

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

PL ISSN
0032-5422

Advances in Biochemistry

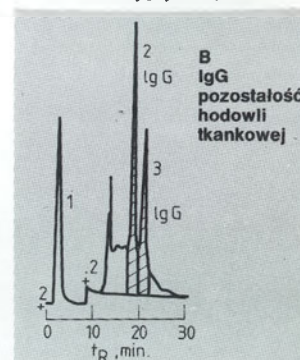
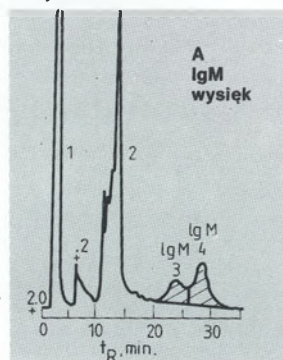
TOM 39, NR 1, 1993

Nobel 1992	2
Ubikwityna: struktura i funkcja	8
Degradacja cyklin w regulacji cyklu	16
Mukowiscydoza — rola białka CFTR	25
Metabolizm glutationu	32
Analogi witamin D	39
Fotoanalogi witamin D	46
Spektryna	50
Fitochelatyny	60
Sprawozdania i komunikaty	67

BAKERBOND ABx oczyszcza wszystkie przeciwciała z każdej matrycy



Oczyszczanie IgG i IgM z podwójnie produkującym hybridoma



Warunki analizy

Kolumna: BAKERBOND ABx
4,6 x 250 mm, 5 μ m
Faza ruchoma: A = 10 mM MES, pH 6,0
B = 250 mM KH_2PO_4 , pH 6,8
Gradient: 0% B 10 min.
Przepływ fazy: 1 ml/min.
Ciśnienie: 68 bar
Detekcja: UV przy 280 nm; AUFS patrz +
Piki: 1. albuminy, transferyna
2. IgG
3. IgM
Próba: Płyn z hodowli tkankowej 0,5 ml
Czystość IgM: 2. > 95%
3. > 95%

Warunki analizy

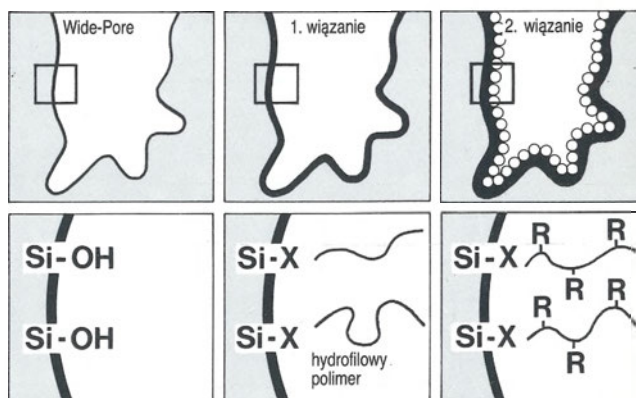
Kolumna: BAKERBOND ABx
4,6 x 250 mm, 5 μ m
Faza ruchoma: A = 10 mM KH_2PO_4 , pH 6,0
B = 500 mM KH_2PO_4 , pH 6,8
Gradient: 0% B do 50% B w 1 h
Przepływ fazy: 1 ml/min.
Ciśnienie: 68 bar
Detekcja: UV przy 280 nm; AUFS patrz +
Piki: 1. albuminy, transferyna
2. białka słabo związane
3. IgM - 4. IgM
Próba: Płyn wysiękowy myszy 0,5 ml
Czystość IgM: 3. > 95%
4. > 95%

+ Pik 1 zawiera 90-95% niezatrzymanych na kolumnie białek należących do klasy IgG. Czulość detektora dla wszystkich pozostałych pików została zwiększona 10 razy w celu uwidocznienia białek zatrzymanych na kolumnie oraz przeciwciał monoklonalnych.

Faza BAKERBOND ABx zawiera mieszane jonowymienne grupy funkcyjne wbudowane do żelu krzemionkowego (5 μ m, 15 μ m, 40 μ m), dzięki czemu ma ona szczególną właściwość wiązania różnych klas, podklas, fragmentów i koniugatów wszystkich Ig zawartych w płynach biologicznych. Równocześnie transferyna, albuminy i inne białka nie są wiązane podobnie jak czwien fenolowa. Odczyszczenie określone wagowo oraz na podstawie aktywności biologicznej białek wynosi powyżej 95%. ABx ma pojemność 150 mg/g. Trwałość kolumn przekracza 1000 godzin użytkowania.

Można otrzymać bezpłatną broszurę: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. (042) 813140, 844614, fax (042) 844609

Oczyszczanie białek bez rozpuszczalników do HPLC.



Przy użyciu faz BAKERBOND Wide-Pore.

Dla białek o punkcie izoelektrycznym (p.i.) pomiędzy 6 i 12 właściwym adsorbentem jest faza karboksylowa (WCX). Fazę PEI (WAX) wybiera się wówczas gdy p.i. białek leży pomiędzy 7 i 3. Uniwersalnym sorbentem dla białek jest faza Hi-Propyl. Wszystkie klasy przeciwciał, ich fragmenty i koniugaty oczyszcza z wysoką powtarzalnością faza BAKERBOND ABx. Do wszystkich faz stosuje się jedynie słabe roztwory soli. Można zapomnieć o kłopotach związanych z odczynnikami do HPLC. Dostępny jest nr wzorcowego rejestru FDA oraz bezpłatna broszura.

Dalsze informacje: EUROCOLOR Chemikalia Laboratoryjne skr. poczt. 46, 90-980 Łódź-7, tel. (042) 813140, 844614

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

WYDAWCA

Editor
POLSKIE TOWARZYSTWO
BIOCHEMICZNE
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 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. 200-381 w. 488
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 10-50-71 w 155

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
ANDRZEJ GINDZIENSKI
(Białystok)
BARBARA GRZELAKOWSKA-
-SZTABERT
(Warszawa)
LESZEK KACZMAREK
(Warszawa)
LILLA LACHOWICZ
(Łódź)
EWA LENARTOWICZ
(Warszawa)
ROMAN LORENC
(Warszawa)
SŁAWOMIR PIKUŁA
(Warszawa)
ANNA SZAKIEL
(Warszawa)
ZOFIA ZIELIŃSKA
(Warszawa)

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

Od kinazy fosforylazy... do tysięcy i jednej białkowej kinazy? From phosphorylase kinase... to a thousand and one protein kinases? TERESA JAKUBOWICZ, EUGENIUSZ GAŚSIOR	2
Struktura i funkcja ubikwityny Structure and function of ubiquitin URSZULA PIOTROWSKA	8
Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego Cyclin degradation as indispensable regulatory element of the cell cycle BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT	16
Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR — biochemiczna analiza mukowiscydozy Normal and disturbed function of CFTR chloride channel — biochemical analysis of cystic fibrosis TOMASZ TYRAKOWSKI	25
Metabolizm glutationu Glutathione metabolism GRZEGORZ BARTOSZ	32
Analogi witamin D o działaniu antyproliferacyjnym Vitamin D analogues of antiproliferative activity ANDRZEJ KUTNER	39
Analogi witamin D do fotoznakowania białka transportującego i receptora hormonu witaminowego Photoactivable analogues of vitamin D for labeling of serum binding protein and vitamin D receptor ANDRZEJ KUTNER	46
Spektryny erytrocytarna i nieerytrocytarna — struktura i funkcje Erythroid and nonerythroid spectrins — structure and functions ALEKSANDER F. SIKORSKI, KATARZYNA BIAŁKOWSKA, BRYGIDA BISIPIRSKA, JAN SZOPA	50
Fitochelaty — roślinne peptydy wiążące metale ciężkie Phytochelatin — the heavy metal-binding peptides of plants ANNA TUKENDORF	60

Od kinazy fosforylasy ... do tysiąc i jednej białkowej kinazy?

From phosphorylase kinase ... to a thousand and one protein kinases?

TERESA JAKUBOWICZ¹,
EUGENIUSZ GAŚSIOR²

Spis treści:

- I. Odkrycie odwracalnej fosforylacji białek
- II. Klasyfikacja kinaz białkowych
- III. Znaczenie kinaz białkowych w transmisji sygnałów zewnątrzkomórkowych
- IV. Charakterystyka fosfataz białkowych
 - IV-1. Fosfatazy białkowe serynowo/treoninowe
 - IV-2. Fosfatazy białkowe tyrozynowe
 - IV-3. Fosfatazy białkowe o podwójnej specyficzności substratowej
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Discovery of reversible protein phosphorylation
- II. Classification of protein kinases
- III. Importance of protein kinases in extracellular signal transmission
- IV. Characterization of protein phosphatases
 - IV-1. Protein serine/threonine phosphatases
 - IV-2. Protein tyrosine phosphatases
 - IV-3. Bifunctional protein phosphatases
- V. Final remarks

I. Odkrycie odwracalnej fosforylacji białek

Laureatami nagrody Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w 1992 r. zostali dwaj amerykańscy biochemicy: Edwin Krebs i Edmond Fischer z Uniwersytetu Waszyngtona w Seattle.

Obydwaj uczeni rozpoczęli wspólne badania na początku lat pięćdziesiątych w laboratorium Carla i Gerti Corich. Podjęta przez nich problematyka badawcza dotyczyła regulacji aktywności fosforylasy

glikogenu, kluczowego enzymu zaangażowanego w metabolizmie glikogenu. Rezultatem ich pionierskich prac było odkrycie, że odwracalna fosforylacja katalizowana z jednej strony przez kinazę fosfobiałkową i odwracana przez fosfatazę leży u podstaw konwersji nieaktywnej formy fosforylasy (fosforylaza b) w jej formę aktywną czyli fosforylazę a [1, 2, 3]. W 1959 r. Fischer i Krebs wykazali, że w konwersji tej uczestniczy kinaza fosforylasy, enzym który przeszedł do historii biochemii jako pierwszy oczyszczony preparat kinazy [4]. Aktywność kinazy fosforylasy jest również regulowana przez fosforylację. W modyfikacji tej zaangażowana jest kinaza zależna od cAMP (kinaza A), enzym który został po raz pierwszy wyizolowany i scharakteryzowany w 1968 r. również przez Krebsa i wsp. [5]. Aktywność kinazy A i cały proces metabolizmu glikogenu podlega w komórkach ssaków regulacji hormonalnej. Tak więc w odpowiedzi na działanie hormonu np. adrenaliny zachodzi aktywacja cykazy adenylanowej, która katalizuje konwersję ATP w formę cAMP. Działając jako wtórny przekaźnik, cAMP stymuluje aktywność kinazy A, która z kolei fosforyluje kinazę fosforylasy (aktywacja enzymu) i syntazę glikogenu (hamowanie aktywności enzymu). Aktywna kinaza fosforylasy katalizuje fosforylacyjną modyfikację fosforylasy glikogenu, co powoduje zwiększenie jej aktywności. Jednocześnie przez zahamowanie aktywności syntazy glikogenu równowaga jest przesunięta w stronę szybkiej degradacji glikogenu. Warto tutaj zwrócić uwagę na pewną prawidłowość, a mianowicie, że przez fosforylację zależną od cAMP aktywowane są enzymy katalizujące procesy kataboliczne, a hamowane enzymy procesów anabolicznych. Pełniejszą analizę regulacji aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie glikogenu znaleźć można w artykule Famulskiego i Kuźnickiego [6].

¹ doc. dr hab., ² prof. dr hab. Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, Akademicka 19, 20-033 Lublin.

II. Klasyfikacja kinaz białkowych

Pierwsze prace Fischera i Krebsa nad fosforylacją szybko znalazły kontynuatorów. Badania prowadzone były zarówno w kierunku poszukiwania nowych procesów regulowanych przez fosforylację jak i enzymów uczestniczących w tej modyfikacji. Okazało się, że spośród ponad 100 różnego typu modyfikacji białek fosforylacja jest najbardziej rozpowszechniona [7].

Rosnąca ilość identyfikowanych kinaz białkowych zrodziła potrzebę ujednocnionej klasyfikacji tych enzymów. Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej, klasyfikację przeprowadza się na podstawie rodzaju aminokwasu — akceptora reszt fosforanowych. Wyróżnia się następujące grupy tych enzymów:

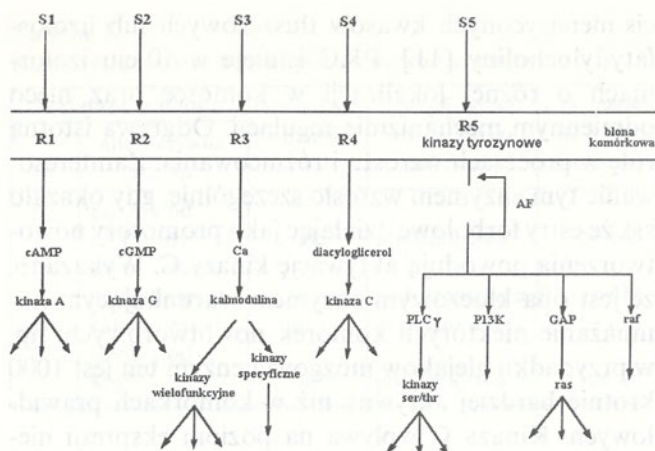
1. Fosfotransferazy przenoszące reszty fosforanowe na serynę lub treoninę — kinazy białkowe serynowo/treoninowe E.C.2.7.10.
2. Fosfotransferazy przenoszące reszty fosforanowe na tyrozynę — kinazy białkowe tyrozynowe E.C.2.7.11.
3. Fosfotransferazy przenoszące reszty fosforanowe na histydynę, argininę lub lizynę — kinazy białkowe histydynowe, argininowe lub lizynowe E.C.2.7.12.
4. Fosfotransferazy przenoszące grupy fosforanowe na cysteinę — kinazy białkowe cysteinowe E.C.2.7.13.
5. Fosfotransferazy przenoszące grupy fosforanowe na reszty kwasu glutaminowego czy asparaginowego — kinazy białkowe glutamylowe czy aspartylowe E.C.2.7.14.

III. Znaczenie kinaz białkowych w transmisji sygnałów zewnątrzkomórkowych

Kinazy serynowo-treoninowe i tyrozynowe zostały jak dotąd najbardziej poznane. Odgrywają one różnorodne funkcje w komórce.

Wiele z nich uczestniczy w transmisji sygnałów zewnątrzkomórkowych. Wykazano, że hormony, czynniki wzrostowe i neurotransmitery (przekazniki pierwotne) działając poprzez specyficzne receptory zlokalizowane w membranach komórkowych powodują uwolnienie wtórnych przekazników, które z kolei wpływają na aktywność kinaz fosfobiałkowych. Następnie uaktywnione kinazy w sposób bezpośredni lub działając poprzez kaskadę reakcji fosforylacji/defosforylacji wpływają na określone enzymy wywołujące fizjologiczną odpowiedź komórki. Ten kaskadowy system prowadzi do modulacji, jak również do zwielokrotnienia pierwotnego sygnału zewnątrzkomórkowego i w konsekwencji do regulacji wielu procesów fizjologicznych w komórce.

Poznano dotychczas pięć podstawowych systemów przekazywania sygnałów, które funkcjonują w komórkach eukariotycznych [8] (Rys. 1). Wtórny przekaznik jakim jest wspomniany wcześniej cAMP, wywiera



Ryc. 1. Podstawowe systemy przekazywania sygnałów zewnątrzkomórkowych.

- S — przekaznik pierwotny (sygnał)
- R — receptor
- PLC γ — fosfolipaza C γ
- PI3K — fosfatydyloinozytolo 3-kinaza
- GAP — białka aktywujące GTP-azy
- AF — autofosforylacja

efekt poprzez aktywację kinazy A w odpowiedzi na działanie takich hormonów jak np. epinefryna, glukagon, wazopresyna i inne. Kinaza A uczestniczy w skoordynowanej regulacji aktywności enzymów zaangażowanych w przemianach węglowodanów, tłuszczów, kontroli biosyntezy białka, w regulacji ekspresji genów poprzez modulację czynnika transkrypcyjnego CREB i innych.

