znaczenie GPIV w inicjowaniu adhezji.

Białko CD36 jest również receptorem trombospondyny i erytrocytów zarażonych zarodźcem malarii *Plasmodium falciparum* [55-59]. Adhezja zarażonych erytrocytów do białka CD36 komórek śródbłonna odgrywa rolę w przebiegu malarii, ponieważ zwiększa przeżywalność zarażonych erytrocytów w organizmie nie dopuszczając do ich usunięcia z krwioobiegu. Adhezja zarażonych erytrocytów jest też przyczyną okluzji naczyń krwionośnych mózgu [57-59].

Funkcjonowanie GPIV jako receptora kolagenu i trombospondyny jest od kilku lat przedmiotem intensywnych badań, przynoszących wielokrotnie sprzeczne wyniki [6, 53, 60-64]. Sprzeczności mogą być wywołane różnicami stopnia fosforylacji reszt serynowych i treoninowych izolowanej GPIV. Wykazano ostatnio, że właściwości GPIV zależą od reakcji fosforylacji i defosforylacji. W niezaaktywowanych płytkach GPIV jest ufosforylowana i działa jako wczesny receptor kolagenu powodując aktywację płytek, a to z kolei powoduje uwalnianie fosfatyz z ziarnistości płytkowych do środowiska zewnątrzkomórkowego. Uwolnione fosfatazy defosforylują domenę zewnętrzną GPIV (od aminokwasu 87 do 99), dzięki czemu traci ona zdolność wiązania się z kolagenem i łączy się z trombospondyną [65].

IV-5. Antygen Nak^a

Antygen Nak^a warunkuje powstawanie oporności na właściwe antygenowo HLA transfuzje płytkowe u osób fenotypu Nak^{a-}. Antygen ten jest obecny u 90-97% Japończyków i 99,7% Amerykanów [66-67]. Nie stwierdzono różnic w kodzie genetycznym antygeny Nak^{a-} i antygeny Nak^{a+}. Tak więc brak GPIV u Nak^{a-} osób może wynikać ze zwiększonej przemiany mRNA GPIV lub obniżonej stabilności tego białka [68]. Ponieważ płytki Nak^{a-} nie zawierają GPIV [66-67], są one doskonałym materiałem badawczym dla sprawdzenia fizjologicznej funkcji tej glikoproteiny. Płytki Nak^{a-} agregują normalnie pod wpływem kolagenu typów I i III oraz pod wpływem innych czynników agregujących płytki, natomiast nie agregują pod wpływem kolagenu typu V, który nie odgrywa znacznej roli w krzepnięciu krwi [18, 19, 60-61]. Adhezja Nak^{a-} izolowanych płytek jednego dawcy, badana w układzie statycznym, była taka sama jak adhezja płytek Nak^{a+} [63]. Adhezja płytek (badana w układzie statycznym i dynamicznym) innego dawcy z fenotypem Nak^{a-} była obniżona tylko w przypadku badania wczesnych czasów adhezji [62, 69]. Sugeruje to, że GPIV przyspiesza wczesną adhezję. Mimo braku płytkowej GPIV wszystkie przebadane dotychczas osoby są zdrowe i nie wykazują żadnych zaburzeń hemostazy [67]. Odmienne wyniki *in vitro* i *in vivo* sugerują, że GPIV jest jednym z wielu białek płytki łączącym się z kolagenem. Pod nieobecność GPIV inne białka przejmują jej funkcje nie doprowadzając do zaburzeń hemostazy u osobników z fenotypem Nak^{a-}.

V-6. GPVI jako receptor kolagenu

Jedynym dowodem na to, że GPIV działa jako receptor kolagenu jest brak tylko tej glikoproteiny powierzchniowej w płytkach pacjentki z przedłużonym czasem krwawienia, częstymi krwotokami z nosa i krwawieniami dziąseł. Płytki tej pacjentki wykazywały specyficzny defekt agregacji tylko pod wpływem kolagenu, podczas gdy agregacja przez inne czynniki była w normie. Płytki nie wykazywały adhezji do kolagenów wielu typów. Ponadto, fragmenty Fab przeciwciał przeciwko GPVI, które pojawiły się we krwi pacjentki po wielu transfuzjach płytkowych, hamowały agregację pod wpływem kolagenu płytek osób zdrowych [70-71].

V-7. Udział GPIb w adhezji płytek krwi do kolagenu

GPIb jest zbudowana z dwóch łańcuchów α i β połączonych mostkiem disiarczkowym. GPIb jest bardzo bogata w cukrowce, które stanowią aż 60% jej masy cząsteczkowej. Skład aminokwasowy oraz skład cukrowców są poznane. Jest ona receptorem obecnym na niezaaktywowanych płytkach czynnika vWF oraz ko-

lagenu, z którym łączy się za pośrednictwem czynnika vWF [72]. Miejscem wiązania czynnika vWF jest N-końcowy segment łańcucha α GPIb [73]. GPIb spełnia ważną rolę w adhezji w warunkach przepływu szczególnie przy wysokich gradientach prędkości krwi (*shear rate*) rzędu 1500 s^{-1} . Połączenie GPIb-vWF-kolagen jest na tyle silne, że przeciwstawia się sile ścierania (*shear stress*) i nie dopuszcza do oderwania przyległych do ściany naczynia płytek [3]. Płytki nie zawierające GPIb (Bernard-Soulier syndrome) oraz płytki chorych z niedoborem czynnika vWF (choroba von Willebranda) w niewielkich ilościach przylegają do odsłoniętego podśródbłonna i nie są zdolne do rozpościerania się [2, 33, 74]. Czynniki vWF jest obecny w plazmie, naczyniach krwionośnych oraz ziarnistościach płytkowych, z których jest uwalniany po aktywacji płytek [9, 72]. Sugeruje się, że czynniki vWF uwolniony z płytek jako tzw. propolipeptyd vWF, identyczny z antygenem II vWF, może również zapobiegać nadmiernej adhezji, poprzez maskowanie miejsc na włóknach kolagenowych reagujących z płytkami krwi [9]. Nie wykazano jak dotychczas roli GPIb w adhezji płytek do kolagenu badanej w warunkach statycznych, co świadczy o tym, że GPIb nie łączy się bezpośrednio z kolagenem.

V. GPIIb-IIIa jako receptor drugorzędowy

GPIIb-IIIa (integryna $\alpha_{IIb}\beta_3$) jest szeroko opisywanym kompleksem glikoprotein płytek krwi, a jego funkcje receptora fibrynogenu, fibronektyny, witronektyny i czynnika vWF oraz udział w tworzeniu agregatów płytkowych za pośrednictwem fibrynogenu są dobrze znane, [2, 11, 75]. W artykule tym ograniczę się do opisu udziału GPIIb-IIIa w adhezji płytek krwi do kolagenu.

Sugerowane początkowo działanie tych glikoprotein jako receptorów pierwszorzędowych kolagenu opierało się tylko na obserwacji hamowania adhezji statycznej płytek i hamowania adsorpcji glikoprotein płytkowych na włóknach kolagenowych przez przeciwciała monoklonalne PMI-1 przeciwko GPIIb-IIIa [76]. Liczne późniejsze doświadczenia wskazały, że przeciwciała PMI-1 wiążą się z uprzednio zaaktywowaną GPIIb-IIIa oraz że, główna funkcja GPIIb-IIIa w adhezji do kolagenu polega na wytwarzaniu połączeń pomiędzy płytką a kolagenem za pośrednictwem innych białek adhezyjnych. GPIIb-IIIa jest więc zależnym od aktywacji, drugorzędowym receptorem adhezji płytek krwi do kolagenu, co pokazały m.in. następujące fakty doświadczalne:

1. Płytki chorych na Trombasthenię Glanzmana (całkowity brak lub obniżona ilość GPIIb-IIIb) przylegają w układzie statycznym do kolagenu tak, jak płytki osób zdrowych [5],
2. Płytki trombasteniczne wykazują obniżoną adhezję tylko w warunkach przepływu przy wysokich gradientach prędkości (1800 s^{-1}), potwierdza-

jąc, że GPIIb-IIIa bierze udział w rozpościeraniu się płytek, a nie w tworzeniu początkowego kontaktu z kolagenem [2-3, 74].

Zaaktywowana GPIIb-IIIa bierze udział w adhezji drugorzędowej poprzez wytwarzanie połączeń pomiędzy płytką a kolagenem za pośrednictwem czynnika vWF, fibronektyny i trombospondyny. Aktywacja GPIIb-IIIa jest również niezbędna dla połączenia się płytek z fibrynogenem i agregacji płytek. Mechanizm aktywacji GPIIb-IIIa nie jest dokładnie poznany. Wyniki prac wskazują, że adhezji pierwszorzędowej towarzyszy fosforylacja białek wewnątrzkomórkowych. GPIa-IIa, receptor pierwszorzędowy, przesyła informacje o połączeniu się z kolagenem do wnętrza płytki (*outside-in signalling*) aktywując m.in. kinazy tyrozynowe [77, 78]. Kinazy te z kolei mogą przysyłać informacje do wewnątrzkomórkowych domen odpowiednich receptorów, w tym także do GPIIb-IIIa, wywołując ich aktywację.

VI. Uwagi końcowe

Adhezja płytek do kolagenu jest pierwszym etapem powstawania czopu hemostatycznego, przyczynia się do rozwoju arteriosklerozy, powstawania zakrzepów i zatorów w naczyniach krwionośnych. Poznanie molekularnych procesów rządzących adhezją może umożliwić skuteczniejsze zapobieganie wielu chorobom związanym np. z niedokrzepliwościami oraz nadkrzepliwościami krwi. Może to stać się możliwe na przykład poprzez zastosowanie peptydów naśladujących domeny funkcjonalne białek adhezyjnych, czy przez zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko tym domenom lub domenom receptorów płytkowych oddziaływujących z nimi.

Ze względu na złożoność procesu adhezji, w artykule tym nie omówiono szeregu ważnych czynników mających na niego wpływ, i tak nie omówiono wpływu gradientu prędkości krwi, wpływu erytrocytów i leukocytów, lepkości osocza. Nie omówiono też roli białek adhezyjnych, z których najważniejsze dla adhezji płytek do kolagenu są fibronektyna i czynnik vWF, a także wpływu komórek śródbłonna i uwalnianych z nich związków np. prostacyklin i tlenu azotu, artykuł bowiem dotyczył receptorów płytek krwi, które biorą udział w adhezji do kolagenu. Ważne wydaje się bliższe poznanie domeny receptorów pierwszo- i drugorzędowych wiążących się z kolagenem, struktury glikoproteiny VI, mechanizmu aktywacji receptorów drugorzędowych, mechanizmu przesyłania informacji od receptorów do wnętrza płytki oraz mechanizmu wpływu jonów na powinowactwo receptorów do kolagenu. Intensywne badania, trwające w wielu pracowniach, pozwolą na poznanie w najbliższej przyszłości tych i innych nierozwiązanych problemów.

Artykuł otrzymano 13 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 6 czerwca 1995 r.

Piśmiennictwo

1. Baumgartner MR (1977) *Thromb Haemostas* 37: 11-16
2. Sakariassen KS, Nieveelstein PFEM, Collier BS, Sixma JJ (1986) *Br J Haematol* 63: 681-691
3. De Groot PG, Sixma JJ (1990) *Br J Haematol* 75: 308-312
4. Santoro SA (1986) *Cell* 46: 913-920
5. Santoro SA, Walsh JJ, Statz WD, Baranski KJ (1991) *Cell Regulation* 2: 905-913
6. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA (1989) *J Biol Chem* 264: 7576-7583
7. Pietu G, Fressinard E, Girma JP, Nieuwenhuis HK, Rotschild C, Meyer D (1987) *J Lab Clin Med* 109: 637-643
8. Walz DA, Bacon-Baguley T, Kendra-Franczak S, DePoli P (1987) *Semin Thromb Hemostas* 13: 317-325
9. Takagi J, Sekiya F, Kasahara K, Inada Y, Saito Y (1989) *J Biol Chem* 264: 6017-6020
10. Beiso P, Pidard D, Fournier D, Dubernard V, Legrand C (1990) *Biochim Biophys Acta* 1033: 7-12
11. Siess W (1989) *Physiol Rev* 69: 89-93
12. Baumgartner HR, Haudenschildt C (1972) *Annals N Y Acad Sci* 201: 22-29
13. Sakariassen KS, Aarts PAMM, De Groot PG, Houdijk WPM, Sixma JJ (1983) *J Lab Clin Med* 102: 522-535
14. Smith JB, Selak MA, Dangelmaier C, Daniel JL (1992) *Biochem J* 288: 925-929
15. Smith JB, Dangelmaier C (1990) *Anal Biochem* 187: 173-178
16. Smith JB, Dangelmaier C, Selak MA, Daniel JL (1991) *J Cell Biochem* 47: 54-61
17. Parsons TJ, Haycraft DL, Hoak JC, Sage H (1983) *Arteriosclerosis* 3: 589-598
18. Parsons TJ, Haycraft DL, Hoak JC, Sage H (1986) *Thromb Res* 43: 435-443
19. Sinigaglia F, Balduini CL, Bisio A, Balduini C (1985) *Brit J Haematol* 59: 587-592
20. Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, Woods VL (1988) *Biochem Biophys Res Commun* 153: 217-223
21. Shadle PJ, Barondes SH (1982) *J Cell Biol* 95: 361-365
22. Polanowska-Grabowska R, Geanacopoulos M, Gear ARL (1993) *Biochem J* 296: 543-547
23. Polanowska-Grabowska R, Gear ARL (1994) *Blood* 83: 2508-2515
24. Dolowy K, Cunningham LW (1984) *Collagen Rel Res* 4: 111-118
25. Smith JB, Dangelmaier C, Selak MA, Ashby B, Daniel J (1992) *Biochem J* 283: 889-892
26. Pischel K D, Bluestein HG, Woods VL (1988) *J Clin Invest* 81: 505-513
27. Takada Y, Hemler ME (1989) *J Cell Biol* 109: 397-407
28. Kishimoto TK, O'Connor K, Lee A, Roberts TM, Springer TA (1987) *Cell* 48: 681-690
29. Fox JEB (1985) *J Clin Invest* 76: 1673-1683
30. Bienz D, Clemetson KJ (1989) *J Biol Chem* 264: 507-514
31. Kunicki TJ, Orzechowski R, Annis D, Honda Y (1993) *Blood* 82: 2693-2703
32. Collier BS, Beer JH, Scudder LE, Steinberg MH (1989) *Blood* 74: 182-192
33. Saelman EUM, Horton LF, Barnes MJ, Gralnick HR, Hese KM, Nieuwenhuis HKH, de Groot PhG, Sixma JJ (1993) *Blood* 82: 3029-3033
34. Staatz WD, Walsh JJ, Pexton T, Santoro SA (1990) *J Biol Chem* 265: 4778-4781
35. Staatz WD, Fok KF, Zutter MM, Adams SP, Rodriguez BA, Santoro SA (1991) *J Biol Chem* 266: 7363-7367
36. Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WPM, Sixma JJ (1985) *Nature (Lond)* 318: 470-472
37. Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk WPM, Nieveelstein PFEM, Sixma JJ (1986) *Blood* 68: 692-695
38. Kehrel B, Balleisen L, Kokott R, Mesters R, Stenzinger W, Clemetson KJ, van de Leo J (1988) *Blood* 71: 1074-1078

39. Deckmyn H, Chew SL, Vermylen J (1990) *Thromb Haemostas* **64**: 74-79
40. Schiro JA, Chan BMC, Roswit WT, Kassner PD, Pentland AP, Hemler ME, Eisen AZ, Kupper TS (1991) *Cell* **67**: 403-410
41. Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, Bankert RB, Weber L (1991) *J Cell Biol* **115**: 1427-1436
42. Carter WG, Wayner EA, Bouchard TS, Kaur P (1990) *J Cell Biol* **110**: 1387-1404
43. Catimel B, Parmentier S, Leung LKK, McGregor JL (1991) W: Kaplan-Covet C, Schlegal N, Salmon Ch, McGregor J (red) *Platelet Immunology: Fundamental and Clinical Aspects*, t 206. INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. str 41-53
44. Shaw S (1987) *Immunol Today* **8**: 1-3
45. Podolsak (1977) *Thromb Haemostas* **37**: 396-406
46. Greenwalt DE, Mather JM (1985) *J Cell Biol* **100**: 397-408
47. Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA (1989) *J Biol Chem* **264**: 7570-7575
48. Thibert V, Bellucci S, Edelman L, Tandon NN, Legrand C (1992) *Thromb Haemostas* **69**: 600-605
49. Berger G, Caen JP, Berndt MC, Cramer EM (1993) *Blood* **82**: 3034-3044
50. Greenwalt DE, Watt KWK, So OY, Jiwani N (1990) *Biochemistry* **29**: 7054-7059
51. Greenwalt DE, Watt KWK, H, Hasler T, Howard RJ, Patel S (1990) *J Biol Chem* **265**: 16296-16299
52. Imamura N, Mtasiwa DM, Inada T, Kuramoto A (1990) *Leukemia* **4**: 525-528
53. Kieffer N, Bettaieb A, Legrand C, Coulombel L, Vainchenker W, Edelman L, Breton-Gorius J (1989) *Biochem J* **262**: 835-842
54. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA (1992) *Blood* **80**: 1105-1116
55. Asch A, Barnwell R, Silverstein R, Nachman RL (1987) *J Clin Invest* **79**: 1054-1061
56. Alessio M, Greco NJ, Primo L, Ghigi D, Bosia A, Tandon NN, Ockenhouse CF, Jamieson GA, Malavasi F (1993) *Blood* **82**: 3637-3647
57. Barnwell JW, Asch AS, Nachman RL, Yamaya M, Aikawa M, Ingravallo P (1989) *J Clin Invest* **84**: 765-772
58. Oquendo P, Hundt E, Lawler J, Seed B (1989) *Cell* **53**: 95-101
59. Yamamoto N, Linpisarn S, Promtet N, Khamboonrueng C, Akamatsu N, Tanoue K (1993) *Thromb Haemostas* **69**: 1145
60. Kehrel B, Kronenberg A, Rauterberg J, Niesing-Bresch D, Niehues U, Kardoeus J, Schwipbert B, Tschope D, van de Leo J, Clemetson K (1993) *Blood* **82**: 3364-3370
61. Yamamoto N, Akamatsu N, Yamazaki H, Tanoue K (1992) *Brit J Haematol* **81**: 86-93
62. Tandon NN, Ockenhouse CF, Greco NJ, Jamieson GA (1991) *Blood* **78**: 2809-2813
63. McKeown L, Vail M, Hansmann K, Williams S, Kramer W, Hansmann K, Gralnick H (1994) *Blood* **83**: 2866-2871
64. Aiken ML, Ginsberg MH, Byers-Ward V, Plow EF (1990) *Blood* **76**: 2501-2509
65. Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M (1993) *Science* **262**: 1436-1439
66. Tomiyama S, Take H, Ikeda H, Mitani T, Furubayashi T, Mizutani H, Yamamoto T, Tandon NN, Sekiguchi S, Jamieson GA, Kurata Y, Yonezawa T, Tarui S (1990) *Blood* **75**: 684-687
67. Yamamoto N, Ikeda H, Tandon NN, Herman J, Tomiyama Y, Mitani T, Sekiguchi S, Lipsky R, Kralisz U, Jamieson GA (1990) *Blood* **76**: 1698-1703
68. Lipsky R, Sobieski DA, Tandon NN, Herman J, Ikeda H, Jamieson GA (1990) *Thromb Haemostas* **65**: 456-457
69. Diazricart M, Tandon NN, Carretero M, Ordinas A, Bastida E, Jamieson GA (1993) *Blood* **82**: 491-497
70. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kenaji K, Uchino H (1987) *Blood* **69**: 1712-1720
71. Moroi M, Jung MS, Okuma M, Shinmyozu K (1989) *J Clin Invest* **84**: 1440-1445
72. Fitzsimmons CM, Cockburn CG, Hornsey V, Prowse CV, Barnes MJ (1988) *Thromb Haemostas* **59**: 186-192
73. Handa M, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Ruggeri ZM (1986) *J Biol Chem* **261**: 12579-12585
74. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR (1986) *Blood* **67**: 322-330
75. Cierniewski CzS (1993) *Post Bioch* **40**: 45-55
76. Tsenuhisa S, Tsuji T, Tohyama H, Osawa T (1984) *Biochim Biophys Acta* **797**: 10-19
77. Kralisz U, Tandon NN, Jamieson GA (1993) *Thromb Haemostas* **69**: 688
78. Haimovich B, Lipfert L, Brugge JS, Shattil SJ (1993) *J Biol Chem* **268**: 15868-15877

Podręcznik laboratoryjny

Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk opracował podręcznik laboratoryjny pt. „Inżynieria Genetyczna i Biologia Molekularna. Metody”, w którym zawarto na 170 stronach 67 metod sprawdzonych i stosowanych w IBB PAN. Wydawcą książki jest „TECHGEN” spółka z o.o. ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, tel./fax 658-47-89, u którego można zamawiać i nabywać podręcznik.

Oddziaływania białek z uszkodzonym DNA

Interactions of proteins with damaged DNA

PIOTR WIDŁAK*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Naprawa DNA
- III. Replikacja
- IV. Aktywność nukleolityczna
- V. Transkrypcja
- VI. Struktura chromatyny
- VII. Uwagi końcowe

I. Wstęp

Oddziaływania białek i kwasów nukleinowych są podstawą niemal wszystkich procesów powielania i ekspresji informacji genetycznej, umożliwiają tworzenie chromatyny, a także syntezę i degradację kwasów nukleinowych. W komórce funkcjonują specyficzne białka rozpoznające zmiany struktury DNA na różnych poziomach organizacji chromatyny. Zmiany wywołane nie tylko chemiczną modyfikacją zasad, ale również nieprawidłowo sparowanymi zasadami (przykładem mogą być białka biorące udział w procesie „mismatch repair” lub korekcyjna aktywność egzonukleolityczna polimeraz DNA), lub ich nietypowym ułożeniem przestrzennym (na przykład białka wiążące się ze strukturą Z-DNA) [1-3].

Przykładem tego, jakie znaczenie może mieć dla komórki zmiana oddziaływań białek z DNA jest „endogenna” metylacja DNA. Obecność zmetylowanych zasad (głównie 5-metylocytozyny, ale również N⁶-metyloadeniny) oprócz wpływu na stabilność dwuniciowej struktury DNA jest czynnikiem zmieniającym swoistość oddziaływań z białkami. Poziom metylacji specyficznych sekwencji DNA związany jest z regulacją inicjacji replikacji i wiązaniem czynników transkrypcyjnych, chromatyna „aktywna” jest zwykle hypometylowana. U kręgowców metylacja i demetylacja DNA uważana jest za jeden z czynników związanych z regulacją wzrostu i różnicowania komórek [4].