W dwa lata po odkryciu kinazy A w pracowni K u o i G r e e n g a r d a wykryto kinazę zależną od innego cyklicznego nukleotydu, a mianowicie cGMP [9]. W odróżnieniu od kinazy A, która fosforyluje wiele substratów w komórce, kinaza G posiada funkcję bardziej ograniczoną. Wiąże się to z lokalizacją enzymu w organizmie. Występuje głównie w mięśniach gładkich oraz w mózdku. Wiele dowodów wskazuje, że enzym ten uczestniczy w relaksacji mięśni gładkich, w hamowaniu agregacji płytek krwi, w regulacji procesów widzenia.

Badania lat siedemdziesiątych przyniosły informacje o jeszcze innej drodze sygnalizacji komórkowej. W systemie tym jony Ca²⁺ i kalmodulina, działając jako wtórny przekaznik, aktywują wiele enzymów w tym również kinaz fosfobiałkowych [10]. Wśród kinaz zależnych od kalmoduliny wyróżnić można enzymy wielofunkcyjne, które podobnie jak kinaza A fosforylują wiele białek w komórce oraz enzymy specyficzne w stosunku do określonych substratów. Przykładem tego ostatniego może być kinaza lekkiego łańcucha miozyny, która wpływa na inicjację skurczu mięśni gładkich czy kinaza fosforylująca elongacyjny czynnik translacji 2 [8].

Odkryta w 1977 roku przez N i s h i z u k e kinaza C (PKC) jest prototypem całej rodziny kinaz C, które wymagają do swojej aktywacji niektórych produktów metabolizmu fosfolipidów np. diacyloglicerolu,

cis-nienasyconych kwasów tłuszczowych lub lizofosfatydylocholino [11]. PKC istnieje w 10-ciu izoformach o różnej lokalizacji w komórce oraz nieco odmiennym mechanizmie regulacji. Odgrywa istotną rolę w procesach wzrostu i różnicowania. Zainteresowanie tym enzymem wzrosło szczególnie, gdy okazało się, że estry forbolowe działając jako promotory nowotworzenia powodują aktywację kinazy C. Wykazano, że jest ona kluczowym enzymem warunkującym namnażanie niektórych komórek nowotworowych: np. w przypadku glejaków mózgowia enzym ten jest 1000 krotnie bardziej aktywny niż w komórkach prawidłowych. Kinaza C wpływa na poziom ekspresji niektórych genów poprzez modulację aktywności czynnika transkrypcyjnego AP1 będącego heterodimerem produktów protoonkogenów *c-jun* i *c-fos* [12].

W 1978 r. Erikson i wsp. [13] wykazali, że produkt onkogenu *src* wirusa mięsaka Rousa (RSV) jest kinazą tyrozynową. Nieco później Hunter i Sefton [14] zaobserwowali, że w komórkach prawidłowych poziom P-tyrozyny stanowi zaledwie 0,03% całkowitego poziomu P-aminokwasów w białkach. Natomiast w komórkach nowotworowych poziom P-tyrozyny wzrasta 5-10-krotnie. Odkrycia te skoncentrowały uwagę badaczy nad udziałem kinaz tyrozynowych w transformacji nowotworowej. Obecnie wiadomo, że spośród ponad 100 zidentyfikowanych onkogenów, połowę stanowią geny kodujące kinazy tyrozynowe.

Wiele kinaz tyrozynowych pełni funkcję receptorów czynników wzrostowych [15, 16]. Do najlepiej poznanych należą: receptor insuliny, receptor czynnika wzrostowego płytek krwi PDGF, receptor naskórkowego czynnika wzrostowego EGF i wiele innych. Po przyłączeniu czynnika wzrostowego, receptorowe kinazy tyrozynowe ulegają autofosforylacji w resztach tyrozynowych. Poszczególne cząsteczki P-tyrozyny grają rolę specyficznych miejsc wiązania białek cytoplazmatycznych uczestniczących w transmisji sygnałów. Odbywa się to poprzez domenę SH2 czyli krótką sekwencję homologiczną do niekatalicznego regionu protoonkogenu *c-src* (SH ang. *src-homology*). W transmisji sygnałów przez receptorowe kinazy tyrozynowe pośredniczą takie białka jak: GAP (GTP-ase activating protein), fosfolipaza C γ , kinaza fosfatydyloinozytolu oraz serynowo/treoninowe kinazy białkowe np. rodzina kinaz Raf1, kinazy aktywowane przez mitogeny (MAP) czy kinaza C. W działaniu receptorowych kinaz tyrozynowych centralną rolę odgrywa również produkt onkogenu *c-ras*, wielofunkcyjne białko wiążące GTP. Wymienione czynniki pośrednie przekazują sygnały do jądra komórkowego, w którym poprzez modyfikacyjne zmiany czynników transkrypcyjnych wpływają na ekspresję genów i mitogenezę [15].

Warto podkreślić, że geny kodujące receptory czynników wzrostowych są potencjalnymi protoonkogenami czyli genami, w których mutacja lub zaburzenia ekspresji mogą przyczynić się do transformacji nowo-

tworowej. Dlatego też poznanie mechanizmów aktywacji tych enzymów w komórce przybliży nas do zrozumienia złożonych procesów towarzyszących onkogenezie oraz może dostarczyć nowych metod diagnozowania i leczenia schorzeń nowotworowych.

Należy podkreślić, że przedstawione tutaj, w bardzo uproszczonej formie, systemy sygnalizacji komórkowej nie działają w odosobnieniu. Obserwuje się wzajemne oddziaływanie (ang. *cross-talk*) między nimi na poziomie kinaz, fosfataz oraz ich substratów na poziomie interakcji receptor-ligand, białek G, ekspresji genów i innych. Te wzajemne oddziaływania wywołane określonym bodźcem zewnątrzkomórkowym prowadzą z kolei do bardzo złożonych synergistycznych bądź też antagonistycznych efektów w komórce. Przykładem może być niezwykle złożony system hormonalnej regulacji sekrecji insuliny w komórkach beta wysepek Langerhansa trzustki [17].

W ostatnich kilku latach najwięcej uwagi poświęcono serynowo/treoninowej kinazie *cdc2*, która gra kluczową rolę w regulacji cyklu mitotycznego komórek eukariotycznych. Aktywność tego enzymu zmienia się w sposób drastyczny w cyklu komórkowym i jest najwyższa na granicy faz G₂/M tuż przed rozpoczęciem mitozy. Regulacja aktywności tej kinazy odbywa się na poziomie tworzenia wysokocząsteczkowych kompleksów z cyklinami, jak również poprzez zmiany w poziomie fosforylacji enzymu. Wydaje się, że w fosforylacyjnej modyfikacji kinazy *cdc2* uczestniczą kinazy białkowe o tzw. podwójnej specyficzności substratowej tzn. zdolne do modyfikacji zarówno seryny/treoniny jak również tyrozyny. Produkt genu *wee1* *S.pombe*, który jest negatywnym regulatorem aktywności kinazy *cdc2* cechuje właśnie tego rodzaju podwójna specyficzność substratowa. Jak dotąd poznano ponad 10 enzymów tego typu [18-22].

Analiza struktury pierwszorzędowej białek — kinaz wykazała, że pomimo ogromnej różnorodności, wszystkie poznane dotąd kinazy eukariotyczne posiadają regiony o bardzo wysokim stopniu homologii. Regiony te, złożone z sekwencji około 270 aminokwasów stanowią centrum katalityczne kinaz fosfobiałkowych. Szczególnie zachowany element stanowi sekwencja GxGxxG tzw. motyw Rossmana, która jest miejscem wiązania ATP. W regionie domeny katalitycznej można także wyróżnić krótkie sekwencje, które pozwalają na zróżnicowanie kinaz serynowo/treoninowych od tyrozynowych [23, 24].

Istnienie charakterystycznych motywów sekwencyjnych w kinazach białkowych, jak również identyfikacja wirusowych onkogenów kodujących kinazy, umożliwiły prowadzenie badań na poziomie DNA. Dzięki wprowadzeniu technik klonowania i sekwencjonowania DNA, liczba zidentyfikowanych kinaz zdecydowanie wzrosła. Jak dotąd opisano i scharakteryzowano ponad 200 tego typu enzymów. Można więc sądzić, że prowokujący tytuł pracy Huntera "A thousand and one protein kinases" opublikowanej w jednym z nume-

rów *Cell* w 1987 roku nie będzie już wkrótce zakoczeniem [25].

IV. Charakterystyka fosfatyz białkowych

Do niedawna badania dotyczące fosfatyz pozostawały niejako w cieniu intensywnych poszukiwań kinaz fosfobiałkowych. Wynikało to między innymi z trudności uzyskiwania dobrze zdefiniowanych substratów do reakcji defosforylacji. W ostatnich latach zainteresowanie tą grupą enzymów wyraźnie wzrosło. Niewątpliwie wpłynęło na to odkrycie, że fosfatazy odgrywają istotną rolę w supresji nowotworów oraz w regulacji cyklu komórkowego.

IV-1. Fosfatazy białkowe serynowo/treoninowe

Enzymy należące do rodziny fosfatyz serynowo/treoninowych posiadają szeroką specyficzność substratową *in vitro*. Stosując kryteria wrażliwości na specyficzne inhibitory i aktywatory, w komórkach eukariotycznych zidentyfikowano 4 podstawowe typy fosfatyz fosfobiałkowych. Typ 1 (PP1 — ang. *protein phosphatase 1*) katalizuje specyficzną defosforylację podjednostki β kinazy fosforylasy i jest hamowany przez nanomolowe stężenia dwóch termostabilnych inhibitorów 1 i 2 [26, 27]. Typ 2 enzymów (PP2) preferencyjnie defosforyluje podjednostkę α kinazy fosforylasy i jest względnie odporny na działanie wspomnianych inhibitorów. Do fosfatyz typu 2 zaliczono 3 enzymy (PP2A, PP2B i PP2C), które można rozróżnić na podstawie wymagań kationów dwuwartościowych. Typ 2A wykazuje aktywność w nieobecności jonów metali dwuwartościowych, typ 2B (kalcineuryna) wymaga jonów Ca^{2+} , a PP2C jonów Mg^{2+} [26, 27].

Nowym testem pozwalającym na rozróżnienie omawianych enzymów jest wrażliwość na kwas okadejowy (OA ang. *okadaic acid*). Kwas okadejowy jest 38-o-węglową pochodną kwasów tłuszczowych zawierających wiele wiązań polieterowych. Po raz pierwszy wyizolowany został z gąbek morskich *Halichondria okadaei*. Jest silnym inhibitorem fosfatyz 2A (IC_{50} -0,2 nM) i PP1 (IC_{50} -50 nM). Fosfatyz 2B jest hamowana przy znacznie wyższych (10 μM) stężeniach kwasu podczas gdy PP2C jest niewrażliwa na ten inhibitor [26, 27] (Tabela 1).

Warto podkreślić, że dzięki hydrofobowej naturze OA jest przepuszczany przez membrany plazmatyczne do wnętrza komórki i hamuje aktywność fosfatyz *in vivo*. Dzięki temu jest on z powodzeniem wykorzystywany do identyfikacji fizjologicznych substratów fosforylacji oraz do poznawania nowych procesów, które są regulowane przez fosforylację [28]. W laboratorium Fischera i Krebsa [29] oraz innych [30] wykazano, że OA naśladuje stymulujący wpływ insuliny na transport glukozy do adipocytów. Towarzyszy temu wzrost aktywności wielu kinaz serynowo/treoninowych, a także wzrost fosforylacji w re-

Tabela 1.

Klasyfikacja fosfatyz białkowych serynowo-treoninowych

Fosfatyz białkowa	wrażliwość na inhibitor 1 i 2	specyficzność wobec kinazy fosforylasy	wrażliwość na kwas okadejowy
typ	alternatywna nazwa		
1	zależna od ATP i Mg^{2+}	tak	podjednostka β
2A	stymulowana polikationami	nie	podjednostka α
2B	kalcineuryna	nie	podjednostka α
2C	zależna od Mg^{2+}	nie	podjednostka α

sztach tyrozynowych. Tak więc OA może być także wykorzystywany w badaniu wzajemnych powiązań pomiędzy fosforylacją seryny/treoniny i tyrozyny w transmisji sygnałów do komórki (31). Kwas okadejowy jest silnym stymulatorem rozwoju nowotworów i, podobnie jak estry forbolowe, wpływa na wzrost fosforylacji substratów kinazy C. Jednak obserwacje te nie są jednoznaczne. Wykazano np. że 10 μM OA po dwóch dniach działania odwraca transformację komórek NIH3T3 wywołaną onkogenami *raf* i *ret-II* [31]. Oznacza to, że PP1 i PP2A mogą funkcjonować zarówno w promocji, jak i supresji wzrostu nowotworowego.

Rozszerzenie warsztatu metodycznego o techniki inżynierii genetycznej pozwoliło na uzyskanie cDNA oraz wyklonowanie podjednostek katalitycznych fosfatyz serynowo/treoninowych. Wykazano, że każda z nich istnieje w komórce przynajmniej w 2 izoformach [32]. Na podstawie porównawczej analizy sekwencyjnej wykazano, że PP1, PP2A i PP2B są strukturalnie zbliżone i należą do wspólnej rodziny genów. Natomiast typ 2C jest produktem zupełnie innej rodziny genów. Tak więc w odróżnieniu od kinaz fosfobiałkowych, które wydają się pochodzić z jednego wspólnego pragnu, fosfatazy reprezentują różne drogi filogenetycznego rozwoju [26].

IV-2. Fosfatazy białkowe tyrozynowe

W ostatnich latach wykazano istnienie wielu fosfatyz o wybiórczej specyficzności w stosunku do P-tyrozyny. Jest to różnorodna rodzina enzymów, które podobnie jak kinazy tyrozynowe mogą występować w stanie wolnym w cytoplazmie oraz związanym z membranami jako białka receptorowe [33]. Należy podkreślić, że pierwsza tego typu fosfatyz została wyizolowana w 1988 r. z łożyska ludzkiego w laboratorium Fischera i Krebsa [34]. Analiza sekwencyjna tego białka nie wykazała podobieństwa do fosfatyz serynowo/treoninowych [33]. Zaobserwowano natomiast wiele homologii do dwóch tandemowych powtórzeń występujących w wewnątrzkomórkowej domenie wspólnego antygeny CD45 leukocytów. Jeszcze w tym samym roku w laboratorium tegorocznych noblistów potwierdzono, że receptory

CD45 przejawiają aktywność fosfatazy tyrozynowej [31]. Dalsze badania tej samej grupy uczonych wykazały, że mikroiniekcja fosfatazy tyrozynowej do oocytów *Xenopus*, hamuje wpływ insuliny na dojrzewanie oocytów. Obniża również poziom stymulacji kinazy S6. Uzyskane wyniki potwierdzają jednocześnie udział fosforylacji tyrozyny w transmisji sygnałów w odpowiedzi na działanie insuliny [35, 36].

Poznane dotychczas fosfatazy tyrozynowe mają jednakowe domeny katalityczne złożone z około 230 aminokwasów. Wyróżnić w nich można charakterystyczny motyw sekwencyjny złożony z 11 aminokwasów: (I/V) HCXAGXXR (S/T) G. Stałą pozycję w tej sekwencji zajmuje cysteina, która decyduje o aktywności enzymu [33]. Jest interesujące, że receptorowe fosfatazy posiadają w większości przypadków dwie domeny katalityczne, natomiast cytoplazmatyczne tylko jedną [33].