5-metylocytozynę w DNA można traktować jako addukt, którego powstawanie pozostaje pod kontrolą komórki (metylacja jest postreplikacyjnym procesem enzymatycznym, katalizowanym przez specyficzne DNA-metylotransferazy). Jednak wiele zmian struktury DNA indukowanych jest przez czynniki „niekon-

Contents:

- I. Introduction
- II. DNA repair
- III. Replication
- IV. Nucleolytic activity
- V. Transcription
- VI. Chromatin structure
- VII. Remarks

trolowane”, pochodzące zarówno ze środowiska zewnętrznego (związki chemiczne i promieniowanie elektromagnetyczne), jak i ze środowiska wewnętrznego (produkty „normalnego” metabolizmu komórki) [5]. Te uszkodzenia makrocząsteczek zmieniając oddziaływanie białko-DNA mogą mieć również wpływ na przebieg procesów komórkowych. Czynniki, które poprzez zmianę oddziaływań białko-DNA zaburzają procesy replikacji, rekombinacji i naprawy DNA, mają często charakter mutagenów. Inne czynniki, nie powodujące bezpośrednio mutacji, poprzez wpływ na strukturę chromatyny czy procesy transkrypcji mogą zmieniać sposób ekspresji informacji genetycznej. Przedmiotem niniejszej pracy jest przegląd zjawisk związanych z wywołanymi przez uszkodzenia DNA zmianami oddziaływań białek z DNA, a także znaczeniem tych zmian dla procesów mutagenozy i kancerogenozy.

II. Naprawa DNA

Białkami, których oddziaływanie z uszkodzonym DNA ma ogromne znaczenie dla procesów mutagenozy i nowotworzenia są białka naprawiające DNA. Jednym z mechanizmów naprawy DNA jest (*nucleotide excision repair* NER). Ponieważ w ostatnim czasie, również w piśmiennictwie polskim, ukazało się wiele prac przeglądowych dotyczących tego mechanizmu [6-11], tutaj omówiony zostanie głównie pierwszy etap naprawy DNA: faza rozpoznawania uszkodzeń DNA przez enzymy naprawcze. Funkcjonowanie mechanizmu NER poznane jest najlepiej na przykładzie kompleksu UvrABC endonukleazy z komórek *Escherichia coli*. W dużym uproszczeniu kompleks funkcjonuje w następujący sposób: po rozpoznaniu uszkodzenia, białka kompleksu wiążą się z DNA i nacinają nić zawierającą uszkodzenie w odległości kilku (kilkunastu) nukleotydów po stronie 3' i 5' od uszkodzenia, następnie wycięty fragment zostaje uzupełniony przez

* Dr; Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice.

polimerazę i ligazę DNA. Białkiem rozpoznającym uszkodzony fragment DNA (o 1000-krotnie większym powinowactwie do DNA uszkodzonego niż do nieuszkodzonego) jest UvrA. W warunkach fizjologicznych z uszkodzonym fragmentem DNA wiąże się najprawdopodobniej dimer A_2 . Rejon oddziaływania obejmuje około 30 bp wokół uszkodzenia. Kompleks A_2 -DNA jest nietrwały; jeśli nie nastąpi przyłączenie białka UvrB rozpada się. Po oddysocjowaniu dimeru A_2 do związanego z DNA białka UvrB przyłącza się białko UvrC i następuje nacięcie nici DNA. Kompleks UvrABC rozpoznaje i naprawia uszkodzenia, które w różnym stopniu zaburzają strukturę DNA. W związku z szerokim spektrum potencjalnych substratów, wydaje się że białko UvrA rozpoznaje nie tyle specyficzne uszkodzenia, co raczej pewne wspólne dla wszystkich naprawianych uszkodzeń cechy strukturalne [3, 12]. Funkcją białka UvrA w procesie NER jest umożliwienie oddziaływania uszkodzonego DNA z UvrB i UvrC, białkami które same nie wykazują powinowactwa do uszkodzonego DNA [13]. Postulowany jest również model, w którym DNA „kontrolowany” byłby przez kompleks UvrA₂B. Według tego modelu, białko UvrB byłoby czynnikiem rozpoznającym zaburzenia hydrofobowych oddziaływań między pierścieniami zasad ułożonych kolejno w nici DNA (*base stacking interactions*), które prawdopodobnie powstają w przypadku wszystkich uszkodzeń DNA [14].

W komórkach eukariotycznych również istnieją odpowiedniki (przynajmniej funkcjonalne) kompleksu UvrABC. Z procesem NER w komórkach eukariotycznych związanych jest kilkanaście białek, często funkcjonujących również w innych procesach komórkowych takich jak transkrypcja czy replikacja [8, 9]. W komórkach ludzkich zidentyfikowano dwa rozpoznające uszkodzenia białka związane z NER, produkty genów *XPA* [15] i *XPE* [16]. Oba wiążą się preferencyjnie z DNA zawierającymi fotouszkodzenia; XPA 1000, a XPE 10000-krotnie silniej niż z nieuszkodzonym DNA. Sugeruje się również, że przynajmniej w przypadku preferencyjnej naprawy genów transkrybowanych, kompleks naprawiający DNA rozpoznaje nie bezpośrednio uszkodzenie DNA, ale zatrzymany na nim kompleks polimerazy RNA [17].

Zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych funkcjonują inne, nie związane z NER, enzymy naprawiające DNA. Zwykle rozpoznają one i usuwają jeden typ uszkodzeń. Przykładem mogą być fotoliaza i endonukleaza V faga T4 (specyficzne dla fotodimerów pirymidynowych) [18] czy O^6 -metyloguanino-DNA metylotransferaza, przenosząca grupy alkilowe z uszkodzonego DNA na własne reszty cysteinowe [6]. Białkiem, które wiąże się do DNA zawierającego przerwy w jednej nici jest polimeraza poli(ADP-rybozy). Białko to związane jest najprawdopodobniej z innym procesem naprawy DNA (*base excision repair*). Jednak jego rola w tym procesie nie jest jasna (być może polega na usuwaniu histonów

z uszkodzonego miejsca) [19, 20].

III. Replikacja

Białkami, których zmienione oddziaływania z uszkodzonym DNA mają kluczowe znaczenie w procesie mutagenyzy są polimerazy DNA. Uszkodzenie zmienia właściwości matrycy, w zależności od swojego charakteru (oraz od otaczającej sekwencji i cech polimerazy) zatrzymując kompleks replikacyjny lub osłabiając wierność z jaką polimeraza dobudowuje nowy nukleotyd. W pierwszym przypadku uszkodzenie powoduje zatrzymanie replikacji i zaburzenie cyklu podziałowego (a w efekcie często śmierć komórki), w drugim jest bezpośrednią przyczyną mutacji.

Jednym z czynników indukujących błędne parowanie zasad (i zarazem mutacje punktowe) jest obecność w komórce zmodyfikowanych nukleotydów, tak zwanych analogów zasad [21]. Niektóre z nich powstają w wyniku chemicznej metylacji DNA. Wbudowywanie tyminy naprzeciw O^6 -metyloguaniny jest przyczyną tranzykcji G→A, a wbudowywanie guaniny naprzeciw O^4 -metylotyminy jest przyczyną tranzykcji T→C [5]. Również zdolność polimeraz do wbudowywania adeniny naprzeciw miejsc o „nieokreślonej” wartości informacyjnej (np. miejsca apurynowe) może być jedną z przyczyn mutacji (tzw. „A rule”) [22].

Uszkodzenia DNA powodują na ogół blokadę kompleksu replikacyjnego. Zablockowanie wydłużania nowosyntetyzowanej nici DNA zwykle ma miejsce naprzeciwko uszkodzenia lub naprzeciwko nukleotydu poprzedzającego uszkodzenie. Miejsce zatrzymania replikacji uzależnione jest zarówno od struktury uszkodzenia jak i od charakteru polimerazy DNA. I tak w przypadku polimerazy I DNA z *Escherichia coli* zatrzymanie replikacji następuje naprzeciwko glikolu tyminy, ale po alkalicznej konwersji glikolu w moczynową pochodną deoksyrybozy, o jeden nukleotyd wcześniej [23]. Indukowany przez 2-acetyloamino-fluoren addukt dG-C8-AF powoduje zatrzymanie wydłużania nici DNA naprzeciwko uszkodzenia, a forma acetylowana dG-C8-AAF (silniej zaburzająca strukturę DNA; patrz dalej) o jeden nukleotyd wcześniej [24]. Stwierdzono, że polimerazy DNA pozbawione aktywności 3'→5' egzonukleolitycznej kończą syntezę łańcucha DNA naprzeciwko uszkodzenia [23], lub nawet zdolne są do „przeciągnięcia” replikacji przez uszkodzenie (*bypass*) [25]. Prawdopodobnie zjawisko blokowania replikacji o jeden nukleotyd przed uszkodzeniem nie jest związane z niemożnością wbudowania nukleotydu naprzeciwko uszkodzenia, ale wynika z tego, że takie wbudowanie jest krokiem spowalniającym replikację i ułatwiającym korekcyjną aktywność egzonukleolityczną polimerazy [26]. Następnym krokiem mającym wpływ na blokadę replikacji jest spowolnienie wydłużania łańcucha DNA od miejsca uszkodzenia. Wydaje się zatem, że wyłączenie aktywności egzonukleolitycznej polimerazy DNA nie jest czynnikiem wystar-

czającym dla efektywnego replikowania uszkodzonego DNA. W komórkach bakteryjnych czynnikiem ułatwiającym kompletny przebieg replikacji (pomimo obecności uszkodzeń DNA) jest indukcja tzw. odpowiedzi SOS. Obecność indukowanych białek UmuC, UmuD i RecA jest czynnikiem, który (najprawdopodobniej poprzez wpływ na oddziaływania DNA-polimeraza) ułatwia polimerazie III DNA replikację zawierającego uszkodzenia DNA [27, 28].