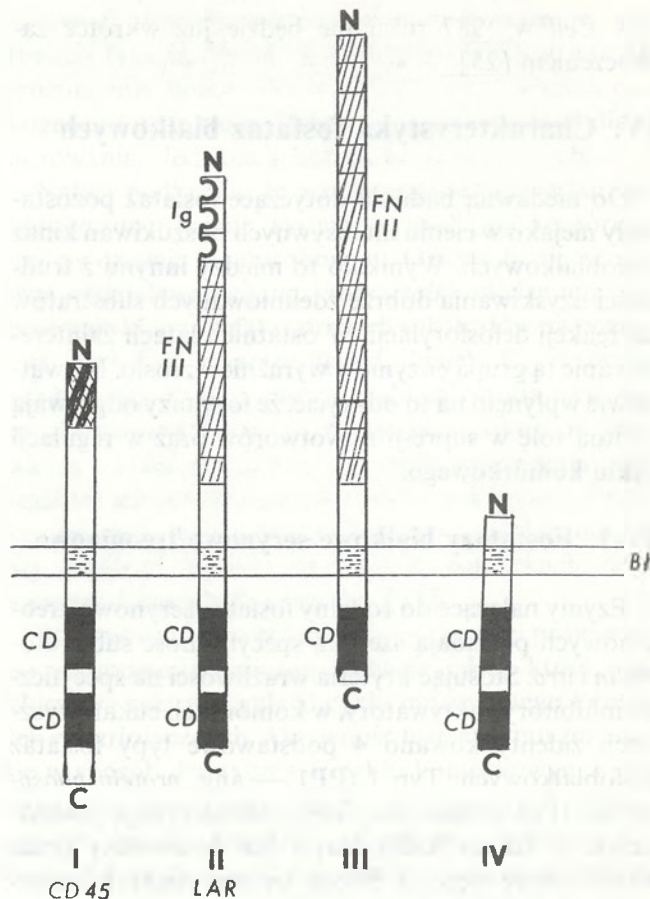
Wśród receptorowych fosfatyz tyrozynowych obserwuje się duże zróżnicowanie w domenach zewnątrzkomórkowych. Wyróżnia się 4 podstawowe typy tych enzymów: Typ I (CD45) zawiera glikozylowany fragment zewnątrzkomórkowy oraz region bogaty w cysteinę. Typ II (LAR ang. *leucocyte common antigen related*) wyróżnia się obecnością 2 lub 3 tandemowych powtórzeń fragmentów łańcucha IgG połączonych z 2-9 powtórzeniami FNIII (FN, ang. *fibronectin*). Typ III cechuje w domenie zewnątrzkomórkowej wiele powtórzeń FNIII, a typ IV charakteryzuje obecność bardzo krótkiej często glikozylowanej domeny zewnątrzkomórkowej (Ryc. 2).

Przy użyciu techniki PCR zidentyfikowano dotychczas wiele izoform poznanych dotąd fosfatyz P-tyrozynowych. Wykryto np. sześć izoform fosfatazy CD45, które powstały na drodze alternatywnego "splicingu" [33].

Obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmu działania i regulacji fosfatyz tyrozynowych. Nie wiadomo również dlaczego istnieje tak wiele izomerycznych form tego enzymu. Przypuszcza się, że obserwowana strukturalna różnorodność fosfatyz w regionach poza domeną katalityczną decyduje o specyficzności substratowej, mechanizmie regulacji i lokalizacji tych enzymów w komórce.

Należy wspomnieć, że aktywność specyficzna fosfatyz tyrozynowych jest 10-1000 razy wyższa niż kinaz tyrozynowych. To może wyjaśniać, dlaczego w komórkach prawidłowych poziom P-tyrozyny jest około 3000 krotnie niższy w porównaniu z P-seryną czy P-treoniną [14].

Z wcześniejszych obserwacji wiadomo, że w komórkach transformowanych obserwuje się 5-10-krotny wzrost fosforylacji tyrozyny [14]. Wysłunięto przypuszczenia, że obserwowane zmiany mogą być związane bądź to z rozregulowaniem ekspresji kinaz tyrozynowych, bądź to z obniżeniem poziomu ekspresji fosfatyz tyrozynowych. Wykazano np. że w komórkach fibroblastów nerkowych NRK traktowanych wanadanem,



Ryc. 2. Organizacja strukturalna czterech typów (I — IV) receptorowych fosfatyz tyrozynowych.
 CD — domena katalityczna,
 IG — „kieszanie” podobne do fragmentów łańcucha immunoglobuliny G
 FNIII — powtórzenie fragmentów łańcucha fibronektyny (typ III)
 Bł — błona komórkowa
 W końcu N fosfatazy typu I (CD45) zaznaczono region, który ulega zróżnicowanej ekspresji (33).

znany inhibitorem fosfatyz tyrozynowych, obserwuje się 40-krotny wzrost poziomu fosforylacji tyrozyny. Co więcej w tych warunkach komórki prawidłowe nabywały cech komórek transformowanych [37]. Te spostrzeżenia nasunęły przypuszczenie, że fosfatazy tyrozynowe grają w komórce rolę antyonkogenów.

IV-3. Fosfatazy białkowe o podwójnej specyficzności substratowej

Od 1986 r. wiadomo, że produkt genu *cdc25* pełni funkcję regulatora cyklu komórkowego [18]. Odgrywa on istotną rolę w aktywacji kinazy $p34^{cdc2}$ umożliwiając jednocześnie rozpoczęcie mitozy. Jednym z warunków aktywacji $p34^{cdc2}$ jest defosforylacja tyrozyny i treoniny w domenie odpowiedzialnej za wiązanie ATP. Ostatnio wykazano, że obydwie reszty fosforanowe są usuwane przez fosfatazę o podwójnej specyficzności substratowej, produktu genu *cdc25* [38, 39]. Produkt genu *cdc25*, białko o m.c. 80,000 wykazuje niewielki stopień homologii wobec innych fosfatyz białkowych. Enzym wydaje się być spokrewniony

z fosfatazą VH1 wirusa *vaccina* [38, 39]. Fosfatazą VH1 cechuje również specyficzność w stosunku do P-seryny i P-tyrozyny.

V. Uwagi końcowe

Z tego bardzo pobieżnego przeglądu jasno wynika, że odwracalna fosforylacja jest typem modyfikacji białek istotnym w regulacji niemalże wszystkich procesów fizjologicznych w komórce. Około 1/3 białek komórkowych ulega tej modyfikacji przez setki różnorodnych kinaz i fosfataz o bardziej lub mniej poznany sposób regulacji. O wielu nawet tutaj nie wspomniano, jak np. o kinazach białka S6 uczestniczących w regulacji inicjacji translacji, kinazie eIF2 kontrolującej syntezę globiny, kinazie zależnej od dsRNA indukowanej przez interferony zaliczonej ostatnio do antykonogonów [40], kinazach kazeinowych i wielu innych.

Przed prawie 40-ma laty, tegoroczni laureaci nagrody Nobla nie przypuszczali, że odkryta przez nich kinaza fosforylaza stanie się prototypem rodziny enzymów o tak krytycznym znaczeniu dla funkcjonowania komórki i otworzy tak wielkie (i wciąż aktualne) perspektywy dalszych badań teoretycznych i praktycznych.

Artykuł otrzymano 8 stycznia 1993 r.

Zaakceptowano do druku 15 stycznia 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Krebs EG, Fischer EH (1955) *J Biol Chem* **216**: 113-120
2. Fischer EH, Krebs EG (1955) *J Biol Chem* **216**: 121-132
3. Krebs EG, Fischer EH (1956) *Biochim Biophys Acta* **20**: 302-309
4. Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH (1959) *J Biol Chem* **234**: 2867-2873
5. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) *J Biol Chem* **243**: 3763-3765
6. Kuźnicki J, Famulski K (1986) *Post Biochem* **32**: 285-299

Od Redakcji:

W 1988 r. odbyła się w Lublinie, zorganizowana przez profesora Eugeniusza Gąsiora, konferencja n.t.

„Regulacyjne funkcje fosforylacji białek”

W zeszycie 35 tomu (1989) *Postępów Biochemii* opublikowali — opracowane na podstawie wykładów przedstawionych podczas konferencji — artykuły następujący autorzy:

- Eugeniusz Gąsior z Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Bożena Kamińska z Inst. Biol. Dośw. im. M. Nenckiego w Warszawie,
Grażyna Dobrowolska z Inst. Bioch. i Biof. w Warszawie,
Józef Zajęc z Akademii Medycznej w Lublinie,
Janina Kwiatkowska z Akademii Medycznej we Wrocławiu,
Jerzy Kawiak z Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Warszawie,
Barbara Baryko z Inst. Biol. Dośw. im. M. Nenckiego w Warszawie,
Jacek Kuźnicki z Inst. Biol. Dośw. im. M. Nenckiego w Warszawie,
Teresa Jakubowicz z Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Wiesław Kudlicki z Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Andrzej Jerzmanowski z Uniwersytetu Warszawskiego,
Konrad Famulski i Anna B. Wojtczak z Inst. Biol. Dośw. im. M. Nenckiego w Warszawie,
Joanna Gemel z Uniwersytetu Warszawskiego
Emilia Pałę z Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej w Lublinie,
Włodzimierz S. Ostrowski z Akademii Medycznej w Krakowie,
Grażyna Muszyńska z Inst. Bioch. i Biof. w Warszawie.

7. Krebs EG, Beavo JA (1979) *Annu Rev Biochem* **48**: 923-959
8. Cohen P (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 408-413
9. Kuo JF, Greengard P (1969) *J Biol Chem* **244**: 3417-3419
10. Pires EMV, Perry SV (1977) *Biochem J* **167**: 137-146
11. Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 414-417
12. Karin M, Smeal T (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 418-422
13. Collett MS, Erikson R.L. (1978) *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 2021-2024
14. Hunter T, Sefton BM (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 1311-1315
15. Pazin MJ, Williams LT (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 374-378
16. Golik P, Gniadkowski M (1992) *Post Biochem* **38**: 6-12
17. Holz GG, Haebler JF (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 388-393
18. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* **38**: 98-106
19. Norburg C, Blow J, Nurse P (1991) *EMBO J* **10**: 3321-3329
20. Jessup C, Beach D (1992) *Cell* **68**: 323-332
21. Kirschner M (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 281-285
22. Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T (1992) *Trends Biochem Sci* **17**: 114-119
23. Hunter T (1991) *Meth Enzymol* **200**: 3-38
24. Hanks SK, Quinn AM (1991) *Meth Enzymol* **200**: 38-62
25. Hunter T (1987) *Cell* **50**: 823-829
26. Cohen P, Cohen TW (1989) *J Biol Chem* **264**: 21435-21438
27. Cohen P (1991) *Meth Enzymol* **201**: 389-398
28. Hardie G, Haystead TAJ, Sim ATR (1991) *Meth Enzymol* **201**: 469-476
29. Haystead TAJ, Weiel JE, Litchfield DW, Tsukitani Y, Fischer EH, Krebs EG (1990) *J Biol Chem* **265**: 16571-16580
30. Haystead TAJ, Sim ATR, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG (1989) *Nature (Lond)* **337**: 78-81
31. Tonks NK (1990) *Curr Opin Cell Biol* **2**: 1114-1124
32. Cohen PTW (1990) *Meth Enzymol* **201**: 398-408
33. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK (1991) *Science* **253**: 401-406
34. Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH (1988) *J Biol Chem* **263**: 6722-6730
35. Tonks NK, Cicirelli MF, Krebs EG, Fischer EH (1990) *Mol Cell Biol* **10**: 458-463
36. Cicirelli MF, Tonks NK, Diltz CD, Weiel JE, Fischer EH, Krebs EG (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5514-5518
37. Klarlund JK (1985) *Cell* **41**: 707-717
38. Millar JBA, McGowan CH, Lenaers G, Jones R, Russel P (1991) *EMBO J* **10**: 4301-4309
39. Gautier J, Salomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW (1991) *Cell* **67**: 197-211
40. Clemens M (1992) *Nature (Lond)* **360**: 210-211

Struktura i funkcja ubikwityny

Structure and function of ubiquitin

URSZULA PIOTROWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Geny ubikwityny i ich ekspresja
- III. Struktura ubikwityny i jej połączeń z białkami
- IV. Białka analogiczne i homologiczne z ubikwityną
- V. Mechanizm przyłączania ubikwityny do białka
- VI. Dalsze losy koniugatów
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Ubiquitin genes and their expression
- III. Structure of ubiquitin and its conjugates with proteins
- IV. Ubiquitin analogues and homologues
- V. Mechanism of ubiquitin conjugation
- VI. Fate of ubiquitin-protein conjugates
- VII. Final remarks

I. Wstęp

Coraz większe zainteresowanie budzi niewielkie, zbudowane z 76 aminokwasów białko — ubikwityna. Jego obecność stwierdzono w cytoplazmie, jądrze i błonie komórkowej wszystkich organizmów eukariotycznych, a także u niektórych wirusów. Funkcjom i znaczeniu tego białka poświęcono szereg prac przeglądowych [1-11]. W polskim piśmiennictwie opublikowano na ten temat tylko jedną taką pracę [2].

Ubikwityna jest elementem uniwersalnego u eukariotów systemu modyfikowania białek. System ten, nazwany w skrócie systemem ubikwitynowym, składa się, oprócz ubikwityny, z układu enzymatycznego katalizującego proces przyłączania jej do białka.

Zjawisko ligacji ubikwityny towarzyszy wszystkim nieomal procesom metabolicznym, od podziałów i różnicowania się komórki po jej śmierć. Ubikwityna zaangażowana jest w regulację ekspresji genów, reparację DNA, transformację nowotworową. Wpływa na aktywność chromatyny, bierze udział w powstawaniu rybosomów. Odgrywa wreszcie podstawową rolę w proteolizie białek regulacyjnych o krótkim czasie półtrwania, a także białek o dłuższym okresie półtrwania, które jednak z różnych przyczyn muszą być z komórki usunięte.

Ubikwitynacja białek pojawiła się w świecie istot żywych dopiero u eukariotów. Nie zachodzi u bakterii. Porównanie sekwencji aminokwasowej ubikwityny drożdży i człowieka wykazało identyczność w 73 z 76 reszt aminokwasowych. Ubikwityna jest zatem najbardziej konserwatywnym ze znanych białek, a układy enzymatyczne leżące u podstaw reakcji ubikwitynacji należą prawdopodobnie u eukariotów do najstarszych.

Zadaniem poniższej pracy jest przedstawienie wyników podstawowych badań dotyczących samej cząsteczki ubikwityny. Scharakteryzowany też został sposób w jaki wchodzi ona w interakcje z innymi białkami. Udziałowi ubikwityny w różnych procesach komórkowych poświęcona będzie oddzielna publikacja.

II. Geny ubikwityny i ich ekspresja

Wyróżnia się dwie podstawowe klasy genów ubikwityny. Do pierwszej zaliczono pojedyncze geny oraz poligeny, w których jednostka kodująca 76 aminokwasów ubikwityny powtarza się wielokrotnie w sposób ciągły (bez wstawek). Na końcu 3' genu znajduje się na ogół kodon aminokwasu, nie występującego w dojrzałej ubikwitynie i różnego u przedstawicieli różnych gatunków. Zadaniem tego aminokwasu jest ochrona C-końca niedojrzałej ubikwityny przed koniugacją z białkiem. W procesie dojrzewania zostaje on odcięty. Liczba genów i liczba powtórzeń jednostki ubikwitynowej w poligenie jest u osobników każdego gatunku inna. Na końcu 5' niektórych genów tej klasy znajdują się nieulegające transkrypcji sekwencje regulatorowe, odpowiedzialne za ekspresję w warunkach szoku termicznego (Ryc. 1).

Do drugiej klasy należą geny składające się z pojedynczej sekwencji DNA ubikwityny, przedłużonej na



Ryc. 1. Geny ubikwityny

A. Gen poliubikwityny z genem regulatorowym szoku termicznego (ST) na końcu 5' łańcucha i z kodonem nieubikwitynowego aminokwasu na końcu 3'.

B. Gen ubikwityny połączony z białkiem przedłużającym (BP).

* mgr, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, 00-957 Warszawa, ul. Chocimska 5.

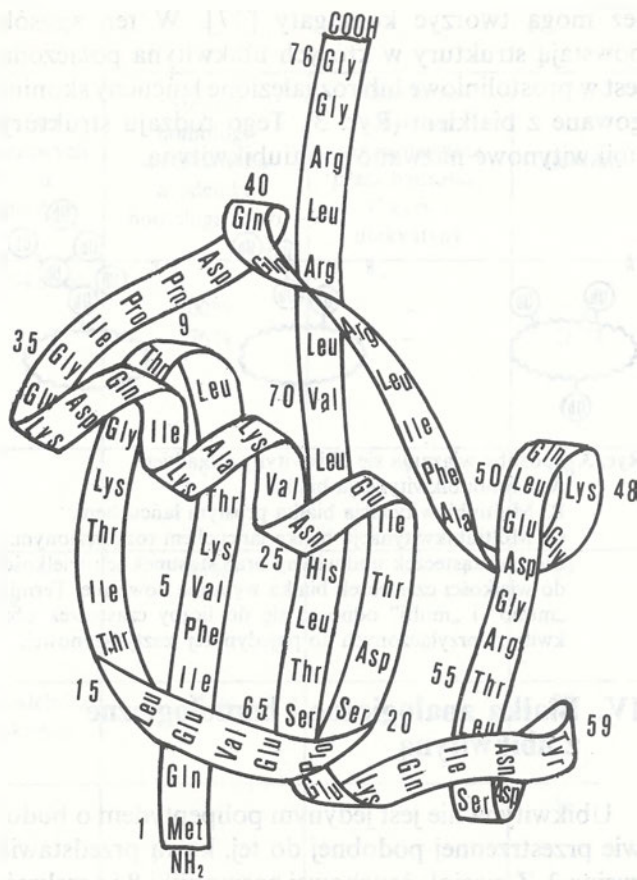
końcu 3' sekwencjami DNA kodującymi pewne białka rybosomalne (Ryc. 1). Zidentyfikowano dwa typy takich białek przedłużających. Do pierwszego typu zaliczono białko o 52 aminokwasach wchodzące w dojrzałej, to jest pozbawionej ubikwiny formie, w skład większej podjednostki rybosomu. Białka drugiego typu mają długość wahającą się u różnych gatunków w granicach od 76 do 80 aminokwasów i są elementem mniejszej podjednostki rybosomu. Geny kodujące białka obu typów występują wyłącznie w postaci opisanej powyżej struktury. Ulegają one translacji razem z ubikwiną. Ta ostatnia zostaje odcięta w bliżej nie zidentyfikowanym momencie przed wbudowaniem się białka przedłużającego do rybosomu. Oba te białka cechują się wysokim stopniem konserwatywności. Porównanie sekwencji ich DNA z komórek myszy, drożdży, człowieka i *Dictyostelium* wykazało około 80% zgodności w przypadku białek pierwszego typu i około 60% u drugiego typu [3].

Ekspresja genów obu klas jest w cyklu życiowym komórki ściśle regulowana. Stwierdzono, że w warunkach szybkiego wzrostu i podziałów komórkowych, a więc w okresach wzmożonej biosyntezy białka, indukowane są przede wszystkim geny kodujące ubikwinę połączoną z białkami przedłużającymi. W warunkach głodu, w szoku cieplnym i w okresach stacjonarnego wzrostu komórek w hodowli, ekspresji ulegają głównie geny poliubikwiny [3].

Nie stwierdzono obecności w komórkach poliubikwiny, to jest białka, w którym C-koniec jednego ubikwiny monomeru łączyłby się z N-koncem następnego. Najprawdopodobniej tworząca się poliubikwina jest niezwykle szybko, być może równocześnie z translacją, hydrolizowana do ubikwiny. Podobnie rzecz się ma z ubikwiną sprzężoną z genami kodującymi białka przedłużające [3].

III. Struktura ubikwiny i jej połączeń z białkami

Badania struktury krystalicznej ubikwiny prowadzone z zastosowaniem magnetycznego rezonansu jądrowego wykazały, że zarówno w roztworze wodnym, jak i w stanie stałym stanowi ona zwartą, globularną cząsteczkę (Ryc. 2). Jej hydrofobowy rdzeń składa się z pięciu równoległych albo antyrównoległych ułożonych odcinków łańcucha polipeptydowego, powiązanych między sobą regularnie rozłożonymi wiązaniami wodorowymi. Obdarzone ładunkiem reszty aminokwasów skierowane są na zewnątrz cząsteczki. Tego rodzaju strukturę nazwano harmonijką β . Brzeży jej powierzchni spina odcinek łańcucha zwinięty w 3,5 skręta helisy α i umocowany dodatkowo mostkami solnymi między resztami lizyny i kwasu glutaminowego (Ryc. 2). W sumie około 87% łańcucha polipeptydowego zaangażowane jest w tworzenie wiązań wodorowych [12]. Taka budowa nadaje cząsteczce ubikwiny niezwykle odporność na wysoką tempera-



Ryc. 2. Wstęgowy schemat cząsteczki ubikwiny.

Centralną część cząsteczki stanowią połączone wiązaniami wodorowymi odcinki 1-7, 10-17, 40-45, 48-50, 64-72. Centrum aktywnym są cztery C-końcowe aminokwasy: Leu-Arg-Gly-Gly, a miejscem akceptorowym następnego ubikwiny w łańcuchu multiubikwiny jest Lys-48. Odległości od siebie poszczególnych reszt aminokwasowych i ich położenie na schemacie są przybliżone. Sekwencja ubikwiny według [65], przebieg łańcucha polipeptydowego według [12].

ture, duży zakres pH, i zmiany polarności środowiska. W opublikowanej niedawno pracy [13] poświęconej strukturze ubikwiny w stanie częściowej denaturacji, tak zwanym stanie A, wykazano, że wodny roztwór 60% metanolu przy pH2 powoduje tylko niewielkie, w pełni odwracalne odkształcenie cząsteczki. W opisanych warunkach rozfałdowaniu ulegają jedynie brzeżne fragmenty „harmonijkowej” części ubikwiny. Centrum aktywne oraz helisa α pozostają nieznaruszone.

Centrum aktywne ubikwiny stanowią cztery reszty aminokwasowe Leu-Arg-Gly-Gly na karboksylowym końcu łańcucha (Ryc. 2). W procesie modyfikacji białka ubikwiną C-końcowa glicyna cząsteczki ubikwiny łączy się wiązaniem izopeptydowym z grupą ϵ -aminową lizyny koniugowanego białka. Obiektem modyfikacji może też być sama ubikwina. Najczęściej jest ona już połączona z białkiem, ale *in vitro* możliwe jest również enzymatyczne przenoszenie jednej cząsteczki wolnej ubikwiny na drugą [14, 15]. Miejscem akceptorowym w cząsteczce ubikwiny jest lizyna-48 [14, 16]. Zaobserwowano jednak, że w sytuacjach gdy jest ona już związana, inne reszty lizynowe

też mogą tworzyć koniugaty [17]. W ten sposób powstają struktury w których ubikwityna połączona jest w prostoliniowe lub rozgałęzione łańcuchy skoniugowane z białkiem (Ryc. 3). Tego rodzaju struktury ubikwitynowe nazwano multiubikwityną.



Ryc. 3. Sposoby wiązania się ubikwitiny z białkiem

A. Monoubikwitynacja białka.

B. Multiubikwitynacja białka prostym łańcuchem.

C. Multiubikwitynacja białka łańcuchem rozgałęzionym.

Liczba cząsteczek ubikwitiny oraz stosunek ich wielkości do wielkości cząsteczek białka wybrane dowolnie. Termin „mono” i „multi” odnoszą się do liczby cząsteczek ubikwitiny przyłączonych do pojedynczej reszty lizynowej.

IV. Białka analogiczne i homologiczne z ubikwityną

Ubikwityna nie jest jedynym polipeptydem o budowie przestrzennej podobnej do tej, którą przedstawia rycina 2. Z pięciołańcuchowej harmonijki β i przekraczającej ją helisy α zbudowana jest strukturalna część cząsteczki w białkach należących do rodziny inhibitorów proteinaz cysteinowych — cystatyn [18]*). Podobną budowę (czterolańcuchową harmonijkę β połączoną z helisą α o czterech skrętach) posiada wiążąca immunoglobulinę G domena białka G występującego na powierzchni błony komórkowej *Streptococcus* sp. [19, 20]. Sekwencje aminokwasów w tych białkach nie są homologiczne. Wydaje się, że tego typu motyw przestrzenny pojawia się w szczególnie trwałych rejonach cząsteczki białka i nie należy do rzadkości.

Znacznie rzadsza natomiast jest homologia sekwencji ubikwitiny i innych białek. U organizmów wyższych niezwykle ważne jest zachowanie w niezmięnionej postaci pierwszorzędowej struktury ubikwitiny [5]. Większość mutacji punktowych w genach ubikwitiny zmniejsza, albo wręcz znosi zdolność tej ostatniej do aktywowania proteolizy. Upośledza to przeżywalność komórki [22]. Z tego powodu cząsteczki ubikwitiny pochodzące z tak odległych ewolucyjnie organizmów jak człowiek i *Trypanosoma cruzi* czy też *Dictyostelium discoideum* różnią się od siebie jedynie dwoma aminokwasami [5]. Do wyjątków należy pasożyt *Entamoeba histolytica* którego ubikwityna różni się od ludzkiej aż w sześciu pozycjach [21]. Mimo omówionych powyżej ograniczeń istnieją jednak w przyrodzie białka ubikwitynowopodobne. Sposób ich pojawienia się nie jest znany. Być może powstały w wyniku rekombinacji indukowanych przez wirusy.

* O cystatynach pisano w *Postęпах Biochemii* 33 (1987), 231-241, a także w *Postęпах Biochemii* 34 (1988) 23-46.

Jak wykazały badania, ubikwityna odgrywa u wirusów jakąś nieznaną nam jeszcze rolę. Stwierdzono, że niektóre z nich pobierają ubikwitynę z komórek gospodarza w stanie wolnym albo w postaci koniugatów [23-26]. Wirus BVDV (*bovine viral diarrhoea virus*) na przykład, zdolny jest do przyswojenia genu ubikwitiny z materiału genetycznego gospodarza. W RNA cytopatogenicznej jego formy — CP1 — wykrywa się dwie sekwencje pochodzące z genomu gospodarza. Jedna z nich koduje kompletną cząsteczkę ubikwitiny, druga jej 46-aminokwasową część C-końcową. Oba tych sekwencji brak w cząsteczce niecytopatogenicznej formy NCP1. Gen ubikwitiny, występujący w genomie BVDV zawierającym mutację Osloss, różni się od wołowego w dwóch pozycjach [26, 27]. Jeszcze bardziej, w porównaniu z ubikwityną BVDV, zmieniona jest ubikwityna zakaźnego dla owadów bakulowirusa. Jego DNA koduje między innymi białko, którego sekwencja w 76% odpowiada ubikwitynie człowieka [28] (Tabela 1).

U człowieka wykryto do tej pory trzy białka ubikwitynowopodobne [29-31]. Podstawowe dane o nich zestawiono w tabeli I. Cechą wspólną tych białek jest na ogół brak w cząsteczce sekwencji zgodnej z występującą na karboksylowym końcu ubikwitiny (Tabela I). Sekwencję tę rozpoznają prawdopodobnie hydrolazy C-końca ubikwitiny — enzymy odpowiedzialne za odcinanie poszczególnych cząsteczek ubikwitiny od koniugatów, względnie za hydrolizę poliubikwitiny [5]. Wszelkie zmiany, jakie pojawiają się w omawianym rejonie cząsteczki ubikwitiny, nie tylko niszczą jej centrum aktywne, ale też uniemożliwiają odłączenie od łańcucha polipeptydowego w procesie dojrzewania. Być może geny takiej trwale związanej z białkiem, a więc nieaktywnej ubikwitiny, nie muszą podlegać tak ostrej selekcji jak geny samej ubikwitiny. Mogłoby to prawdopodobnie z czasem doprowadzić do powstania białka ubikwitynowopodobnego.

Najlepiej scharakteryzowanym i jedynym jakie udało się wyizolować białkiem ubikwitynowopodobnym jest białko UCRP (*ubiquitin cross reactive protein*) [31-34] (Tabela 1). Należy ono do pierwszych białek pojawiających się w komórce w odpowiedzi na działanie interferonu. Białko UCRP ma ciężar cząsteczkowy 15 kDa i powstaje przez odcięcie dziewięciu C-końcowych reszt aminokwasowych od prekursora o masie 17 kDa [32]. Jest ono zbudowane z dwóch domen. Każda wykazuje znaczny stopień homologii z ubikwityną, ale tylko część C-końcowa zachowała niezmienną sekwencję jej centrum aktywnego [31]. Ostatnie badania potwierdziły wysuniętą już wcześniej hipotezę, że UCRP jest funkcjonalnym homologiem ubikwitiny i, podobnie jak ona, tworzy koniugaty z wieloma białkami [34].

Dwa białka, które być może też są białkami ubikwitynowopodobnymi, wykryto w ekstraktach z mózgu cielęcego (Tabela 1). Ich ciężary cząsteczkowe oceniono na około 12 kDa i 28 kDa. Nie jest znana pełna ich

Tabela 1.
Białka ubikwitynopodobne

Pochodzenie białka ubikwitynopodobnego lub odpowiadającego mu c-DNA	Charakterystyka białka	Liczba reszt aminokwasowych w odcinku homologicznym	Stopień homologii z ubikwityną w odcinku homologicznym	Obecność sekwencji rozpoznawanej przez hydrolazę C-końca ubikwityny	Literatura
Genom wirusa BVDB typ CP1 Genom wirusa BVDV typ Osloss	Białko przedłużone niekompletną cząsteczką ubikwityny. Ubikwityna zmieniona w pozycjach 55 i 76, przedłużona białkiem o sekwencji nieodpowiadającej ubikwitynie.	46 reszt C-końcowych 76 reszt	100% 76%	+ -	26,27 26,27
Genom bakulowirusa	Białko ubikwitynopodobne o 77 aminokwasach, z resztą tyrozynową w pozycji 77.	76 reszt	76%	+	28
Gen GdX na chromosomie X człowieka	Białko o 157 aminokwasach zawierające 74-aminokwasową ubikwitynopodobną domenę N-końcową.	74 reszty N-końcowe	43%	-	29
Gen BAT 3 z głównego kompleksu zgodności tkankowej na chromosomie 6 człowieka	N-końcowy odcinek białka o ciężarze cząsteczkowym 120 kDa.	76 reszt w odcinku bliskim N-końca	35%	-	30
Białko UCRP izolowane z komórek wrażliwych po indukcji interferonem Domena N-końcowa Domena C-końcowa	Białko o ciężarze cząsteczkowym 15 kDa zbudowane z dwóch domen ubikwitynopodobnych.	75 reszt 76 reszt	29% 31%	- +	31
Białko I izolowane z mózgu cięłeczego Białko II izolowane z mózgu cięłeczego	Białko wiążące gangliozydy o co najmniej 12 aminokwasach N-końcowych zgodnych z sekwencją ubikwityny i ciężarze cząsteczkowym 12 kDa. Białko wiążące gangliozydy o co najmniej 18 aminokwasach N-końcowych zgodnych z sekwencją ubikwityny i ciężarze cząsteczkowym 28 kDa.	co najmniej 12 reszt co najmniej 18 reszt	100% co najmniej 95%	nie badana nie badana	35 35

sekwencja. Stwierdzono jedynie, że 12 aminokwasów poznanej sekwencji N-końca pierwszego białka i 18 aminokwasów poznanej sekwencji N-końca drugiego białka pokrywa się dokładnie z sekwencją ubikwityny. Biologiczne znaczenie tych białek nie jest jeszcze znane. Na podstawie ich powinowactwa do niektórych gangliozydów wysunięto przypuszczenie, że uczestniczą one w wewnątrzkomórkowym transporcie tych związków. Stwierdzono również, że w hodowli tkankowej hamują wzrost komórek neuroblastomy myszy N2a [35].

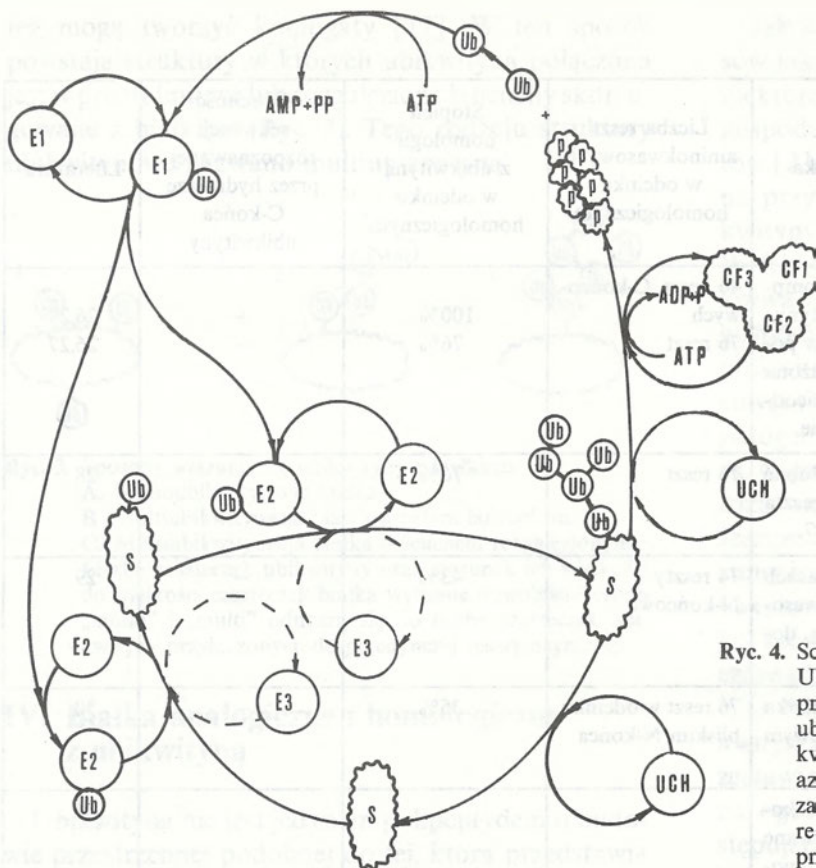
V. Mechanizm przyłączania ubikwityny do białka

Jak już wspomniano na wstępie, ubikwityna uczestniczy w modyfikacji wielu różnych białek. Pierwszym etapem tego procesu jest utworzenie się wiązania izopeptydowego między ubikwityną i białkiem. Przyłączanie ubikwityny zostało już dość dobrze poznane.