Ciekawym zagadnieniem jest porównanie wpływu różnych uszkodzeń DNA na replikację z ich względną „mutagennością” czy „kancerogennością”. Postuluje się, że spośród różnych adduktów indukowanych przez węglowodory poliaromatyczne, arylowana adenina może być bardziej kancerogenna niż arylowana guanina. Porównano wpływ adeniny i guaniny arylowanej przez 7-bromometylobenzo(a)antracen na replikację prowadzoną przez polimerazę DNA faga T7 i stwierdzono, że oba addukty blokują syntezę DNA jeden nukleotyd przed uszkodzeniem. Okazało się jednak, że jeśli przed uszkodzoną adeniną znajdowała się tymina, to polimeraza błędnie wbudowywała guaninę naprzeciwko tej tyminy. Taki błąd związany był jednocześnie ze zjawiskiem „bypass” i kontynuacją replikacji (przy zainicjowaniu mutacji T→C). Zjawiska tego nie obserwowano w przypadku adduktu z guaniną [29, 30]. Amina aromatyczna 2-aminofluoren i jej pochodne indukują dwie główne formy adduktów DNA. Forma acetylowana dG-C8-AAF silnie zaburzająca dwuniciową strukturę DNA, odpowiedzialna jest za indukowane przez kancerogen efekty cytotoksyczne i uruchamianie odpowiedzi SOS. Forma nieacetylowana dG-C8-AF (w niewielkim stopniu zaburzająca strukturę DNA) jest czynnikiem indukującym mutacje punktowe. Prawdopodobnie obie formy adduktów różnią się wpływem na proces nowotworzenia [31]. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że addukty obu typów blokują syntezę DNA prowadzoną przez polimerazę DNA faga T7, lecz odmienna jest kinetyka obu reakcji. Naprzeciwko dG-C8-AF polimeraza DNA wbudowywała cytozynę 5×10^4 razy wolniej niż w przypadku niezmodyfikowanej guaniny, a naprzeciwko dG-C8-AAF 4×10^6 razy wolniej. W drugim przypadku dysocjacja enzymu od DNA następowała szybciej niż przejście przez uszkodzenie co powodowało zakończenie syntezy. Obecność adduktu osłabiała dokładność z jaką polimeraza dobudowywała nukleotydy. Dokładność ta była $500 \times$ niższa naprzeciwko dG-C8-AF i $100 \times$ niższa o jeden nukleotyd dalej. W obu przypadkach jako błędnie sparowaną zasadę polimeraza preferowała adeninę (indukując mutację G→T) [32]. Blokowanie replikacji przez dG-C8-AAF ma związek z delecjami indukowanymi przez ten addukt. Delecja jednego nukleotydu z sekwencji 5'-GGG-3' (indukowana przez addukt w 3' końcowej guaninie) wynika najprawdopodobniej z zablokowania polimerazy naprzeciwko tego adduktu a następnie „poślizgu” kompleksu replikacyjnego z terminalną

cytozyną do miejsca znajdującego się naprzeciwko następnej, nieuszkodzonej guaniny (mechanizm *slippage*) [33]. Postuluje się, że umożliwiające zajście takiego poślizgu cechy polimerazy III DNA z *Escherichia coli* są „niesymetryczne” względem obu nici DNA, co tłumaczyłoby zaobserwowaną większą częstość takiej mutacji w przypadku adduktu na nici opóźnionej (*lagging strand*) w porównaniu z nicią wiodącą (*leading strand*) [34]. W komórkach eukariotycznych replikację obu nici DNA katalizują najprawdopodobniej różne polimerazy. Przypuszcza się, że różnice w ich dokładności, mogą być jedną z przyczyn różnic w częstości mutacji związanych z uszkodzeniami obu nici DNA; np. wyższej częstości mutacji związanych z uszkodzeniami nici transkrybowanej, obserwowanej w komórkach z defektem preferencyjnej naprawy DNA [35].

Osobnym zjawiskiem związanym z wpływem uszkodzeń DNA na proces replikacji jest zmiana struktury sekwencji regulujących replikację (na przykład sekwencji *ori*). Wiadomo, że metylacja DNA w obrębie sekwencji *ori* (prawdopodobnie poprzez zmianę oddziaływań z białkami regulatorowymi) może być jednym z mechanizmów regulujących inicjację replikacji [4]. Inne chemiczne modyfikacje DNA w obrębie sekwencji regulatorowych również mogą być przyczyną zaburzeń inicjacji replikacji. Na przykład obecność O⁶-metyloguaniny w obrębie sekwencji *ori* wirusa SV40 blokuje wiązanie się dużego antygeny T, wirusowego czynnika wzrostu [36]. Stwierdzono również, że obecność wewnątrznicowego wiązania indukowanego przez cis-dwuaminodwuchloroplatynę (cis-DDP) jest czynnikiem hamującym aktywność helikazy kodowanej przez gen wirusa *Herpes simplex*, innego białka związanego ze startem replikacji [37].

W uproszczeniu, efekty cytotoksyczne wykazywane przez pewne czynniki środowiskowe związane są z zablokowaniem syntezy DNA (oraz RNA, patrz dalej) w miejscu uszkodzenia. Wykorzystywane jest to w terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem leków cytostatycznych takich jak cis-DDP. Natomiast indukowane przez uszkodzenia DNA mutacje związane są ze zdolnością polimeraz DNA do obejścia (*bypass*) takiego uszkodzenia przy jednoczesnym obniżeniu dokładności replikacji. Mechanizmem obrony przed replikacją zawierającego uszkodzenia DNA jest blokada cyklu komórkowego — tzw. *checkpoint control* [38, 39].

IV. Aktywność nukleolityczna

Enzymy nukleolityczne są białkami, których aktywność ma istotne znaczenie w takich procesach jak naprawa i rekombinacja DNA. Rozpoznają one także zmienione właściwości substratu (DNA) wynikające z jego chemicznej modyfikacji. Przykładem mogą być prokariotyczne nukleazy restrykcyjne rozpoznające specyficzne sekwencje DNA. Wywołana obecnością 5-metylocytozyny zmiana wzoru metylacji tych sek-

wencji może wpływać na ich rozpoznawanie przez odpowiednie izoschizomery endonukleaz restrykcyjnych, służąc jako rodzaj systemu rozpoznawania „swój/obcy” [40]. Podobnie jak endogenna 5-metylocytozyna, również inne zmodyfikowane zasady, takie jak O⁴-alkilotymina [41] czy fotodimery pirymidynowe [42] wpływają (w reakcji *in vitro*) na rozpoznawanie sekwencji zawierających uszkodzenie przez specyficzne enzymy restrykcyjne. Wiele innych enzymów nukleolitycznych o słabszej specyficy substratowej, badanych w układzie *in vitro*, również rozpoznaje uszkodzenia DNA. Nukleazy o aktywności 3'→5' fosfodiesteraz dla prawidłowego rozpoznawania i trawienia DNA wymagają niezmodyfikowanego nukleotydu po stronie 5' hydrolizowanego wiązania fosfodiesterowego. Na przykład nukleaza P1 i nukleaza S1 nie hydrolizują wiązań w sąsiedztwie glikolu tyminy, miejsc apurynowych i niektórych adduktów aromatycznych [43-45]. Z kolei nukleazy o aktywności 5'→3' fosfodiesterazy wymagają niezmodyfikowanego nukleotydu po stronie 3' wiązania fosfodiesterowego. I tak np. fosfodiesteraza z jadu węża nie hydrolizuje wiązań w których sąsiedztwie znajdują się fotodimery pirymidynowe [45].

Do nukleaz, które specyficznie hydrolizują wiązania fosfodiesterowe w pobliżu uszkodzenia należą wykazujące aktywność nukleolityczną białka związane z procesami naprawy DNA. Takie nukleazy naprawcze, oprócz AP-endonukleaz (enzymów specyficznych dla miejsc apurynowych i apirymidynowych), nie mają jednak specyficznego powinowactwa do zmodyfikowanego DNA (na przykład bakteryjne białka UvrB i UvrC czy ludzkie białka XPG i XPF) [46]. Ponieważ wiele uszkodzeń indukuje lokalne zaburzenia dwuniciowej struktury DNA, mogą one być rozpoznawane przez nukleazy specyficzne dla DNA jednoniciowego (np. nukleaza S1) [47].

V. Transkrypcja

Regulujące syntezę RNA białkowe czynniki transkrypcyjne oddziałują w sposób wysoce specyficzny z regulatorowymi sekwencjami DNA rozpoznając konkretne sekwencje nukleotydów. Modyfikacje nukleotydów w obrębie sekwencji regulatorowej (poprzez zmianę rozkładu potencjalnych miejsc tworzenia specyficznych wiązań wodorowych z aminokwasami) mogą zmieniać oddziaływanie z czynnikiem białkowym. Na przykład endogenna metylacja DNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów, a odmienne wzory metylacji sekwencji regulatorowych mogłyby odpowiadać za tkankowo specyficzną transkrypcję RNA [4]. Modyfikacje nukleotydów indukowane przez środowiskowe czynniki genotoksyczne również mogą wpływać na regulację ekspresji genów. Modyfikacja guanin (poprzez metylację w pozycji O⁶) w specyficznych miejscach promotora genu *fos* i wiążących czynniki transkrypcyjne SP1 i NFκB fragmentach sekwencji LTR wirusa HIV powoduje blokadę wiąza-

nia białkowych czynników transkrypcyjnych [48]. Podobnie alkilacja guanin indukowana przez pochodne iperytu blokuje wiązanie czynnika NFκB i uniemożliwia ekspresję genów będących pod kontrolą sekwencji LTR [49]. Również nie wiążące się kowalencyjnie z DNA czynniki interkalujące (takie jak antybiotyki dystamycyna A) mogą zablokować oddziaływanie czynników transkrypcyjnych z sekwencjami regulatorowymi [50]. Modyfikacja DNA w obrębie sekwencji promotorowych zmienia również ich oddziaływanie z polimerazami RNA. Na przykład metylacja guanin i adenin oraz tworzenie etylofosfotriestów w obrębie specyficznych miejsc promotora A3 faga T7 blokuje wiązanie polimerazy RNA z *Escherichia coli* [51]. Z drugiej strony indukowana przez iperyt alkilacja guanin w obrębie promotora lacUV5 powoduje niezależne od fazy transkrypcji, stabilne wiązanie polimerazy RNA [52]. Znane są również przykłady niespecyficznego wiązania czynników transkrypcyjnych do DNA zawierającego uszkodzenia. Na przykład czynnik hUBF [53] oraz białko HMG1 [54] wiążą się niespecyficznie z sekwencjami zawierającymi uszkodzenia indukowane przez cis-DDP. Takie niespecyficzne wiązanie czynników transkrypcyjnych może również (np. poprzez ograniczenie ich puli) zaburzać regulację transkrypcji.

Innym zjawiskiem związanym z wpływem uszkodzeń DNA na syntezę RNA jest blokada transkrypcji (i wynikająca z tego przedwczesna terminacja i synteza niepełnych transkryptów). Efektywność tej blokady zależy głównie od natury uszkodzeń DNA. Do uszkodzeń DNA silnie blokujących transkrypcję należą między- i wewnątrznicowe wiązania krzyżowe (szczególnie w obrębie nici transkrybowanej), indukowane na przykład przez pochodne iperytu [55] lub cis-DDP [56]. Innymi uszkodzeniami efektywnie blokującymi kompleks transkrypcyjny są addukty indukowane w DNA przez pochodne benzo(a)pyrenu, i słabiej, 2-acetyloaminofluorenu [57]. Przy tym odmiennie niż w przypadku syntezy DNA, obie formy adduktów indukowane przez 2-acetyloaminofluoren mają podobny wpływ na transkrypcję. Odpowiedzią komórki na potencjalne zagrożenia wynikające z wpływu uszkodzeń DNA na proces transkrypcji jest preferencyjna naprawa genów aktywnych transkrypcyjnie [17, 35].

VI. Struktura chromatyny

Chromatyna w jądrach komórek eukariotycznych zorganizowana jest w domeny. Organizacja taka ma znaczenie nie tylko strukturalne, związana jest również z regulacją replikacji i ekspresji genów. Domeny te, mające charakter pętli DNA, powstają najprawdopodobniej w wyniku oddziaływań niehistonowych białek tworzących szkielet jądrowy ze specyficznymi sekwencjami DNA, zwanych MAR (*matrix attached region*) lub SAR (*scaffold attached region*) [58-60]. Oddziaływanie sekwencji MAR z białkami mają inny charakter

niż oddziaływania białek z typowymi sekwencjami regulatorowymi. Wydaje się, że białka wiążące się z sekwencjami typu MAR rozpoznają ich specyficzne cechy strukturalne (takie jak zakrzywienie, zwężony rowek mniejszy i trwałe niesparowanie nici), a nie konkretną sekwencję zasad [60].