Przebiega wielostopniowo i uczestniczą w nim trzy rodzaje enzymów, nazwane w skrócie E1, E2, E3 (Ryc. 4).

Proces rozpoczyna połączenie ubikwityny z enzymem aktywującym — E1 — homodimerem o ciężarze cząsteczkowym około 210 kDa, odznaczającym się dużym stopniem konserwatywności [11]. Wiązanie wytwarza się (poprzez wysokoenergetyczny ester tiolowy) pomiędzy glicyną na C-końcu ubikwityny a cysteiną w centrum aktywnym E1. W procesie ubikwitynacji białka jest to jedyny etap który wymaga energii. Jej źródło stanowi hydroliza ATP do AMP i pirofosforanu [36]. Duże stężenie E1 w jądrze komórkowym [37] wskazuje, że tam także, podobnie jak w cytoplazmie zachodzi proces aktywacji ubikwityny.

Z E1 ubikwityna zostaje przekazana na białko przenoszące, zwane również białkiem koniugującym ubikwitynę — E2. E2 bezpośrednio albo przy udziale białka E3, rozpoznaje substrat. Enzymów o takiej aktywności jest wiele. Do tej pory wyizolowano 19



Ryc. 4. Schemat przebiegu proteolizy w systemie ubikwityny. UB — ubikwityna, S — substrat białkowy, P — produkt proteolizy substratu, E1, E2, E3, — enzymy przyłączające ubikwitynę do białka, UCH — hydrolaza C-końca ubikwityny, CF1, CF2, CF3 — podjednostki kompleksu proteazowego o stałej sedymentacji 26S. Reakcje, które zawsze zachodzą w przebiegu proteolizy zaznaczono ciągłą linią, reakcje zachodzące tylko w niektórych przypadkach — linią przerywaną.

kodujących je genów [5]. W ekstrakcie z retikulocytów królika i w komórkach drożdży zidentyfikowano siedem różnych E2 [cyt. za 14]. Wszystkie enzymy przenoszące ubikwitynę posiadają około 150-aminokwasową domenę centralną (o ciężarze cząsteczkowym 14-18 kDa), zawierającą centrum aktywne z resztą cysteinową wiążącą ubikwitynę. Zgodność sekwencji różnych E2 osiąga w tym rejonie co najmniej 35%. Niektóre E2 przedłużone są na aminowym, karboksylowym lub na obu końcach domeny centralnej dodatkowymi odcinkami łańcucha. Ich rola polega między innymi na rozpoznawaniu substratu białkowego bez udziału E3 oraz prawdopodobnie na wiązaniu pewnych E2 z błoną komórkową. Bliższe informacje dotyczące budowy enzymów przenoszących ubikwitynę i kodujących je genów znajdzie Czytelnik w pracach [5, 9, 11].

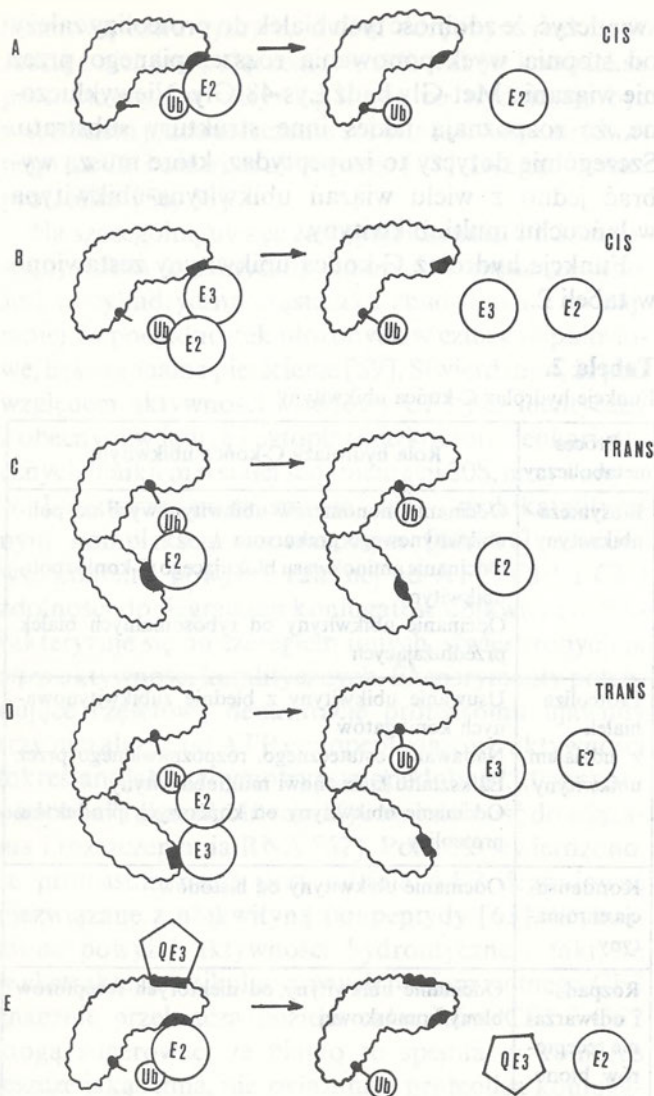
Niektóre enzymy przenoszące ubikwitynę potrzebują do rozpoznawania substratu dodatkowego białka, dimeru o masie cząsteczkowej 350 kDa, właściwej ligazy ubikwityna-białko, inaczej zwanej E3. Hipotetyczne mechanizmy rozpoznawania białka przez system enzymatyczny przyłączający ubikwitynę przedstawiono na rycinie 5.

Z ekstraktu retikulocytowego wyizolowano dwa różne E3 — E3 α i E3 β . Różnią się one od siebie swoistością substratową, wykazują natomiast wiele podobieństw we właściwościach fizycznych [38]. Stwierdzono, że E3 α rozpoznaje aminokońcową resztę substratu. Zastosowanie prostych pochodnych aminokwasów pozwoliło wyróżnić trzy typy substratów E3 α .

Do pierwszego typu zaliczono białka z zasadową (Arg, Lys, His), amidową (Asn, Gln), lub kwaśną (Asp, Glu) resztą N-końcową. Te ostatnie mogą podlegać arginylicacji przy udziale odpowiedniego tRNA i transferazy arginylo-tRNA-białko [39]. Natomiast N-końcowe amidy kwasów asparaginowego i glutaminowego mogą być hydrolizowane (asparaginazą albo glutaminazą) do kwasów, a następnie również ulegać arginylicacji. Modyfikację białek argininą, w następstwie czego może zachodzić ich proteoliza wykryto w ekstraktach z retikulocytów królika [10], z uszkodzonych włókien nerwowych szczura [39], a także w ekstraktach z hodowli hepatocytów oraz komórek *Dictyostelium discoideum* [41].

Drugi rodzaj substratów E3 α obejmuje białka z dużym, hydrofobowym aminokwasem N-końcowym (Phe, Tyr, Trp, Leu). Stwierdzono, że centra aktywne rozpoznające substraty typu pierwszego i drugiego znajdują się w różnych miejscach tej samej cząsteczki E3 α [41]. Uważa się także, że E3 α posiada centrum aktywne rozpoznające białka nie należące do I i II grupy. Ponieważ miejsce rozpoznawane leży poza aminowym końcem cząsteczki, białka o tej strukturze zaliczono do trzeciego typu substratów E3 — tak zwanego "body type" [10].

W cząsteczce E3 α znajduje się również struktura wykazująca powinowactwo do ubikwityny. Przypuszcza się, że to rozpoznające ubikwitynę centrum zaangażowane jest w proces przedłużania łańcucha multiubikwityny [43], nie jest jednak jasne czy uczestniczy w łączeniu ubikwityny z innymi substratami.



Ryc. 5. Hipotetyczne mechanizmy rozpoznawania substratu przez system ligacji ubiquityny do białka

A, B. Rozpoznawanie typu cis.

Determinanty na powierzchni cząsteczki substratu (czarna przestrzeń) rozpoznawane przez składniki systemu ligacji ubiquityny do białka (E2, E3) leżą w bezpośredniej bliskości akceptorowej reszty lizynowej (czarna kropka). W niektórych reakcjach E2 jest zdolny zarówno do rozpoznawania determinanty na substracie, jak też do przyłączania ubiquityny (Ub) do reszty lizynowej (A). Inne reakcje wymagają udziału E3 w rozpoznawaniu determinanty substratu, a E2 w przyłączeniu ubiquityny (B).

C, D. Rozpoznawanie typu trans.

W kompleksie białkowym determinanty na cząsteczce substratu rozpoznawane przez E2 (C) lub przez E3 (D) leżą na jednej z podjednostek, podczas gdy akceptorowa lizyna, będąca przedmiotem ubiquitynacji, leży na drugiej podjednostce.

E. Hipotetyczna możliwość kiedy białko o „E3-podobnej” aktywności (QE3) umożliwia ubiquitynację nie wchodząc jednak w bezpośredni kontakt z E2.

Substratem powyższych reakcji może być białko podlegające ubiquitynacji albo odcinek łańcucha multiubikwityny.

Dużo mniej wiadomo o E3 β . Substratami tego enzymu są pewne białka należące do III typu, które reagują w niewielkim stopniu także z E3 α . Stwierdzono, że mimo iż domeny, z którymi wiąże się E3 β leżą poza aminowym końcem cząsteczki substratu, enzym ten rozpoznaje również pewne sekwencje zlokalizowane w pobliżu N-końca. Natura tych N-koń-

cowych struktur nie została dotychczas zbadana [38].

Ligazy ubiquityna-białko odgrywają decydującą rolę w kierowaniu koniugatu na szlak proteolizy. Badania czasu trawienia β -galaktozydazy, w której N-końcową metioninę zastępowano innymi aminokwasami wykazały, że rodzaj aminokwasu N-końcowego decyduje o długości okresu półtrwania białka w komórce. Prawidłowość tę nazwano zasadą N-końca [1, 10].

Cząsteczka E3, wiążąc się równocześnie z enzymem E2 i z substratem, nadaje obu białkom konformację umożliwiającą koniugację ubiquityny. Przypuszcza się, że funkcję podobną do spełnianej przez E3 mogą pełnić też białka nie wchodzące w bezpośrednie interakcje z enzymami przenoszącymi ubiquitynę. Aktywność taką może wykazywać białko E6 wykrywane w ludzkich komórkach transformowanych przez wirusa *Papilloma* typu 16 i 18. Umożliwia ono koniugację ubiquityny z białkiem, co przyczynia się do degradacji onkoproteiny p53 spełniającej w komórce rolę supresora wzrostu nowotworowego [44]. Podobną właściwość przejawia białko szoku cieplnego hsp 70, które rozpoznaje sekwencję Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (KFERQ) i ułatwia przeniesienie posiadających ją białek do lizosomów, gdzie ulegają proteolizie [45].

Nie jest znany pełen obraz zjawisk regulujących ubiquitynację białek. Regulacja ta może przebiegać w różnych procesach komórkowych. W rozdziale II omówiona została zależność między stanem fizjologicznym komórki a ekspresją genów ubiquityny. Regulacja ubiquitynacji białek może przebiegać także na poziomie interakcji koniugujących ubiquitynę enzymów z ich substratami. Każde z tych białek może ulegać różnym modyfikacjom modulującym jego aktywność. Jak już wspomniano poprzednio, przyłączenie do aminowego końca białka argininy w znacznym stopniu ułatwia rozpoznawanie substratu przez E3 i koniugację ubiquityny. Uważa się, że modyfikacja ta maksymalnie destabilizuje białko powodując szybką jego degradację. Dla ścisłości należy dodać, że proteoliza arginylowanych białek może przebiegać *in vitro* również bez udziału systemu koniugacji ubiquityny [39]. Stwierdzono również ostatnio, że enzymy E1 i E2 mogą być specyficznym fosforylowane. Zwiększa to ich aktywność a więc ułatwia ubiquitynację [46].

VI. Dalsze losy koniugatów

Istnieją trzy szlaki metaboliczne, na które mogą wejść z ubiquitynowane białka. Mogą one trwale pozostać w komórce. Cząsteczki ubiquityny mogą być usunięte z koniugatu przez hydrolazy C-końca ubiquityny. Po przyłączeniu ubiquityny białko może zostać zdegradowane przy udziale cytoplazmatycznego kompleksu proteazowego o stałej sedymentacji 26S albo hydrolaz lizosomalnych.

Wysunięto kilka różnych hipotez próbujących wyjaśnić co decyduje o wejściu z ubiquitynowanego białka

na określony szlak przemian metabolicznych. Zaobserwowano, że trwale, nie podlegające proteolizie koniugaty, takie jak histony H2A, H2B i H3 w aktywnych transkrypcyjnie rejonach chromatyny, albo niektóre receptory w błonie komórkowej, zawierają jedną lub kilka pojedynczo podstawionych cząsteczkami ubikwityny reszt lizynowych (są monoubikwitynowane). Degradacji ulegają natomiast białka podstawione prostym lub rozgałęzionym łańcuchem cząsteczek ubikwityny (multiubikwitynowane). Ten ostatni wniosek potwierdzają obserwacje, wskazujące że zastąpienie lizyny-48 w ubikwitynie resztą argininową (blokującą proces przedłużania łańcucha), blokuje zarazem proteolizę [9]. Są jednak dane przeciwnie, świadczące że białko monoubikwitynowane może być substratem cytoplazmatycznej proteazy o stałej sedymentacji 26S, degradującej koniugaty ubikwitynowo-białkowe do krótkich peptydów. *In vitro* udało się przeprowadzić proteolizę histonu H3 połączonego z pojedynczymi cząsteczkami ubikwityny, w której reszty lizynowe zostały zablokowane przez grupy metylowe [47]. Nie wiadomo czy *in vivo* możliwa jest analogiczna reakcja proteolizy.

Przypuszcza się również że czynnikiem decydującym o losach koniugatu jest konformacja ubikwityny w łańcuchu multiubikwityny [48]. Zmiana konformacji ubikwityny za pomocą mutacji punktowych prowadzi na ogół do zmniejszenia jej aktywności w procesie proteolizy [22]. Według innej, dość kontrowersyjnej hipotezy, białka posiadające sekwencje bogate w prolinę, kwas glutaminowy, serynę i treoninę (PEST) cechuje *in vivo* krótki okres półtrwania [49]. Przynajmniej niektóre z takich białek mogą być *in vitro* degradowane w systemie ubikwityny [11]. Nie można zatem wykluczyć, że sama natura substratu białkowego decyduje o budowie koniugatu i jego dalszych losach. Potwierdza to również zasada N-końca.

W przemiany jakim może podlegać koniugat ubikwitynowo-białkowy zaangażowane są następujące enzymy proteolityczne: hydrolazy C-końca ubikwityny, kompleks proteazowy o stałej sedymentacji 26S, peptydazy obecne w lizosomach i prawdopodobnie jeszcze inne wysoce specyficzne proteazy. W niniejszej pracy omówione zostaną jedynie dwa pierwsze typy enzymów proteolitycznych.

Hydrolazy C-końca ubikwityny różnią się między sobą zarówno właściwościami fizycznymi jak i specyficznością [50, 51]. Wszystkie rozpoznają reszty aminokwasowe zlokalizowane na ubikwitynowej części koniugatu, być może C-końcową sekwencję ubikwityny [5]. Modyfikacje tej sekwencji uniemożliwiają im trawienie. Wykazano, że podobny motyw Gly-Gly-X, w pewnych nieubikwitynowych białkach wirusowych jest sygnałem do rozszczepienia tych białek [52]. Hydrolazy C-końca ubikwityny odznaczają się bardzo wysoką specyficznością substratową. Każda z nich wykazuje aktywność w innym momencie cyklu komórkowego i w stosunku do innego substratu. Może to

świadczyc, że zdolność tych białek do proteolizy zależy od stopnia wyeksponowania rozszczepianego przez nie wiązania Met-Gly bądź Lys-48-Gly. Niewykluczone, że rozpoznają jakieś inne struktury substratu. Szczególnie dotyczy to izopeptydaz, które muszą wybrać jedno z wielu wiązań ubikwityna-ubikwityna w łańcuchu multiubikwityny.

Funkcje hydrolaz C-końca ubikwityny zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2.

Funkcje hydrolaz C-końca ubikwityny

Proces metaboliczny	Rola hydrolazy C-końca ubikwityny
Biosynteza ubikwityny	Odcinanie monomerów ubikwitynowych od poliubikwitynowego prekursora Odcinanie aminokwasu blokującego C-koniec poliubikwityny Odcinanie ubikwityny od rybosomalnych białek przedłużających
Proteoliza białek z udziałem ubikwityny	Usuwanie ubikwityny z błędnie zubiubikwitynowanych koniugatów Nadawanie ostatecznego, rozpoznawalnego przez E2 kształtu łańcuchowi multiubikwityny Odcinanie ubikwityny od końcowych produktów proteolizy
Kondensacja chromatyny	Odcinanie ubikwityny od histonów
Rozpad i odtwarzanie receptorów błonowych	Odcinanie ubikwityny od niektórych receptorów błony komórkowej

Tabele zestawiono na podstawie prac [5, 11, 50, 51]

Duże zainteresowanie budzi znane od 1983 r. specyficzne dla neuronów białko PGP 9.5. Stanowi ono około 1% wszystkich białek neuronu [53]. Stwierdzono, że białko to jest hydrolazą C-końca ubikwityny [54]. Wzmoczoną jego aktywność wykrywa się w neuronach chorych z zespołem Alzheimerera, Parkinsona i innymi chorobami neurodegeneracyjnymi, gdzie sygnalizuje nasilenie się procesów proteolizy [55].

Koniugaty które weszły na szlak prowadzący do degradacji w cytoplazmie, po ewentualnej wstępnej obróbce przez hydrolazy C-końca ubikwityny, ulegają proteolizie przy udziale zależnego od ATP kompleksu proteazowego. To wielkie białko o stałej sedymentacji 26S i ciężarze cząsteczkowym ocenianym na 1000—1500 kDa, zbudowane jest z trzech zasocjowanych czynników — CF1 (ok. 500 kDa), CF2 (ok. 250 kDa), i CF3 (ok. 650 kDa) — z których każdy składa się z wielu podjednostek [53]. Do degradacji białka związanego z ubikwityną konieczna jest asocjacja wszystkich trzech czynników. Jest to drugi oprócz aktywacji ubikwityny etap proteolizy wymagający energii. Zastępując ATP innymi trójnukleotydami wykazano, że hydroliza ATP na ADP i resztę fos-

foranową towarzyszy tu dwóm odrębnym reakcjom. Jedną z nich jest połączenie się składników kompleksu proteazowego w aktywną formę co wydaje się być warunkiem przemieszczenia substratu do zlokalizowanego na CF3 centrum aktywnego [57]. Drugą — sama proteoliza [56, 58].

Na szczególną uwagę zasługuje czynnik CF3 stanowiący rdzeń katalityczny kompleksu proteazowego. Jest to cylindryczna cząsteczka zbudowana z co najmniej 24 podjednostek ułożonych w cztery współosiowe, heksagonalne pierścienie [59]. Stwierdzono, że pod względem aktywności i budowy CF3 jest identyczny z obecnym w jądrze i cytoplazmie komórek eukariotycznych białkiem o stałej sedymentacji 20S, nazywanym w literaturze proteasomem albo multikatalitycznym kompleksem proteazowym [60, 61]. Oprócz wspomnianej powyżej, zależnej od ATP, CF1 i CF2 zdolności do degradacji koniugatów ubikwityny, charakteryzuje się on szeregiem innych, stwierdzonych *in vitro* aktywności katalitycznych. Eksperymenty powodujące częściową denaturację proteasomu ujawniły trzy niezależne od ATP endopeptydazowe aktywności (określane jako „chymotrypsynopodobna”, „trypsynopodobna” i „kazeinolityczna”) oraz zdolność do wiązania i rozszczepiania RNA [62]. Ponadto stwierdzono, że proteasom może przy udziale ATP degradować niezwiązane z ubikwityną polipeptydy [63]. Wymienione powyżej aktywności hydrolityczne i fakt, że w ekstraktach retikulocytowych poziom wolnego CF3 znacznie przekracza poziom czynników CF1 i CF2 mogą sugerować, że białko to spełnia w komórce jeszcze jakąś inną, nie związaną z proteolizą koniugatów ubikwityny, rolę. Wysłunięto hipotezę, że proteasom stanowi rodzaj „cytoplazmatycznej probówki”. W jej wnętrzu, na pewnych podjednostkach białkowych mogą być zlokalizowane centra katalityczne służące degradacji różnych substratów [64].

VII. Uwagi końcowe

Ubikwityna skupia na sobie uwagę badaczy wielu różnych dyscyplin naukowych. Podstawowym i najlepiej jak dotąd poznanym szlakiem metabolicznym, na którym działa, jest proteoliza. Zachodzi ona zarówno w lizosomach jak i poza nimi. Nasila się w stanach patologicznych, w okresach poprzedzających śmierć komórki, ale także w okresach jej intensywnego różnicowania, odgrywając ważną rolę w procesach regulacyjnych. Trzeba wyraźnie podkreślić, że funkcja biologiczna ubikwityny i ubikwitynacji białek jest nam znana tylko fragmentarycznie. Na przykład wiadomo, że ubikwitynacji podlegają histony, co ma być może duże znaczenie dla reperacji i ekspresji genów. Niewyjaśniona jest rola ubikwityny związanej z receptorami błonowymi.

Dokładniejszemu omówieniu procesów komórkowych, w które zaangażowany jest system ubikwityny, poświęcona zostanie inna praca.

Autorka tego tekstu składa serdeczne podziękowanie prof. dr hab. med. Jerzemu Kościelakowi za pomoc okazaną podczas pisania tej pracy.

Artykuł otrzymano 19 grudnia 1992 r.

Zaakceptowano do druku 26 stycznia 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) *Science* **234**: 179-186
2. Wiland E (1988) *Post Biochem* **34**: 361-374
3. Monia BP, Ecker DJ, Crooke ST (1990) *Biotechnology* **8**: 209-215
4. Jentsch S, Seufert W, Sommer T, Reins H-A (1990) *TIBS* **15**: 195-198
5. Jentsch S, Seufert W, Hauser H-P (1991) *Biochim Biophys Acta* **1089**: 127-139
6. Mayer RJ, Arnold J, Laszlo L, Landon M, Lowe J (1991) *Biochim Biophys Acta* **1089**: 141-157
7. Hershko A (1991) *TIBS* **16**: 265-268
8. Rechsteiner M (1991) *Cell* **66**: 615-618
9. Sommer T, Seufert W (1992) *Experientia* **48**: 172-178
10. Ciechanover A, Schwartz AL (1989) *TIBS* **14**: 483-488
11. Hershko A, Ciechanover A (1992) *Annu Rev Biochem* **61**: 761-807
12. Vijay-Kumar S, Bugg CE, Cook WJ (1987) *J Mol Biol* **194**: 531-544
13. Harding MM, Williams DH, Woolfson DN (1991) *Biochemistry* **30**: 3120-3128
14. Chen Z, Pickart CM (1990) *J Biol Chem* **265**: 21835-21842
15. Chen Z, Niles EG, Pickart CM (1991) *J Biol Chem* **266**: 15698-15704
16. Gregori L, Poosch MS, Cousins G, Chau V (1990) *J Biol Chem* **265**: 8354-8357
17. Haas A, Reback PM, Pratt G, Rechsteiner M (1990) *J Biol Chem* **265**: 21664-21669
18. Turk V, Bode W (1991) *FEBS Lett* **285**: 213-219
19. Kraulis PJ (1991) *Science* **254**: 581
20. Gronenborn A, Clore AM (1991) *Science* **254**: 582
21. Wostmann C, Tannich E, Bakker-Grunwald T (1992) *FEBS Lett* **308**: 54-58
22. Ecker DJ, Butt TR, Marsh J, Sternberg EJ, Margolis N, Monia BP, Jonnalagadda S, Ishaq Khan M, Weber PL, Mueller L, Crooke ST (1987) *J Biol Chem* **262**: 14213-14221
23. Dunigan DD, Dietzgen RG, Schoelz JE, Zaitlin M (1988) *Virology* **165**: 310-312
24. Hazelwood D, Zaiten M (1990) *Virology* **177**: 352-356
25. Putterman D, Pepsinsky RB, Vogt VM (1990) *Virology* **176**: 633-637
26. Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J (1989) *Nature (Lond)* **341**: 491
27. Meyers G, Tautz N, Dubovi EJ, Thiel H-J (1991) *Virology* **180**: 602-616
28. Guarino LA (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 409-413
29. Toniolo D, Persico M, Alcalay M (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 851-855
30. Banerji J, Sands J, Strominger JL, Spies T (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 2374-2378
31. Haas AL, Ahrens P, Bright PM, Ankel H (1987) *J Biol Chem* **262**: 11315-11323
32. Knight E, Fachev D, Cordova B, Hillman M, Kutny R, Reich N, Blomstrom D (1988) *J Biol Chem* **263**: 4520-4522
33. Ahrens P, Besancon F, Memet S, Ankel H (1990) *J Gen Virol* **71**: 1675-1682
34. Loeb KR, Haas A (1992) *J Biol Chem* **267**: 7806-7813
35. Zdebska E, Antoniewicz J, Nilsson B, Sandhoff K, Furst W, Janik P, Kościelak J (1992) *Eur J Biochem* **210**: 483-489
36. Haas AL, Rose IA (1982) *J Biol Chem* **257**: 10329-10337
37. Cook JC, Chock PB (1991) *Biochem Biophys Res Com* **174**: 564-571
38. Heller H, Hershko A (1990) *J Biol Chem* **265**: 6532-6535

39. Elias S, Ciechanover A (1990) *J Biol Chem* **265**: 15511-15517
40. Jack D, Chakraborty G, Ingoglia NA (1992) *Neuroreport* **3**: 47-50
41. Bohley P, Kopitz J, Adam G, Rist B, Appen F (1991) *Biomed Biochim Acta* **50**: 343-346
42. Reiss Y, Hershko A (1990) *J Biol Chem* **265**: 3685-3690
43. Reiss Y, Heller H, Hershko A (1989) *J Biol Chem* **264**: 10378-10383
44. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) *Cell* **63**: 1129-1136
45. Chiang H-L, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF (1989) *Science* **246**: 382-385
46. Kong S-K, Chock PB (1992) *J Biol Chem* **267**: 14189-14192
47. Haas A, Reback P, Pratt G, Rechsteiner M (1990) *J Biol Chem* **265**: 21664-21669
48. Ecker DJ, Butt TR, Marsh J, Sternberg E, Shatzman A, Dixon JS, Weber PL, Crooke ST (1989) *J Biol Chem* **264**: 1887-1893
49. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) *Science* **234**: 364-368
50. Tobias JW, Varshavsky A (1991) *J Biol Chem* **266**: 12021-12028
51. Hadari T, Warms JVB, Rose IA, Hershko A (1992) *J Biol Chem* **267**: 719-727
52. Lopez-Otin C, Simon-Mateo C, Martinez L, Vinuela E (1989) *J Biol Chem* **261**: 9107-9110
53. Day INM, Thompson RJ (1987) *FEBS Lett* **210**: 157-160
54. Wilkinson KD, Lee K, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J (1989) *Science* **246**: 670-673
55. Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD (1990) *J Pathol* **161**: 153-160
56. Kanayama H, Tamura T, Ugai S, Kagawa S, Tanahashi N, Yoshimura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) *Eur J Biochem* **206**: 567-578
57. Armon T, Ganoth D, Hershko A (1990) *J Biol Chem* **265**: 20723-20726
58. Hough R, Pratt G, Rechsteiner M (1986) *J Biol Chem* **261**: 2400-2408
59. Rivett AJ, Skilton HE, Rowe AJ, Eperon IC, Sweeney S (1991) *Biomed Biochim Acta* **50**: 447-450
60. Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7751-7755
61. Driscoll J, Goldberg AL (1990) *J Biol Chem* **265**: 4789-4792
62. Castano JG, Ornberg R, Koster JG, Tobian JA, Zasloff M (1986) *Cell* **46**: 377-387
63. Driscoll J, Goldberg AL (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 787-791
64. Sorimachi H, Kawasaki H, Tsukahara T, Ishiura S, Emori Y, Sugita H, Suzuki K (1991) *Biomed Biochim Acta* **50**: 459-464
65. Okaynak E, Finley D, Varshavsky A (1984) *Nature (Lond)* **312**: 663-666

Degradacja cyklin jako niezbędny element regulacyjny cyklu komórkowego

Cyclin degradation as indispensable regulatory element of the cell cycle

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Spis treści:

- I. Cykliny, ich budowa i klasyfikacja
- II. Degradacja cyklin przy udziale układu ubikwitinowego
- III. Udział kinaz i fosfataz w regulacji degradacji cyklin
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Cyclins, their structure and classification
- II. Cyclin degradation as mediated by ubiquitin system
- III. Participation of kinases and phosphatases in the regulation of cyclin degradation
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: A — alanina; R — arginina; N — asparagina; D — kwas asparaginowy; G — glicyna; E — kwas glutaminowy; Q — glutamina; F — fenyloalanina; I — izoleucyna; L — leucyna; P — prolina; K — lizyna; S — seryna; T — treonina; V — walina; W — tryptofan; Y — tyrozyna; X — aminokwas nieznan lub inny

Cykliny, pierwotnie zidentyfikowane jako białka nagromadzające się periodycznie podczas interfazy i ulegające rozkładowi pod koniec mitozy w zapłodnionych jajach morskich bezkręgowców [1], warunkują prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Stanowią bowiem niezbędną regulatorową podjednostkę kompleksów z kinazą serynowo-treoninową p34cdc2 oraz jej homologami, aktywnych w różnych fazach cyklu komórkowego. Wpływają także na aktywność

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

fosfatazy *cdc25* defosforylującej tyrozynę i treoninę w podjednostce katalitycznej (kinazie *p34cdc2*) kompleksu, dzięki czemu ujawnia się jego aktywność enzymatyczna. Zagadnienia te były już w ostatnich dwóch latach omawiane na łamach *Postępów Biochemii* [2, 3].