Uszkodzenia struktury DNA takie jak depurynacja czy metylacja adenin, w niewielkim stopniu wpływają na oddziaływania białek z sekwencjami MAR. Natomiast przerwanie fosfodiesterowego rdzenia DNA powoduje zaburzenie tych oddziaływań [61]. Również substancje interkalujące, takie jak dystamycyna A wiążąca się z DNA bogatym w pary AT i zmieniająca jego strukturę, są czynnikiem blokującym wiązanie białek z sekwencjami MAR [61, 62]. Wiadomo, że obecność dimerów pirymidynowych zmienia takie właściwości strukturalne DNA jak zakrzywienie helisy (*bending*) i parowanie zasad [3, 14], a więc cechy rozpoznawane przez białka wiążące sekwencje typu MAR. Można przypuszczać, że przynajmniej część indukowanych przez czynniki środowiskowe uszkodzeń DNA zmienia jego strukturę w stopniu wystarczającym do zaburzenia oddziaływań białek z sekwencjami MAR. Takie zmiany mogłyby mieć konsekwencje nie tylko strukturalne (zmiana długości pętli DNA) ale również funkcjonalne (zaburzenia regulacji replikacji i transkrypcji). Wydaje się więc, że podobnie jak uszkodzenia typowych sekwencji regulatorowych, uszkodzenia sekwencji MAR i zmiany struktury domen DNA mogą być związane z procesami epigenetycznymi zachodzącymi w procesie transformacji nowotworowej. Za taką hipotezą mogłoby przemawiać to, że zarówno białka tworzące szkielet jądrowy jak i związane z nim sekwencje DNA są szczególnie podatne na uszkodzenia przez środowiskowe kancerogeny [63], oraz fakt, że komórki prawidłowe i transformowane mogą wykazywać różnice w długości pętli DNA [64].

VII. Uwagi końcowe

Powyższy przegląd jest próbą przedstawienia potencjalnego znaczenia zmiany oddziaływań białek z uszkodzonym DNA dla procesów mutagenyzy i kancerogenyzy. Przegląd ten daleki jest od pełnego przedstawienia złożoności zjawiska. Między innymi nie uwzględnia faktu, że środowiskowe czynniki mutagenne i kancerogenne wpływają na zmianę oddziaływań białko-DNA również poprzez zmianę struktury białek. W związku z tym konieczne jest uzupełnienie tekstu o kilka uwag:

A) Kowalencyjna modyfikacja aminokwasów jest czynnikiem zmieniającym oddziaływania białko-DNA. Na przykład postranslacyjne enzymatyczne modyfikacje histonów są jednym z mechanizmów regulujących transkrypcję, replikację i cykl komórkowy [65]. Stwierdzono, że niektóre czynniki o charakterze kancerogenów również indukują modyfikacje histonów [66].

B). Część substancji o charakterze genotoksycznym modyfikuje również białka, tworząc addukty białkowe (*protein-adducts*). Przykładem może być benzo(a)pyren, indukujący addukty zarówno w DNA jak i w białkach jądrowych (np. w białkach macierzy jądrowej [67]).

C). Niektóre czynniki uszkodzające DNA są w stanie indukować kowalencyjne wiązania krzyżowe (*crosslinks*) pomiędzy DNA i białkami. Należą do nich promieniowanie UV [68] oraz cis-DDP i inne związki platyny [69, 70].

D). Białka oddziałujące z DNA (i zmieniające przez to jego strukturę) wpływają na stopień uszkodzania nukleotydów przez czynniki genotoksyczne. Ciekawym przykładem tego zjawiska są białka SASP obecne w przetrwalnikach *Bacillus subtilis*. Białka te wiążąc się z DNA zmieniają jego konformację z B-DNA na A-DNA. Pod wpływem promieniowania UV w A-DNA powstają typowe dla przetrwalników fotoaddukty, mniej toksyczne niż dimery pirymidynowe. Związane jest to z wykazywaną przez przetrwalniki bakterii opornością na cytotoksyczne działanie ultrafioletu [71].

Artykuł otrzymano 14 marca 1995 r.

Zaakceptowano do druku 29 maja 1995 r.

Piśmiennictwo

- Schleif R (1988) *Science* **241**: 1182-1187
- Churchill M E A, Travers A A (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 92-97
- van Houten (1990) *Microbiol Rev* **54**: 18-51
- Adams R L P (1990) *Biochem J* **265**: 309-320
- Marnett L J, Burcham P C (1993) *Chem Res Toxicol* **6**: 771-785
- Lehmann A R, Hoeijmakers J H J, van Zeeland A A, Backendorf C M P, Bridges B A, Collins A, Fuchs R P D, Margison G P, Montesano R, Moustacchi E, Natarajan A T, Radman M, Sarasin A, Seeberg E, Smith C A, Stefanini M, Thompson L H, Schans G P, Weber C A, Zdzienicka M Z (1992) *Mutation Res* **273**: 1-28
- Weeda G, Hoeijmakers J H J, Bootsma (1993) *BioEssays* **15**: 249-258
- Cleaver J E (1994) *Cell* **76**: 1-4
- Aboussekhra A, Wood R D (1994) *Curr Opin Genet Devel* **4**: 212-220
- Sancar A (1994) *Science* **266**: 1954-1956
- Walicka M (1994) *Post Biochem* **40**: 77-85
- Selby C P, Sancar A (1990) *Mutat Res* **236**: 203-211
- Sancar A, Hearst J E (1993) *Science* **259**: 1415-1420
- van Houten B, Snowden A (1993) *BioEssays* **15**: 51-59
- Robins P, Jones C J, Biggerstaff M, Lindahl T, Wood R D (1991) *EMBO J* **10**: 3913-3921
- Hwang B J, Chu G (1993) *Biochemistry* **32**: 1657-1666
- Drapkin R, Sancar A, Reinberg D (1994) *Cell* **77**: 9-12
- Grossman L, Caron P R, Mazur S J, Oh E Y (1988) *FASEB J* **2**: 2696-2701
- Sato H, Lindahl T (1994) *Cancer Res (Suppl)* **54**: 1899-1901
- Althaus F (1992) *J Cell Sci* **102**: 663-670
- von Borstel R C (1994) *Mutation Res* **307**: 131-140
- Strauss B S (1991) *BioEssays* **13**: 79-84
- Ide H, Kow Y W, Wallace S S (1985) *Nucl Acids Res* **13**: 8035-8052

24. Moore PD, Rabkin SD, Osborn AL, King CM, Strauss BS (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 7166-7170
25. Comess KM, Burstyn JN, Essigmann JM, Lippard SJ (1992) *Biochemistry* **31**: 3975-3990
26. Belguise-Valladier P, Maki H, Sekiguchi M, Fuchs RPP (1994) *J Mol Biol* **236**: 151-164
27. Echols H, Goodman MF (1990) *Mutation Res* **236**: 301-311
28. Livneh Z, Cohen-Fix O, Skaliter R, Elizur T (1993) *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**: 465-513
29. Hruszkewycz AM, Canella KA, Dipple A (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1659-1663
30. Hruszkewycz AM, Dipple A (1991) *Carcinogenesis* **12**: 2185-2187
31. Widłak P (1992) *Post Hig Med Dośw.* **46**: 463-475
32. Lindsley JE, Fuchs RPP (1994) *Biochemistry* **33**: 764-772
33. Lambert IB, Neapolitano RL, Fuchs RPP (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1310-1314
34. Veaute X, Fuchs RPP (1993) *Science* **261**: 598-600
35. Downes CS, Ryan AJ, Johnson RT (1993) *BioEssays* **15**: 209-216
36. Bignami M, Karran P, Lane DP (1991) *Biochemistry* **30**: 2857-2863
37. Villani G, Pillaire M-J, Boehmer PE (1994) *J Biol Chem* **269**: 21676-21681
38. Downes CS, Wilkins AS (1994) *BioEssays* **16**: 75-79
39. Anderson CW (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 433-437
40. McClelland M, Nelson M (1988) *Gene* **74**: 291-304
41. Richardson FC, Richardson KK (1991) *Mol Carcinogen* **4**: 162-168
42. Whittaker PA, Southern EM (1986) *Gene* **41**: 129-134
43. Reddy MV, Randerath K (1986) *Carcinogenesis* **7**: 1543-1551
44. Reddy MV (1991) *Carcinogenesis* **12**: 1745-1748
45. Weinfeld M, Buchko G W (1993) W: Philips DH, Castegnaro M, Bartsch H (red) *Postlabelling Methods for Detection of DNA adducts*, IARC, Lyon, str. 95-103
46. Sancar A (1994) *Science* **266**: 1954-1956
47. Legerski RJ, Gray HB, Robberson DL (1977) *J Biol Chem* **252**: 8740-8746
48. Bonfanti M, Brogginini M, Prontera C, D'Incalci M (1991) *Nucl Acids Res* **19**: 5739-5742
49. Fabbri S, Prontera C, Brogginini M, D'Incalci M (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1963-1967
50. Brogginini M, Ponti M, Ottolenghi S, D'Incalci M, Mongelli N, Mantovani R (1989) *Nucl Acids Res* **17**: 1051-1059
51. Siebenlist U, Simpson RB, Gilbert W (1980) *Cell* **20**: 269-281
52. Gray PJ, Phillips DR (1993) *Biochemistry* **32**: 12471-12477
53. Treiber DK, Zhai X, Jantzen H-M, Esigmann JM (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5672-5676
54. Pil PM, Lippard SJ (1992) *Science* **256**: 234-237
55. Gray PJ, Cullinane C, Phillips DR (1991) *Biochemistry* **30**: 8036-8040
56. Cullinane C, Wickham G, McFadyen WD, Denny WA, Palmer BD, Philips DR (1993) *Nucl Acids Res* **21**: 393-400
57. Nath ST, Lee MS, Romano LJ (1987) *Nucl Acids Res* **15**: 4257-4271
58. Jackson DA, Dolle A, Robertson G, Cook PR (1992) *Cell Biol Int Rep* **16**: 687-696
59. Vemuri MC, Raju NN, Malhotra SK (1993) *Cytobios* **76**: 117-128
60. Boulikas T (1993) *J Cell Biochem* **52**: 14-22
61. Dickinson LA, Joh T, Kohwi Y, Kohwi-Shigematsu T (1992) *Cell* **70**: 631-645
62. Kas E, Izaurralde E, Laemmli UK (1989) *J Mol Biol* **210**: 587-599
63. Widłak P (1994) *Post Biochem* **40**: 194-199
64. Linsken MHK, Eijsermans A, Dijkwel PA (1987) *Mutation Res* **178**: 245-256
65. Bradbury EM (1992) *BioEssays* **14**: 9-16
66. Wagner VO, Blevins RD (1993) *Arch Environ Contam Toxicol* **25**: 260-266
67. Widłak P, Rzeszowska-Wolny J (1993) *Acta Biochim Polon* **40**: 559-562
68. Hockensmith JW, Kubasek WL, Vorachek WR, Evertsz EM, von Hippel P (1991) *Methods Enzymol* **208**: 211-236
69. Ferraro A, Grandi P, Eufemi M, Altieri F, Turano C (1992) *FEBS Lett* **307**: 383-385
70. van Houten B, Illenye S, Qu Y, Farrell (1993) *Biochemistry* **32**: 11794-11801
71. Mohr SC, Sokolov NVHA, He C, Setlow P (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 77-81

Biologiczne skutki modyfikacji lipoprotein

Biological consequences of lipoprotein modification

HANNA WEHR*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Receptory komórkowe LDL
- III. Peroksydacja lipoprotein. Wpływ utlenionych LDL na ścianę naczyniową
- IV. Inne modyfikacje
 - IV-1. Glikacja
 - IV-2. Karbamyłacja i inne
 - IV-3. Reakcja z acetaldehydem (etylacja)
- V. Przeciwciała przeciw zmodyfikowanym lipoproteinom
- VI. Modyfikacje HDL
- VII. Dyskusja i uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: LDL — lipoproteiny o niskiej gęstości; VLDL — lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości; IDL — lipoproteiny o pośredniej gęstości; HDL — lipoproteiny o wysokiej gęstości.