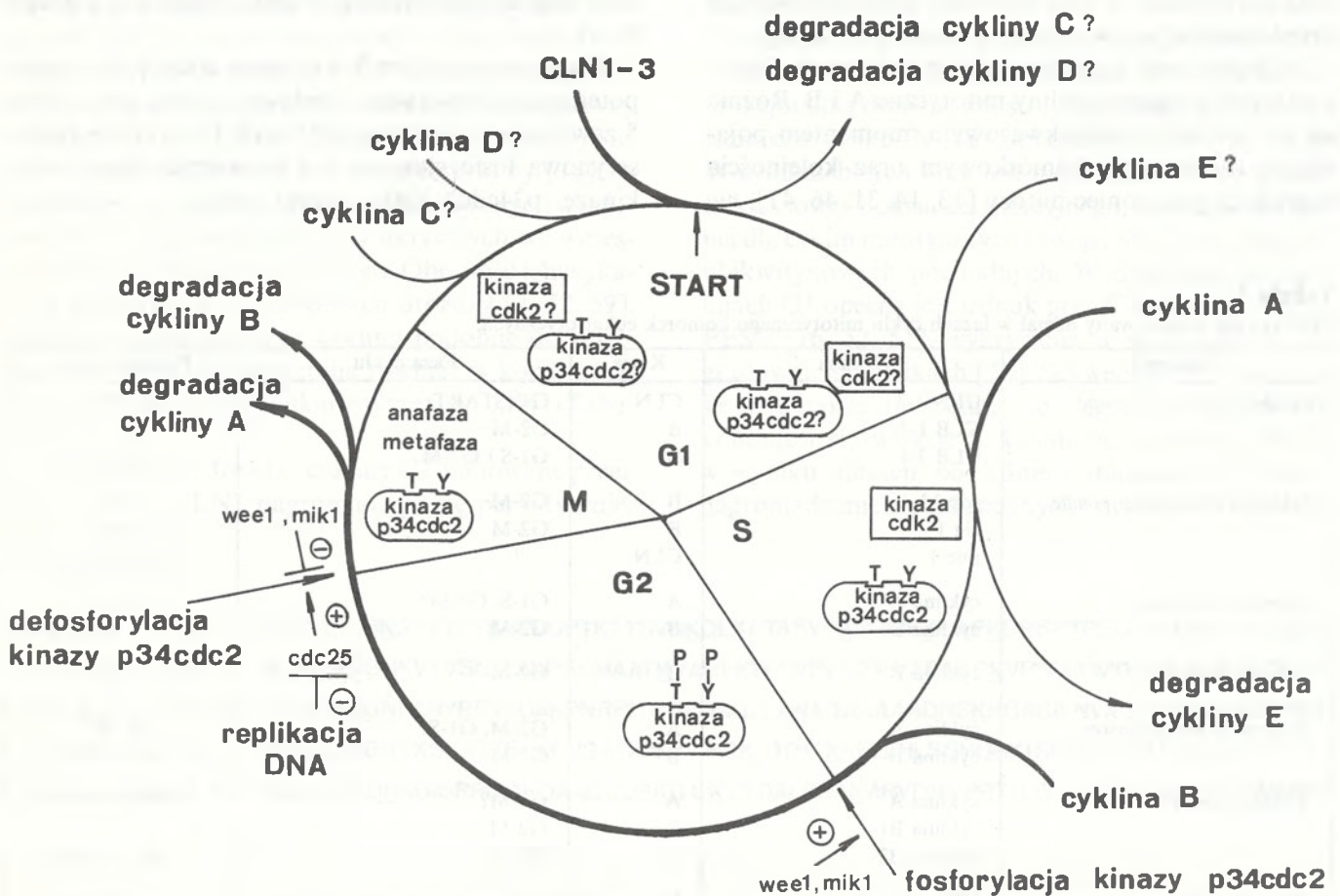
Ostatnio pojawia się coraz więcej informacji o nowo wykrywanych cyklinach. Mówi się nawet o „proliferaacji” danych o kolejnych cyklinach [4] lub nawet wręcz o ich „eksplozji populacyjnej” [5]. Zwiększa się też gwałtownie liczba poznanych kinaz białkowych, zwanych kinazami zależnymi od cyklin (kinaz *cdk*), których aktywność reguluje dołączanie cyklin [6]. Ponadto wykryto, że kinazy *cdk* — skompleksowane z innymi niż cyklina B cyklinami — nie tylko działają w różnych kluczowych etapach cyklu komórkowego (Ryc. 1), lecz także regulują, poprzez fosforylację, działanie białkowego produktu genu supresorowego *Rb*, czy też białka *p53* [7]. Cykliną okazał się także być produkt protoonkogenu *bcl-1* [8, 9], co wskazuje na znaczącą rolę cyklin również w przebiegu nowotworzenia. Znaczenie zaś cyklin w proliferacji komórek prawidłowych ilustrować może zbieżność braku ekspresji genów kodujących cykliny w starych fibroblas-

tach z niemożnością wystąpienia w nich syntezy DNA i rozpoczęcia mitozy [10]. Precyzyjna zatem regulacja poziomu poszczególnych cyklin w kolejnych fazach cyklu jest niezbędna dla jego prawidłowego przebiegu. Uzależnienie rozpoczęcia mitozy od syntezy cykliny B [11], a zakończenia mitozy od jej degradacji [12, 13], są tego najlepszym przykładem.

W artykule przedstawiono informacje na temat coraz lepiej poznawanej rodziny cyklin oraz na temat postulowanego mechanizmu degradacji cyklin przy udziale ubikwityny, procesu podlegającego regulacji poprzez skoordynowane działanie licznych kinaz i fosfataz.

I. Cykliny, ich budowa i klasyfikacja

Cykliny są białkami, których komórkowy poziom ulega wahaniom synchronicznym z przebiegiem cyklu komórkowego i poziomem aktywności kinazy *p34cdc2*. Zidentyfikowane początkowo tylko w dzielnących się jajach morskich bezkręgowców cykliny zostały następnie znalezione w komórkach niższych i wyższych organizmów eukariotycznych (piśmiennictwo np. w [14-16]). Uwzględniając podobieństwo sek-



Ryc. 1. Schemat cyklu komórkowego z zaznaczeniem przypuszczalnego udziału różnych cyklin i kinaz *cdk* w poszczególnych jego fazach (wg [6] zmodyfikowany).

Grubą linią zaznaczono udokumentowane etapy cyklu.

wee1 i *nim1* — geny kodujące kinazy białkowe „opóźniające” mitozę; *cdc25* — gen kodujący fosfatazę defosforylującą kinazę *p34cdc2* będącą w kompleksie z cykliną B i białkiem *p13*. Na schemacie wskazano podstawowe mechanizmy regulujące aktywność kinazy *p34cdc2*: w fazie G2 fosforylację podjednostki katalitycznej będącej w kompleksie z cykliną B oraz jej defosforylację na początku mitozy. Dokładne omówienie mechanizmów regulacyjnych związanych z funkcjonowaniem kinazy *p34cdc2* w cyklu komórkowym przedstawiono w poprzednim artykule [3].

wencji aminokwasowej tych białek ustalonej przede wszystkim na podstawie izolowanego cDNA, wyróżnia się obecnie co najmniej 6 podstawowych grup cyklin — A, B, CLN, C, D i E [5], z których cykliny określane jako A i B zostały najwcześniej poznane. Można też klasyfikować cykliny „funkcjonalnie”, uwzględniając ich udział w procesach zachodzących w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Byłyby to tzw. cykliny mitotyczne (cykliny A i B) oraz cykliny G1, czynne w tej właśnie fazie cyklu komórkowego (Tabela 1). Cykliny są białkami zbudowanymi z około 400 aminokwasów (m.c. 40-60 kDa), charakteryzującymi się wysokim stopniem konserwatywności sekwencji aminokwasów, szczególnie wyraźnym w obrębie domeny funkcjonalnej zwanej boksem cyklino- wym (*cyclin box*). Sekwencja ta składająca się z około 200 aminokwasów występuje w cząsteczce wszystkich przebadanych cyklin. Występują w niej także amino- kwasy kwalifikujące je do poszczególnych grup. Przy- puszcza się, że sekwencja ta ma znaczenie funkcjonalne i uczestniczy w wiązaniu cyklin z kinazami cdk, a jej obecność w cząsteczce białka jest niezbędna, aby dane białko można było zaliczyć do grupy cyklin [15]. Usytuowanie boks cyklino- wego w różnych cyklinach oraz porównanie w nim sekwencji aminokwasowych przedstawiane jest w szeregu pracach [5, 15, 16].

Najlepiej pod względem strukturalnym (i funk- cjonalnym) poznano cykliny mitotyczne A i B. Różnią się one składem aminokwasowym, momentem poja- wiania się w cyklu komórkowym oraz kolejnością degradacji pod koniec mitozy [13, 14, 31, 46, 47], nie

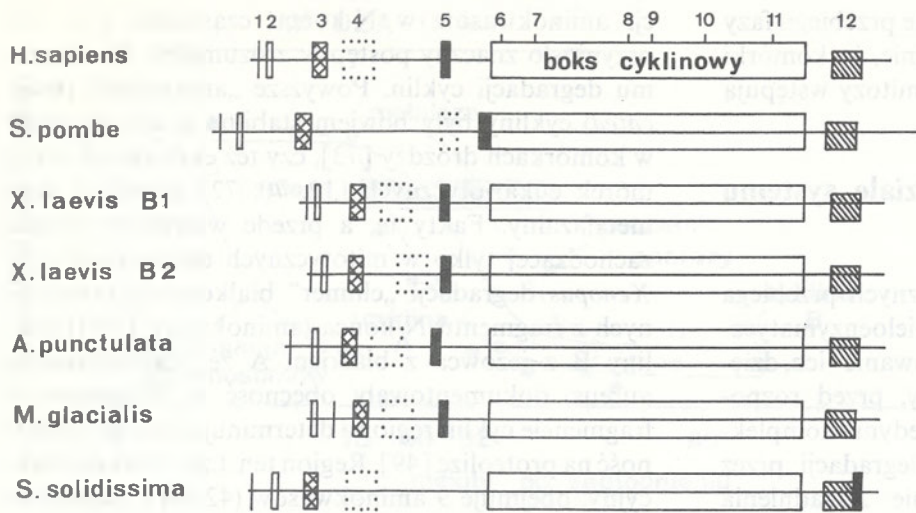
wykazując przy tym specyficzności gatunkowej w in- dukowaniu mitozy [26]. Analiza strukturalna cyklin mitotycznych pozwoliła na wyróżnienie w ich cząstecz- kach innych, oprócz boks cyklino- wego, konserwaty- wnych sekwencji aminokwasowych występujących za- równo przy N- jak i C-końcu polipeptydu [16]. Schematyczne usytuowanie 12 homologicznych regio- nów w cząsteczce cyklin B różnych organizmów przed- stawiono na rycinie 2. Centralną pozycję w łańcuchu (regiony 6-11) zajmuje boks cyklino- wy. Wśród homo- logicznych regionów, leżących na N-końcu łańcucha polipeptydowego (Ryc. 2) szczególnie istotne są regio- ny 3 i 4. Region 3 w cząsteczce cykliny nosi nazwę boks destrukcyjnego (*destruction box*) i zawiera mo- tywy RXXL oraz leżący w bezpośredniej jego bliskości (w odległości 2-4 aminokwasów) motyw XXN [16, 48]. Obecność boks destrukcyjnego jest, jak wykazano [49], niezbędna do proteolitycznej degradacji cyklin przy udziale układu ubikwitynowego. Region 4 nato- miast zawiera pozytywnie naładowane aminokwasy, w tym liczne reszty lizynowe. Postuluje się, że uczest- niczy on w wiązaniu ubikwityny z cząsteczką cykliny (patrz r. II). Na rycinie 3 przedstawiono przykłady sekwencji aminokwasowych w boksie destrukcyjnym oraz miejsc ubikwitynacji w kilku cyklinach z grupy B i A.

W cząsteczce cyklin B występuje także kilka miejsc potencjalnej fosforylacji. Jednym z nich jest region 5 zawierający sekwencję SPXXE/D, w której reszta serynowa fosforylowana jest prawdopodobnie przez kinazę p34cdc2 [50]. Drugi region o sekwencji

Tabela 1.

Cykliny i ich postulowany udział w fazach cyklu mitotycznego komórek eukariotycznych.

Gatunek	Cyklina	Klasa	Faza cyklu	Piśmiennictwo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLN 1-3	CLN	G1 (START)	17-19
	CLB 1-2	B	G2-M	20, 21
	CLB 3-4	B	G1-S i G2-M	21,22
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	cdc 13	B	G2-M	23
	cig 1	B	G2-M	24
	puc 1	CLN	?	5, 25
<i>Spisula solidissima</i>	cyklina A	A	G1-S, G2-M?	1, 26, 27
	cyklina B	B	G2-M	
<i>Arbacia punctulata</i>	cyklina B	B	G2-M	1, 28
<i>Drosophila melanogaster</i>	cyklina A	A	G2-M, G1-S?	29, 30
	cyklina B	B	G2-M	
<i>Xenopus laevis</i>	cyklina A	A	G2-M?	13, 31-33
	cyklina B1	B	G2-M	
	cyklina B2	B	G2-M	
<i>Mus musculus</i>	CYL 1-3	D	G1?	34
<i>Homo sapiens</i>	cyklina A	A	G1-S, G2-M?	35, 36
	cyklina B1	B	G2-M	37
	cyklina B2	B	G2-M	
	cyklina C	C	?	38, 39
	cyklina D	D	?	8, 39-43
	cyklina E	E	G1 lub G1-S	44, 45



Ryc. 2. Schemat usytuowania 12 homologicznych regionów w cząsteczce cyklin B różnych gatunków [15]. Długość linii poziomej obrazuje wielkość cząsteczki. Region 3 oznacza boks destrukcyjny.

FLRRXSK występuje w obrębie boks cyklinowego. Sekwencja ta stanowi charakterystyczne miejsce fosforylacji dokonywanej przez kinazę zależną od cAMP [39, 51]. Innymi miejscami potencjalnych fosforylacji mogą być tyrozyna w regionie 9 i seryna w regionie 11 znajdujące się w boksie cyklinowym oraz tyrozyna w regionie 12. Badania hydrofilności aminokwasów tworzących polipeptyd cyklinowy pozwoliły na wnioskowanie o możliwym ułożeniu C-końca peptydu w bezpośredniej bliskości sekwencji RXXL w boksie destrukcyjnym i seryny w regionie 11. W sferze hipotez pozostaje natomiast sugestia, czy ufosforylowanie seryny w regionie 5 i tyrozyny w regionie 12 mogłoby wpływać na wiązanie ubikwityny z cząsteczką cykliny [16].

Znacznie mniej niż o cyklinach mitotycznych wiadomo jest o strukturze cyklin G1 aktywnych we wczesnych fazach cyklu komórkowego. Obecność ich wykazano początkowo w komórkach drożdży [4, 52, 59], obecnie przyjmuje się, że cykliny podobne do drożdżowych cyklin G1 występują również w komórkach wyższych organizmów eukariotycznych [4, 54] (Tabela 1).

W komórkach drożdży cykliny G1 kodowane przez geny CLN1 i CLN2 nagromadzają się periodycznie,

tak jak cykliny mitotyczne, przy czym maksimum ich akumulacji przypada pod koniec fazy G1, a potem rozpoczyna się ich degradacja zakończona w połowie fazy S. Natomiast poziom cykliny kodowanej przez gen CLN3 pozostaje niezmienny we wszystkich fazach cyklu [53]. Specyficzna aktywacja tylko genów CLN1 i CLN2 przez czynniki transkrypcyjne SW14 i SW6 wydaje się mieć związek z powyższymi obserwacjami [55, 56].