I. Wstęp

Lipoproteiny są białkami łatwo ulegającymi modyfikacjom chemicznym w żywych organizmach. Podobnie jak w przypadku innych białek również w lipoproteinach modyfikowane są często wolne grupy aminowe aminokwasów zasadowych — lizyny i argininy. Przyłączane do tych reszt rodniki tworzą początkowo nietrwałe pochodne, z których następnie pod wpływem czynnika redukującego powstają trwałe kompleksy.

Przedmiotem niniejszego artykułu będzie kilka rodzajów modyfikacji lipoprotein, przede wszystkim takich, którym przypisuje się powiązanie ze stanami patologicznymi u ludzi. Dotyczy to głównie lipoprotein niskiej gęstości (LDL), które bardzo łatwo ulegają modyfikacjom. Nieco mniej jest informacji na temat innych grup lipoprotein: bardzo niskiej gęstości (VLDL) i wysokiej gęstości (HDL).

VLDL są głównym transporterem trójglicerydów (trójacylogliceroli) a LDL — cholesterolu. VLDL są syntetyzowane w wątrobie. W krwiobiegu ulegają stopniowo przemianie w LDL poprzez stadium lipoprotein pośredniej gęstości (IDL). Katabolizm LDL odbywa się w komórkach. HDL odgrywają ważną rolę w transporcie cholesterolu z tkanek obwodowych do wątroby (tzw. zwrotny transport cholesterolu).

* Prof. dr hab. Instytut Psychiatrii i Neurologii Zakład Genetyki 02-957 Warszawa, al. Sobieskiego 1/9

Contents:

- I. Introduction
- II. Cellular LDL receptors
- III. Peroxidation of lipoproteins. Influence of oxidized LDL on the artery wall
- IV. Other modifications
 - IV-1. Glycation
 - IV-2. Carbamylation and other modifications
 - IV-3. Reaction with acetaldehyde (ethylation)
- V. Antibodies against modified lipoproteins
- VI. Modifications of HDL
- VII. Discussion and concluding remarks

II. Receptory komórkowe LDL

Komponentą białkową LDL jest apolipoproteina B i to właśnie białko jest rozpoznawane przez ważny receptor komórkowy, zwany receptorem LDL (poznane funkcji tego receptora przyniosło jego odkrywcom w 1985 roku nagrodę Nobla). Zawiaduje on rozpadem LDL, przy ich niedostatecznym wiązaniu dochodzi do wzrostu poziomu LDL w krwiobiegu. Ten sam receptor wiąże również apolipoproteinę E — białko wchodzące w skład innych lipoprotein. W wiązaniu lipoprotein udział biorą wolne grupy aminowe lizyny i argininy. Ich zablokowanie powoduje, że białka przestają być rozpoznawane przez receptor LDL.

Po związaniu przez receptor LDL, lipoproteiny wchodzą do wnętrza komórki gdzie ulegają rozpadowi w lizosomach. Uwolniony z nich cholesterol wywiera hamujący wpływ zarówno na syntezę cholesterolu komórkowego jak również na syntezę samego receptora. Taki mechanizm regulacyjny umożliwia utrzymanie stężenia cholesterolu komórkowego na stałym poziomie.

Receptor LDL obecny jest na powierzchni komórek wielu tkanek. Największą rolę w ogólnoustrojowym rozpadzie LDL odgrywa wątroba [1, 2].

Pod koniec lat siedemdziesiątych [3] zauważono, że komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wiążą niezmiennione LDL tylko w nieznacznym stopniu, rozpoznają natomiast zmodyfikowane chemicznie cząsteczki lipoprotein. Procesem zawiaduje receptor odmienny od wspomnianego powyżej receptora LDL. Nazwano go receptorem zmiatającym — często stosowana jest angielska nazwa *scavenger receptor*. Receptor ten odgrywa rolę ochronną w odniesieniu do wielu tkanek, ponieważ pośredniczy w usuwaniu zmienio-

nych, a więc niepotrzebnych, i być może, toksycznych lipoprotein z krwiobiegu [4]. Ostatnio wysuwa się możliwość ogólnej, ochronnej roli *scavenger* receptora dla błon komórkowych. Działanie tego receptora może być jednak niekorzystne dla ścian tętnic o czym będzie dalej mowa.

W przebiegu pobierania lipoprotein przez komórki za pośrednictwem receptora zmiatającego nie obserwuje się, w przeciwieństwie do mechanizmu wynikającego z działania receptora LDL, regulacji zapobiegającej wzrostowi stężenia cholesterolu w komórkach. Może więc dojść do nagromadzenia dużych jego ilości.

Wiadomo obecnie, że istnieją receptory zmiatające o różnej specyficzności [5]. Opisano receptor wykazujący wysokie powinowactwo do acetylowanych LDL i inny o wysokim powinowactwie do utlenionych. Geny kodujące powyższe typy receptora zostały sklonowane [6, 7]. Opisano również odmianę receptora zmiatającego specyficznego w stosunku do glikozylowanych LDL.

III. Peroksydacja lipidów

Peroksydacja lipidów prowadzi do powstania rodników o własnościach mutagennych i, według przyjętych obecnie poglądów, odgrywa ważną rolę w starzeniu się komórek oraz powstawaniu nowotworów. Lipoproteiny zmodyfikowane przez utlenienie uważane są za bardzo istotny czynnik tworzenia się zmian miażdżycowych [8].

Przebieg utleniania LDL został szczegółowo poznany w doświadczeniach *in vitro* przy zastosowaniu jako katalizatorów jonów metali ciężkich Cu^{2+} lub Fe^{3+} . Utlenianie w środowisku biologicznym przebiega analogicznie z tą jednak różnicą, że w osoczu oraz w wielu tkankach występują czynniki antyoksydacyjne, które w znacznym stopniu hamują proces utleniania. Należą do nich witamina E, witamina C, karoten, ubichinon i inne [9]. W sytuacjach, w których zwiększona jest produkcja wolnych rodników, dochodzi do wyczerpania się antyoksydantów i wtedy proces peroksydacji przestaje być hamowany.

Utlenieniu podlegają wielonienasycone kwasy tłuszczowe fosfolipidów, głównie fosfatydoloetanoloaminy. Już w pierwszym etapie utlenienia powstają bardzo silnie reaktywne rodniki i w efekcie lawinowo przebiegającej kaskady peroksydacji dochodzi ostatecznie do rozpadu łańcucha kwasu tłuszczowego i powstania pochodnych niskocząsteczkowych [10]. Są to przeważnie aldehydy, jednym z nich jest aldehyd dwumalonowy. Oznaczanie powstających produktów — reagujących z kwasem tiobarbiturowym — jest powszechnie stosowanym wskaźnikiem stopnia peroksydacji lipidów. Część powstałych związków łączy się z wolnymi grupami aminowymi lizyny i argininy a prawdopodobnie również częściowo z innymi grupami funkcyjnymi jak SH i OH cząsteczki białkowej. W wyniku intensywnego utleniania LDL apolipoproteina B ulega de-

gradacji [11, 12].

Komórki śródbłonna tętnic mając zdolność utleniania LDL. Nie zawierają one, lub zawierają bardzo niewiele, substancji chroniących przed peroksydacją lipidów. Stwierdzono, że utlenione, nawet w minimalnym stopniu, LDL powodują wytwarzanie czynnika chemotaktycznego przez komórki ściany naczyniowej. Sprzyja to wychwytywaniu monocytów i wywołuje odczyn zapalny. Aktywnym związkiem w utlenionych LDL jest zmodyfikowany fosfolipid, który działa poprzez zwiększenie stężenia cAMP w komórkach. Monocyty ulegają przemianie w makrofagi. Wiążą one za pośrednictwem receptora zmiatającego zmodyfikowane przez utlenienie LDL. Związanie LDL uruchamia w komórkach szereg dalszych mechanizmów regulacyjnych — wywołuje zwiększoną produkcję czynników wzrostu komórek przez makrofagi oraz hamowanie aktywności czynnika rozszerzającego naczynia i zwiększenie agregacji płytek [13, 14].

Utlenione LDL hamują migrację makrofagów, ponadto mają działanie cytotoksyczne w stosunku do komórek śródbłonna naczyń. Utlenienie LDL zwiększa ich immunogenność co prowadzi do produkcji przeciwciał.

Wszystkie opisane zjawiska sprzyjają rozwojowi zmian miażdżycowych. Powyżej wspomniano, że w komórkach wyposażonych w receptor zmiatający nie obserwuje się, tak jak w przypadku receptora LDL, sprzężenia zwrotnego zapobiegającego wzrostowi stężenia cholesterolu w komórkach. Pobieranie utlenionych LDL przez makrofagi powoduje zatem nagromadzenie dużych ilości cholesterolu. Z przeładowanych cholesterollem makrofagów powstawać mogą komórki piankowe a towarzyszący temu rozrost włókien tkanki łącznej prowadzi do wytworzenia się płytki miażdżycowej [15, 16].

Stwierdzono, że podfrakcja LDL zwana Lp(a), stanowiąca niezależny czynnik ryzyka miażdżycy, występująca w zmiennych stężeniach w osoczu różnych osób, zawierająca dodatkowy fragment polipeptydowy i dużo reszt glikozylowych, podlega łatwiej utlenieniu niż pozostałe LDL i jest silnie wiązana przez receptor zmiatający. Fakty te tłumaczą silnie miażdżycorodne własności Lp(a) [17, 18].

Za poparciem hipotezy o znaczeniu peroksydacji LDL w rozwoju miażdżycy przemawia stwierdzenie obecności utlenionych LDL w zmienionej miażdżycy ścian naczyniowej [19].

Wykazano że inkubacja LDL z ekstraktem otrzymanym z dymu papierosowego powoduje pojawienie się w nich dużej ilości związków reagujących z kwasem tiobarbiturowym — aldehydu dwumalonowego i innych produktów peroksydacji lipidów — oraz daleko posuniętą degradację apolipoproteiny B [20]. Wydaje się, że powyższe doświadczenie wyjaśnia, przynajmniej częściowo, dlaczego palenie papierosów sprzyja rozwojowi miażdżycy.

Wysoki poziom LDL w osoczu może wynikać ze

zwiększenia ich produkcji i/lub opóźnienia rozpadu. Niezależnie od przyczyny długie przebywanie LDL w krwioobiegu zwiększa możliwość ich modyfikacji.

Wykazano, że utlenieniu podlega również frakcja VLDL [21].

IV. Inne modyfikacje

IV-1. Glikacja

W organizmie chorych na cukrzycę, zwłaszcza w cukrzycy niewyrównanej, w której ma miejsce długotrwałe podwyższenie stężenia glukozy we krwi, dochodzi do glikacji (nieenzymatycznej glikozylacji) różnych białek (np. hemoglobiny co wykorzystuje się jako wskaźnik diagnostyczny). W przebiegu glikacji następuje połączenie lizyny z fruktozą (glukoza podlega rearanżacji).

Glikacji podlegać mogą również lipoproteiny VLDL i LDL. W badaniach nad tym czy zmodyfikowane w taki sposób lipoproteiny są bardziej czy mniej podatne na utlenienie w porównaniu z natywnymi uzyskano niejednoznaczne wyniki. Niezgodności zależą zapewne od tego, że sama glukoza jest zarówno oksydantem jak i zmiataczem wolnych rodników, i jedna lub druga jej właściwość może brać górę w zależności od różnic w warunkach przeprowadzanych doświadczeń. Różni autorzy stwierdzają natomiast zgodnie, że przy długotrwałym działaniu glukozy glikowane lipoproteiny podlegają dalszym złożonym procesom, które nazwano glikoksydacją. Prowadzą one do wytworzenia utlenionych produktów określanych jako AGE (ang. *advanced glycation end products*). W toku tych przemian powstaje karboksymetylolizyna [22-24]. Produkty te uważa się za bardzo szkodliwe dla śródbłonna naczyń — są one wiązane przez makrofagi. Jest to zgodne z faktem częstego wczesnego występowania miażdżycy u chorych na cukrzycę.

IV-2. Karbamyłacja i inne

U osób z przewlekłą niewydolnością nerek wytwarzać się mogą karbamyłowane pochodne białek. Dochodzi w tym wypadku do kondensacji powstałego z mocznika izocyjanianu z resztami lizyny. Stwierdzono, że karbamyłacja LDL *in vitro* dotycząca nie więcej niż 20% reszt lizyny powoduje opóźnienie usuwania LDL z krwioobiegu. Wyższy stopień karbamyłacji, przewyższający 20% reszt, lizyny przyspiesza usuwanie LDL co tłumaczyć można udziałem receptora zmiatającego. Wiązanie karbamyłowanych LDL przez receptor zmiatający mogłoby odgrywać rolę w rozwoju miażdżycy, któremu sprzyja przewlekła niewydolność nerek [25, 26].

Jednym z niedawno rozpoznanych czynników ryzyka miażdżycy jest wysoki poziom homocysteiny w osoczu. Podwyższenie stężenia homocysteiny jest w znacz-

nym stopniu uwarunkowane genetycznie, sprzyja mu również niewłaściwa dieta. Wykazano, że tiolakton homocysteiny reaguje z wolnymi grupami aminowymi LDL powodując ich agregację i zwiększone pobieranie przez makrofagi co prowadzi do tworzenia się zmian miażdżycowych [27].

LDL ulegają również modyfikacjom pod wpływem niektórych ksenobiotyków. Przykładem jest dwusiarczek węgla wytwarzany w niektórych procesach produkcyjnych, gdzie zatrudnieni robotnicy zapadają na wczesną miażdżycę. Wykazano, że dwusiarczek węgla tworzy z LDL pochodne rozpoznawane przez receptor zmiatający i zwiększa ich podatność na utlenienie [28].

IV-3. Modyfikacja acetaldehydem (etylacja)

W tkankach i płynach ustrojowych osób pijących duże ilości alkoholu stwierdzono obecność białek zmodyfikowanych acetaldehydem. Aldehyd octowy jest pierwszym produktem utlenienia alkoholu etylowego i jest bardziej od niego reaktywny chemicznie (jest również bardziej toksyczny niż etanol). U osób pijących duże ilości alkoholu stężenie acetaldehydu jest wysokie z powodu obniżonej aktywności dehydrogenazy aldehydowej w wątrobie [29]. Przypuszcza się, że modyfikacja białek acetaldehydem (etylacja) odgrywa istotną rolę w powstawaniu poalkoholowego uszkodzenia wątroby [30].

Niedawno stwierdzono, że u osób uzależnionych od alkoholu po okresie picia dużych jego ilości występują w osoczu etylowane VLDL i w trochę mniejszej ilości LDL [31]. W związku z wykryciem takich pochodnych w lipoproteinach pojawiło się pytanie, czym różni się ten rodzaj modyfikacji od innych pod względem szkodliwości dla ściany naczyniowej. W odróżnieniu bowiem od poprzednio omawianych schorzeń jak cukrzyca, niewydolność nerek lub zatrucie dwusiarczek węgla, u pijących alkohol stwierdzono w badaniach epidemiologicznych mniejszą częstość występowania zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych [32, 33]. Fakt ten nie może oczywiście zachęcać do picia alkoholu, ponieważ alkohol wywiera liczne inne szkodliwe skutki zdrowotne oraz socjalne. Analiza działania alkoholu na metabolizm lipoprotein i na ścianę naczyniową może natomiast przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu rozwoju miażdżycy i czynników ją hamujących.

V. Przeciwciała przeciw zmodyfikowanym lipoproteinom

Zwiększona immunogenność zmodyfikowanych lipoprotein w porównaniu z natywnymi i powstawanie przeciwciał antylipoproteinowych uważane są za czynnik pogarszający skutki modyfikacji z punktu widzenia wpływu na tkanki.

W miażdżycowo zmienionych tętnicach wykazano obecność IgG, rozpoznających zarówno niezmienio-

nych jak również utlenionych LDL [34]. Stwierdzono [35], że podwyższony poziom przeciwciał przeciw utlenionym LDL występuje w osoczu u osób we wczesnym, dynamicznym okresie miażdżycy, mniejszą ich ilość obserwowano w zaawansowanym stadium choroby. Tak więc wysoki poziom przeciwciał świadczyłby o dynamice procesu chorobowego co mogłoby mieć znaczenie prognostyczne zarówno w przypadku zmian miażdżycowych jak i w wypadku uszkodzenia wątroby (np. pod wpływem modyfikacji acetaldehydem).

Za szczególnie szkodliwe uważane jest powstawanie kompleksów lipoprotein z przeciwciałami. Takie kompleksy mogą być pobierane przy udziale innego mechanizmu niż opisane powyżej usuwanie zmodyfikowanych lipoprotein. W usuwaniu kompleksów z przeciwciałami biorą udział receptory Fc występujące w różnych komórkach m.in. w makrofagach [36].

Utlenienie LDL sprzyja ich agregacji. Powstałe agregaty mogą być również usuwane za pośrednictwem receptora Fc komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego [37]. Proces ten jest bardzo szybki i powstaje pytanie czy przy dużym jego nasileniu utlenienie LDL nie może w efekcie końcowym prowadzić do spadku ich poziomu w osoczu.

VI. Modyfikacje HDL

HDL (lipoproteiny wysokiej gęstości) nie podlegają modyfikacjom tak łatwo jak LDL i VLDL. Być może, podatność na modyfikacje zależy od charakterystycznego układu aminokwasów w apolipoproteinie B wchodzącej w skład VLDL i LDL — białko to zawiera w łańcuchu peptydowym fragmenty złożone z powtarzających się reszt argininy i lizyny [38].

HDL podlegają utlenieniu *in vitro*, doprowadza ono do zmian konformacji apolipoproteiny AI — głównego białka HDL [39] oraz degradacji ich składników lipidowych, ale towarzyszy temu mniejszy wzrost stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym niż to ma miejsce w trakcie utleniania LDL [40]. Produkty utleniania LDL mogą natomiast modyfikować HDL i upośledzać ich funkcjonowanie jako czynników transportujących cholesterol z tkanek obwodowych do wątroby [41].

Z drugiej strony niezmiernie ważną cechą HDL jest ich zdolność hamowania procesu utleniania LDL [42, 43]. HDL stanowią tzw. „czynnik antyryzyka” z punktu widzenia rozwoju miażdżycy. Obserwacja o ich działaniu antyoksydacyjnym wnosi więc nowy ważny element do zrozumienia mechanizmu ochronnego działania tej frakcji lipoproteinowej.

VII. Dyskusja i uwagi końcowe

W dyskusji nad biologicznymi skutkami powstawania różnych pochodnych LDL istotne wydają się następujące zagadnienia:

Zauważono, że metaboliczne losy w różny sposób zmodyfikowanych LDL nie są jednakowe. I tak — utlenione LDL po pobraniu przez makrofagi są znacznie wolniej degradowane przez proteazy lizosomalne niż np. acetylowane. Przyczyną może być hamowanie tych enzymów przez utlenione LDL [37, 44]. Powolna degradacja LDL w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego powodować może większą ich szkodliwość dla tętnic. Nie zbadano jak szybko degradowane są lipoproteiny modyfikowane w inny sposób.

Nie wszystkie modyfikacje zachodzące *in vitro* zwiększają podatność na utlenienie tak jak to ma miejsce m.in. w cukrzycy. Zmodyfikowanie wolnych grup aminowych białka może nawet zmniejszać podatność całej cząsteczki lipoproteiny na peroksydację lipidów [45].

Wydaje się, że lokalizacja tkankowa czynników działających modyfikująco na lipoproteiny może mieć istotny wpływ na skutki modyfikacji. Jeżeli utlenianie LDL zachodzi w ścianie naczyniowej to szkodliwy wpływ jaki wywierają zmodyfikowane lipoproteiny dotyczy przede wszystkim tej właśnie tkanki. Reakcja pod wpływem acetaldehydu prowadząca do etylacji lipoprotein odbywa się najprawdopodobniej w wątrobie, ponieważ tam właśnie powstaje acetaldehyd, który może reagować z syntetyzowanymi w wątrobie lipoproteinami klasy VLDL. Jest zatem bardzo prawdopodobne, że w przypadku modyfikacji acetaldehydem skutki ponosi przede wszystkim tkanka wątrobowa, ściana naczyniowa natomiast jest w mniejszym stopniu narażona na szkodę.

Na podstawie posiadanych obecnie danych wydaje się, że ostateczny wpływ zmodyfikowanych lipoprotein na różne tkanki m.in. na ścianę naczyniową stanowi wypadkową czasem przeciwstawnie działających czynników takich jak: zmniejszona reakcja z receptorem LDL co wpływa na opóźnienie ich usuwania z krwioobiegu; pobieranie zmodyfikowanych LDL przez receptor zmiatający i gromadzenie cholesterolu w komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego; wytwarzanie przeciwciał przeciw zmodyfikowanym LDL, tj. powstawanie kompleksów antygeny z przeciwciałem i szybkie usuwanie ich za pośrednictwem receptora Fc; wpływ HDL oraz inne czynniki.

Artykuł otrzymano 25 października 1994 r.
Zaakceptowano do druku 8 czerwca 1995 r.

Piśmiennictwo

1. Brown MS, Goldstein JL (1986) *Science* **232**: 34-47
2. Weisgraber KH, Innerarity TL, Mahley RW (1978) *J Biol Chem* **253**: 9053-9062
3. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS (1979) *Proc Nat Acad Sci USA* **76**: 333-337
4. Brown MS, Goldstein JL (1990) *Nature (Lond)* **343**: 508-509
5. Arai H, Kita T, Yokode M, Narumiya S, Kawai C (1989) *Biochem Biophys Res Comm* **159**: 1375-1382

6. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M (1990) *Nature* (Lond) **343**: 531-535
7. Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M (1990) *Nature* (Lond) **343**: 570-572
8. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7915-7922
9. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G (1992) *Free Rad Biol Med* **13**: 341-390
10. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Weeg G, Striegl G, Jurgens G (1990) *Chemical Res Toxicol* **3**: 77-92
11. Steinbrecher UP (1987) *J Biol Chem* **262**: 3603-3608
12. Lecomte E, Artur Y, Chancerelle Y, Herbeth B, Galteau MM, Jeandel C, Siest G (1993) *Clin Chim Acta* **218**: 39-46
13. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Eterson M, Fogelman AM (1990) *J Clin Invest* **85**: 1260-1266
14. Berliner JA, Navab M, Parhami F, Liao F, Andalibi A, Imes S, Cushing SD, Kim J, Watson AD, Territo MC, Fogelman AM (1994) Xth Int Symp Atheroscl Montreal Abstracts p. 84
15. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) *New Engl J Med* **320**: 915-924
16. Luc G, Fruchart JC (1991) *Am J Clin Nutr* **53**: 206S-209S
17. Naruszewicz M, Selinger E, Davignon J (1992) *Metabolism* **41**: 1215-1224
18. Naruszewicz M, Giroux LM, Davignon J (1994) *Chem Phys Lipids* **67/68**: 167-174
19. Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Gurtner GC, Socher SS, Butler RW, Parthasarathy S, Carew TE, Steinberg D (1989) *Proc Nat Acad Sci USA* **86**: 1372-1376
20. Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M (1988) *Proc Nat Acad Sci USA* **85**: 2344-2348
21. Jurgens G, Ashy A, Esterbauer H (1990) *Biochem J* **265**: 605-608.
22. Klein RL, Lyons TJ, Lopes-Virella MF (1989) *Metabolism* **38**: 1108-1114
23. Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR, Wiley K (1992) *Biochem Pharmacol* **43**: 995-1000
24. Lyons TJ (1992) *Diabetes* **41** Suppl 2: 67-73
25. Gempel K E, Gerbitz K DC, Olgemoller B, Schleicher ED (1993) *Horm Metab Res* **25**: 250-252
26. Horkko S, Savolainen MJ, Kervinen K, Kesaniemi A (1992) *Kidney International* **41**: 1175-1181
27. McCully KS (1993) *Ann Clin Lab Sci* **23**: 477-493
28. Laurman W, Nofer JR (1994) 2nd Scient Meet Pol Soc Ather Res Międzyzdroje, Poland Abstr p 105
29. Di Padova C, Worner TM, Lieber CS (1987) *Alcoholism Clin Exp Res* **11**: 559-561
30. Behrens UJ, Hoerner M, Lasker JM, Lieber CS (1988) *Biochem Biophys Res Comm* **154**: 584-590
31. Wehr H, Rodo M, Lieber CS, Baraona E (1993) *J Lip Res* **34**: 1237-1244
32. Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, Stampfer MJ (1991) *Lancet* **338**: 464-468
33. Klatsky AL (1994) *Alcoholism Clin Exp Res* **18**: 88-96
34. Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL (1994) *Arterioscl Thromb* **14**: 32-40
35. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, Salonen R, Nyyssonen K, Palinski W, Witztum JL (1992) *Lancet* **339**: 884-887
36. Stanton LW, White RT, Bryant CM, Protter AA, Endemann G (1992) *J Biol Chem* **267**: 22446-22451
37. Hoff HE, O'Neill J, Hoppe G (1994) Xth Int Symp Atheroscl Montreal Abstracts p. 174
38. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) (1989) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw Hill str 1139-1164
39. Marcel YL, Jewer D, Leblond L, Weech PK, Milne RW (1989) *J Biol Chem* **264**: 19942-19950
40. Bradamante S, Barengi L, Giudici GA, Vergani C (1992) *Free Radic Biol Med* **12**: 193-203
41. McCall MR, Tang JY, Bielicki JK, Forte TM (1994) Symp Modif Lipopr Whistler Abstr14B
42. Ohta T, Takata K, Horiuchi S, Morino Y, Matsuda I (1989) *FEBS Lett* **57**: 435-438
43. Parthasarathy S, Barnett J, Fong L (1990) *Biochim Biophys Acta* **1044**: 275-283
44. Loughhead M, Zhang H, Steinbrecher UP (1991) *J Biol Chem* **266**: 14519-14525
45. Wehr H, Rodo M, Bednarska-Makaruk M, Majewska M, Stajniak A (1993) Free Rad in Biol and Med Pol-Austrian Bil Interse Meet Zwierzyniec, Poland str 45

Doroczna konferencja kierowników Katedr Biochemii Wydziałów Lekarskich w Polsce 1995

Doroczne konferencje, poświęcone problemom nauczania biochemii studentów medycyny, odbywają się od 12 lat, każdego roku organizowane są przez Katedrę Biochemii w innym ośrodku akademickim. Pozwala to Kierownikom jednostek, prowadzących dydaktykę biochemii na Wydziałach Lekarskich, poznać warunki w poszczególnych uczelniach, wymienić doświadczenia zarówno dydaktyczne jak i inne, a także — niekiedy — podjąć wspólne działania zmierzające do ulepszenia i nowocześniejszego nauczania biochemii w Polsce.

W bieżącym roku po raz drugi, po dwunastu latach, Gdańskowi przypadło zorganizowanie Konferencji. Zbiegło się to z jubileuszowym rokiem 50-u lat istnienia polskiej uczelni medycznej w Gdańsku, co znalazło wyraz w programie (Ryc. 1). Konferencja rozpoczęła się od spotkania w Zakładzie Biochemii AMG po południu w piątek 26 maja, co było okazją do obejrzenia Zakładu, poznania jego warunków lokalowych, nowych nabytków wyposażenia, a także do rozmów z pracownikami Katedry Biochemii AMG na temat aktualnie prowadzonych prac badawczych. Uczestnicy Konferencji zostali obdarowani nie tylko powielonymi materiałami dydaktycznymi Katedry Biochemii AMG (szczegółowe plany zajęć, programy nauczania biochemii studentów medycyny, stomatologii i farmacji, prospekt nowego wydania podręcznika *Biochemia — Zajęcia Praktyczne dla Studentów Medycyny, Stomatologii i Farmacji*), ale także materiałami informacyjnymi dostarczonymi przez firmy sponsorujące Konferencję. Głównym sponsorem była firma Merck, wsparcia finansowego udzieliły również firmy Cheminst, Prospecta i Kucharczyk.



AKADEMIA MEDYCZNA 50 LAT W GDAŃSKU

Program dorocznej Konferencji
Kierowników Katedr Biochemii Wydziałów Lekarskich

26.V.1995.

do godz. 15⁰⁰ oczekujemy gości w Zakładzie Biochemii
AMG, ul. Dębinki 1 w Gdańsku, IV piętro, pokój 410.

godz. 15⁰⁰ Prezentacje Sponsorów

(Firmy: Merck, Cheminst, Prospecta)

godz. 17⁰⁰ Wyjazd autokarem do Sulęczyzna,
zakwaterowanie w "Leśnym Dworze"

godz. 19⁰⁰ Kolacja.

27.V.1995.

godz. 9⁰⁰ Śniadanie

godz. 10⁰⁰ Konferencja Dydaktyczna

1. Nauczanie biochemii na Wydziale
Lekarskim w Gdańsku (Mariusz M. Zydowo)

2. Dyskusja

3. Projekty zintegrowanych egzaminów
(Janusz Greger)

4. Dyskusja

godz. 13³⁰ Obiad

godz. 15⁰⁰ Wznowienie obrad

1. Prezentacje sponsorów

(Firmy: Merck, oraz Cheminst)

2. Ogólna dyskusja o treściach i metodach
nauczania biochemii, wymiana doświadczeń

godz. 18⁰⁰ Kolacja

godz. 19³⁰ Ognisko nad jeziorem.

28.V.1995.

godz. 9⁰⁰ Śniadanie

godz. 10⁰⁰ Wyjazd autokarem do Gdańska, po drodze
kawa nad Jeziorem Gowidlińskim.

SERDECZNIE ZAPRASZAMY



GDAŃSK 997-1997*

Ryc. 1

uczelnia jest nader różnorodna. Organizator przyszłorocznej Konferencji przeprowadzi rozeznanie tej różnorodności i ponownie dokona próby zaproszenia biochemików klinicznych do wspólnej dyskusji. Organizatorem następnej Konferencji, w maju 1996 roku będzie prof. Roman Tarnawski z Wydziału Lekarskiego w Zabrze Śląskiej Akademii Medycznej.

Dyskusję w Sulęczyźnie kontynuowano w czasie wieczornego ogniska nad jeziorem, czemu sprzyjała konsumpcja znakomicie upieczonego kaszubskiego dzika oraz piękna wiosenna pogoda. W Konferencji wzięli udział wszyscy (z wyjątkiem dwóch) Kierownicy Katedr Biochemii Wydziałów Lekarskich w Polsce, a także Prezes Zarządu Głównego PTBioch profesor Liliana Konarska i Przewodnicząca Sekcji Dydaktyki PTBioch profesor Zofia Poremska. Tak się złożyło, że w 1995 roku następuje „wymiana pokoleń” wśród kierowniczej kadry biochemicznej w 4 uczelniach medycznych w Polsce (Gdańsk, Lublin, Poznań i Szczecin). Uczestnikami Konferencji w Sulęczyźnie byli zarówno odchodzący na emeryturę koledzy z tych ośrodków jak i potencjalni ich następcy. Uczestnicy postanowili że zostanie założona kronika i spisana historia dotychczasowych Konferencji Kierowników Katedr Biochemii na Wydziałach Lekarskich. Roli kronikarza podjęła się prof. Janina Kwiatkowska-Korczak z Wrocławia.

Zasadnicza część Konferencji odbyła się nazajutrz, w sobotę 27 maja 1995, w ośrodku Leśny Dwór w Sulęczyźnie, w sercu Szwajcarii Kaszubskiej. Zgodnie z programem i tradycją, organizator Konferencji prof. Mariusz Zydowo, przedstawił program nauczania biochemii na Wydziale Lekarskim w Gdańsku oraz sposoby realizacji tego programu. Było to wprowadzenie do ogólnej dyskusji, w której porównywano sposoby nauczania, trudności i sukcesy dydaktyczne w dziedzinie biochemii, występujące w poszczególnych uczelniach medycznych w Polsce. Prezentacja prof. Janusza Gregera z Łodzi na temat centralnie projektowanych zintegrowanych egzaminów w trakcie i po studiach medycznych były okazją do dyskusji na temat egzaminowania, sposobów i efektywności egzekwowania nabytych umiejętności biochemicznych od studentów medycyny. Szczególną troskę uczestników Konferencji, podobnie jak i w czasie poprzednich spotkań, budzą niedostatki molekularnego podejścia w dalszym, także klinicznym kształceniu medyków w Polsce. Podkreślano celowość uczestniczenia w Dorocznych Konferencjach także kierowników zespołów dydaktycznych Biochemii Klinicznej. Organizacja nauczania tego przedmiotu na Wydziałach Lekarskich polskich



Ryc. 2

Załączona zbiorowa fotografia (Ryc. 2), wykonana w drodze powrotnej do Gdańska, w Amalce nad Jeziorem Gowidlińskim zdaje się świadczyć o tym, że Konferencja była przedsięwzięciem nie tylko pożytecznym, ale że atmosfera jej przebiegu była nader swobodna a uczestnicy mogli cieszyć się słoneczną pogodą oraz pięknem Ziemi Kaszubskiej.

Prof. Dr Mariusz M. Żydowo

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1995 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) 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:
580 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
280 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

**Prenumerując
„Postępy
Biochemii”
wspierasz
swoje
czasopismo!**

***Kwartalnik „Postępy Biochemii”
wydawany z pomocą finansową
Komitetu Badań Naukowych***



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł
słownie

 wpłacający

 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
 37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę
 Zł.

.....
 podpis przyjmującego

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł
słownie

 wpłacający

 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
 37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę
 Zł.

.....
 podpis przyjmującego

Odcinek dla poczty lub banku

zł
słownie

 wpłacający

 imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
 02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3
 P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
 37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę
 Zł.

.....
 podpis przyjmującego

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 wprowadzenia 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 wskazań szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, czcionką wielkości standardowej, 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.

PIŚMIENICTWO: 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: Florkin 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 redakcja. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, ryciny, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „górną-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 przesać na adres:

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