W cząsteczce cyklin kodowanych przez geny CLN, podobnie jak w cyklinach mitotycznych wyróżnia się funkcjonalną domenę boks cyklinowego usytuowaną jednakże blisko N-, a nie C-końca peptydu [52]. W cyklinach tych brak jest natomiast sekwencji aminokwasowej boks destrukcyjnego, charakterystycznej dla cyklin mitotycznych i związanej z proteolizą ich ubikwitynowych pochodnych. W drożdżowych cyklinach G1 obecna jest jednak przy C-końcu sekwencja PEST [16, 52, 57], wykrywana w wielu szybko degradowanych białkach [58]. Sekwencja PEST wydaje się być także niezbędna do degradacji cyklin G1 kończącej się w fazie S. Usunięcie sekwencji PEST, w wyniku mutacji, powoduje stabilizację i w efekcie nagromadzanie się „skróconych” cyklin G1. Konsek-

Cykliny B

H.sapiens	B2	<u>RTVLEEIGNRVTTTRTKVPVQPTKT</u> TNVNKQLKPTASVPKVQMEKLAPKGPSPTPEDVSMKEENLCQAF
R.papiens	B2	<u>RAALGEIGNKVTV</u> NAVAKPSKMAATKVANVKT KHPV KPVVAEAAKVPSPVPM DVS LKEEELCQAF
S.pombe	cdc13	<u>RKALGDIGNLANV</u> RGVVD AKPNRPITRSF GAQLLANAQAAAAADNSKRQACA NVAGPP AVANEGVAVA
S.solidissima	B	<u>RNTLGDIGNTKSKAT</u> TSLKQVSAITISDV PRK DP I I <u>KKEI</u> VHLSSHQHKI SLAE ESH I <u>PKQEAFTFL</u>
D.melanogaster	B	<u>RAALGDLONRGI</u> SRPIAAKDAAQKDSKD LK LTDALRNAKARVDNVPRTILGNVT NNANI LQEISMNRK

Cykliny A

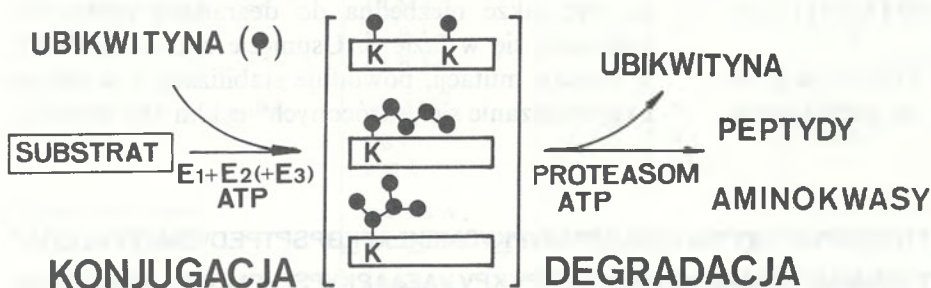
H.sapiens		<u>RAALAVLKS</u> GNPRGLAQQRPKTRRVAPLK DL PVNDEHVTVP W KANSKQAF FTIA HVDEAEKEAQKKP
S.solidissima		<u>RAALGVITN</u> QVNQQVRIQPSRAAKPKSSEFNIQDENAF TK KNAKTFGQQPSQFSVFDPTPAAPVQKA
D.melanogaster		<u>RSILGVI</u> OSSDISVGTETGVSPTRV KEL PPRNDQRFL EVV QYQMDILEYFRESEKKH RP KPRYMRR

Ryc. 3. Porównanie sekwencji aminokwasowych w boksie destrukcyjnym oraz przyległym regionie w cyklinach klasy A i B z różnych organizmów (wg [49] zmodyfikowany). Podkreślono sekwencje aminokwasowe tworzące boks destrukcyjny oraz reszty lizynowe będące miejscami potencjalnej ubikwitynacji.

wencją tego jest znaczne przyspieszenie przebiegu fazy G1 (czyli jej skrócenie) i spowodowanie, że komórki niemal bezpośrednio do ukończeniu mitozy wstępują w fazę S [52].

II. Degradacja cyklin przy udziale systemu ubikwitynowego

Szybka degradacja cyklin mitotycznych przebiega najprawdopodobniej przy udziale wieloenzymatycznego układu powodującego „wyznakowanie” ich, dzięki dołączeniu cząsteczek ubikwityny, przed rozpoczęciem proteolizy. Przyjmuje się, że jedynie kompleksy cyklin z ubikwityną podlegają degradacji przez proteazy zawarte w tzw. proteasomie. Zagadnienia dotyczące biosyntezy samej ubikwityny i jej udziału w przeprowadzanych przez układ kilku enzymów modyfikacjach posttranslacyjnych i degradacji szeregu białek są stosunkowo dobrze poznane [59-67]. Podkreślana jest konieczność aktywacji samej cząsteczki ubikwityny w procesie zachodzącym na koszt energii pochodzącej z hydrolizy ATP i udział odrębnych enzymów (białek) w przenoszeniu cząsteczek ubikwityny na białkowy substrat i w dołączaniu do niego cząsteczek ubikwityny. W bardzo dużym uproszczeniu proces ten przedstawia rycina 4. Należy jednak zaznaczyć, że sama tylko obecność kompleksów białek z ubikwityną nie świadczy o tym, że związana w kompleksie ubikwityna promuje degradację danego białka. Obecności kompleksów musi towarzyszyć wykazanie, że są one szybko degradowane. Opublikowane w 1991 r. wyniki wskazują, że w przypadku cyklin warunki te są w zasadzie spełnione [49, 68].



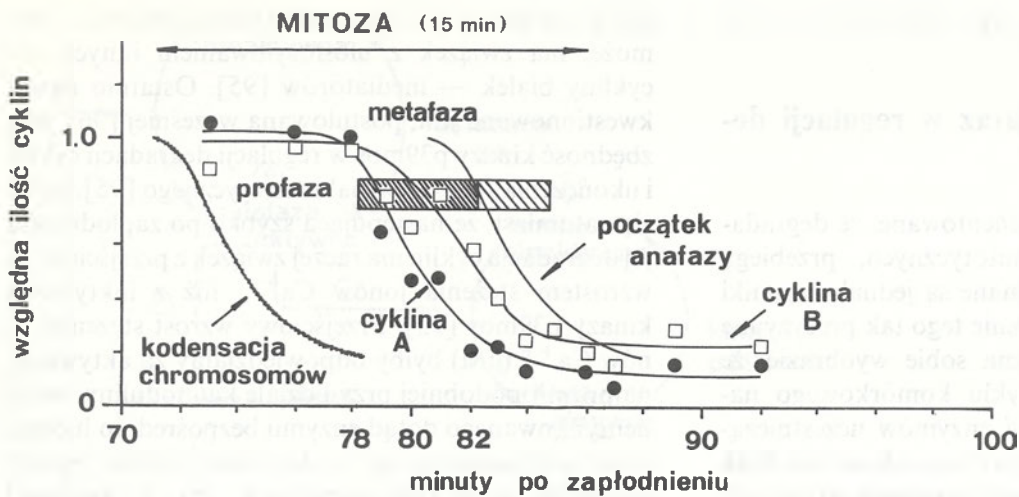
Ryc. 4. Schemat proteolizy białka przebiegającej z wytworzeniem różnego typu kompleksów z ubikwityną (wg [6] zmodyfikowany). E1 — enzym aktywujący ubikwitynę; E2 — enzym(y) przenoszący zaktywowaną ubikwitynę na resztę lizynową (K) w białku; E3 — enzym(y) rozpoznający sekwencje sygnałne w białku mającym ulec degradacji. Dokładne omówienie poszczególnych enzymów i etapów proteolizy zachodzącej przy udziale systemu ubikwitynowego przedstawiono w artykule Piotrowskiej [67].

Badania mechanizmu degradacji cyklin mitotycznych w bezkomórkowych ekstraktach z embrionów małży *Spisula solidissima* [69] wskazały, między innymi, na ścisłą zależność procesu rozkładu cyklin od obecności ATP, co sugerowało, że mogą być one degradowane w szlaku metabolicznym z utworzeniem pochodnych ubikwitynowych. Użycie do badań zmutowanych, pozbawionych określonych sekwencji aminokwasowych cyklin A [69-71] i cyklin B [12, 49, 69, 70], czy też homologów cyklin B o nietypowej sekwencji

aminokwasów w N-końcu cząsteczki [72, 73] przyniosło znaczny postęp w zrozumieniu mechanizmu degradacji cyklin. Powyższe „anormalne” (*truncated*) cykliny były bowiem stabilne, a ich obecność w komórkach drożdży [73], czy też ekstraktach z komórek eukariotycznych [12, 70, 72] utrzymywała stan metafazalny. Fakty te, a przede wszystkim wyniki zachodzącej tylko w mitotycznych ekstraktach z jaj *Xenopus* degradacji „chimer” białkowych, utworzonych z fragmentu N-końca (aminokwasy 13-91) cykliny B z jeżowca z białkiem A ze *Staphylococcus aureus*, dokumentowały obecność w N-końcowym fragmencie cyklin regionu determinującego ich podatność na proteolizę [49]. Region ten, t.zw. boks destrukcyjny, obejmuje 9 aminokwasów (42-50) i znaleziony został w cyklinach z różnych komórek eukariotycznych. Obecność argininy w pozycji 42 boks destrukcyjnego wydaje się być szczególnie istotna, gdyż zastąpienie jej przez cysteinę, powoduje brak degradacji cykliny zawierającej tak zmieniony fragment (jak również chimery z białkiem A) przez mitotyczne ekstrakty z *Xenopus* [49]. Czy różnice aminokwasowe w pozycji 47 (walina w cyklinie A, asparagina, asparaginian lub kwas glutaminowy w cyklinie B) można wiązać z subtelną różnicą momentu rozpoczęcia ich degradacji [74] (Ryc. 5) pozostaje jeszcze jedynie spekulacją. Postuluje się, że sekwencja aminokwasów w boksie destrukcyjnym może być rozpoznawana przez enzym E3, współdziałający z enzymem E2 w przenoszeniu i łączeniu ubikwityny z resztami lizynowymi cyklin (Ryc. 6), szczególnie licznymi w regionie położonym C-terminalnie w stosunku do boks destrukcyjnego. Jak dotąd nie zidentyfikowano białek specyficznie

rozpoznających boks destrukcyjny cyklin oraz przeprowadzających ich ubikwitylację. Można jednak przypuszczać, że mechanizm ubikwitynacji cyklin jest analogiczny do ubikwitynacji innych białkowych substratów, których stabilność zależy od rodzaju N-końcowego aminokwasu [75].

Niemniej jednak uzyskano eksperymentalne potwierdzenie powstawania kompleksów cyklin z ubikwityną. Uwidaczniały się one jako prążki o różnej ruchliwości podczas elektroforezy (i różnej radioak-



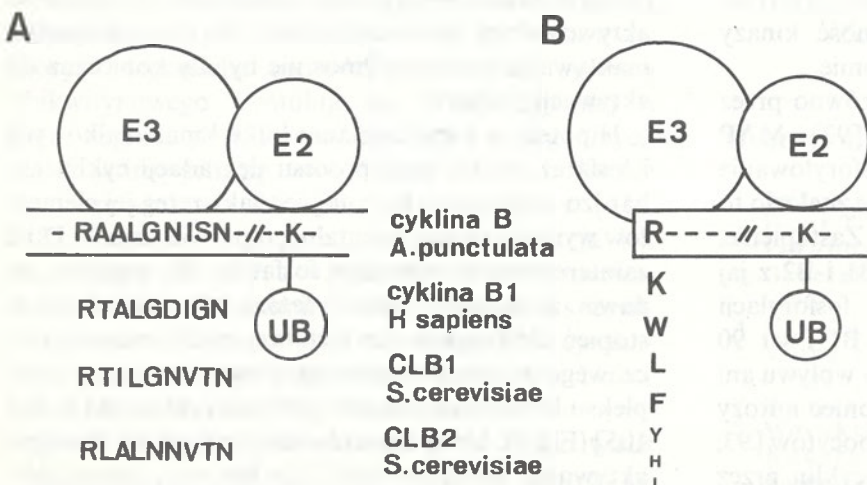
Ryc. 5. Schemat przedstawiający zmiany względnego poziomu cyklin A i B w zapłodnionych oocytach małża *Spisula solidissima* w poszczególnych fazach mitozy (wg [74] zmodyfikowany). Zakreskowany prostokąt oznacza okres niestabilności cyklin o różnym natężeniu trwający ± 7 min; czas trwania mitozy 15-16 min.

tywności, jeśli użyto wyznakowanej ^{125}J -ubikwityny), których ilość zmniejszała się wraz z postępującą degradacją cyklin [49]. Kompleksy cyklin z ubikwityną tworzyły się również, gdy badania prowadzono przy użyciu ekstraktów interfazalnych, jednakże ilość kompleksów była dziesięciokrotnie mniejsza niż przy użyciu ekstraktów mitotycznych. Gdy zamiast cykliny B użyto jej argininowego analogu, nie ulegającego degradacji, lub chimerę analogu z białkiem A, powstawała tylko niewielka ilość nieskończasteczkowych kompleksów, nie powstawały zaś formy wysokocząsteczkowe z kilkoma cząsteczkami ubikwityny. Przemawia to za tym, że multiubikwitynacja cyklin jest niezbędna do jej degradacji. Potwierdzenie tej sugestii uzyskano w badaniach z użyciem metyloubikwityny, która wiąże się z białkowymi substratami i uniemożliwia powstawanie łańcuchów poliubikwitynowych [68]. Zastosowanie metyloubikwityny zamiast ubikwityny hamowało degradację cyklin A i B, co wyraźnie wskazywało, że poliubikwitynacja białka okazała się niezbędna dla jego degradacji.

Mechanizm degradacji cyklin fazy G1 nie został jeszcze wykryty i nie wiadomo, czy uczestniczy w nim ubikwityna. Pewne dane wskazują jednakże na udział ubikwityny w kontroli przejścia komórek z fazy G1

w fazę S, chociaż jakie białka ulegają wówczas ubikwitynacji pozostaje jeszcze zagadką. Wykazano bowiem, że mutanty w których nastąpiła inaktywacja niektórych enzymów szlaku proteolitycznego przebiegającego z wykorzystaniem ubikwityny zatrzymują się we wczesnych stadiach cyklu komórkowego. Dotyczy to mutacji genu kodującego enzym aktywujący ubikwitynę (E1) w komórkach mysich [76, 77] i chemicznych [78] oraz mutacji drożdżowego genu CDC34 kodującego enzym E2 przenoszący zaktywowaną ubikwitynę na właściwy substrat [79]. Wyraźne podwyższenie w komórkach nowotworu skóry myszy ekspresji genów kodujących ubikwitynę [80], a także wykazanie, że enzym E1 aktywujący ubikwitynę jest białkiem jądrowym [81], związanym z chromosomami w czasie mitozy [82], przemawiają za znaczącą rolą układu ubikwitynowego w przebiegu cyklu komórkowego.

Niewiele jest jeszcze danych o losach kompleksów cyklin-ubikwityna. Postuluje się, że proteolizy cyklin, w procesie zależnym od ATP, dokonują proteazy 26S proteasomu [83-85], wielocząsteczkowego kompleksu enzymatycznego charakteryzującego się szerokim spektrum aktywności [86]. Znaczący wzrost aktywności proteasomu w metafazie, lecz również i w profazie mitozy w komórkach embrionów żachwy *Halocynthia*



Ryc. 6. Hipotetyczne mechanizmy „rozpoznawania” przez enzymy systemu ubikwitynowego białek mających ulec degradacji (wg [6] zmodyfikowany)
 A) rozpoznawanie boku cyklinowego w cyklinach B B) rozpoznawanie N-końcowego aminokwasu w białku; malejąca wielkość liter symbolizuje stopień powinowactwa do E3
 E2 — enzym(y) przenoszący zaktywowaną ubikwitynę na resztę lizynową (K) w białku; E3 — enzym rozpoznający sekwencje sygnałowe w białku mającym ulec degradacji i ułatwiający jego kontakt z E2 i ubikwityną (UB)

roretzi [87], przemawia za jego udziałem w ściśle określonych etapach cyklu.

III. Udział kinaz i fosfataz w regulacji degradacji cyklin.

Obecnie wydaje się udokumentowane, że degradacja cyklin, przynajmniej mitotycznych, przebiega z udziałem ubikwityny. Nieznane są jednak czynniki odpowiedzialne za uruchomienie tego tak precyzyjnie regulowanego procesu. Można sobie wyobrazić, że w określonym momencie cyklu komórkowego następuje gwałtowna aktywacja enzymów uczestniczących w wiązaniu cyklin z ubikwityną. Jak narazie brak jest jednak doświadczalnego potwierdzenia tej sugestii. Bardziej prawdopodobne jest przypuszczenie, że bezpośrednio przed degradacją może zajść modyfikacja cząsteczki samej cykliny zwiększająca jej powinowactwo do enzymów przenoszących ubikwitynę. Nie można też wykluczyć wzrostu aktywności enzymów proteolitycznych degradujących cykliny.

Co najmniej dwie kinazy białkowe wydają się być zaangażowane w kontrolę degradacji cyklin. Jedną z nich jest kinaza p34cdc2 w aktywnym enzymatycznie kompleksie z cykliną B, która dodana do ekstraktów z jaj *Xenopus* wywołuje w nich już po upływie 15 min degradację cyklin [88]. Ten sam przyspieszający efekt na przebieg degradacji cyklin A i B wywiera także sama cyklina B, która aktywuje obecną w ekstraktach kinazę p34cdc2 [49]. W odróżnieniu od cykliny B ani cyklina A ani też jej aktywny enzymatycznie kompleks z kinazą p34cdc2 nie wywołują w ekstraktach jaj *Xenopus* rozpoczęcia degradacji cykliny B, a nawet ją opóźniają [89]. Może to stanowić pewnego rodzaju zabezpieczenie przed wystąpieniem przedwczesnej inaktywacji kompleksu kinazowego p34cdc2-cyklina B zanim nastąpi zakończenie kondensacji chromosomów i utworzenie wrzeciona mitotycznego.

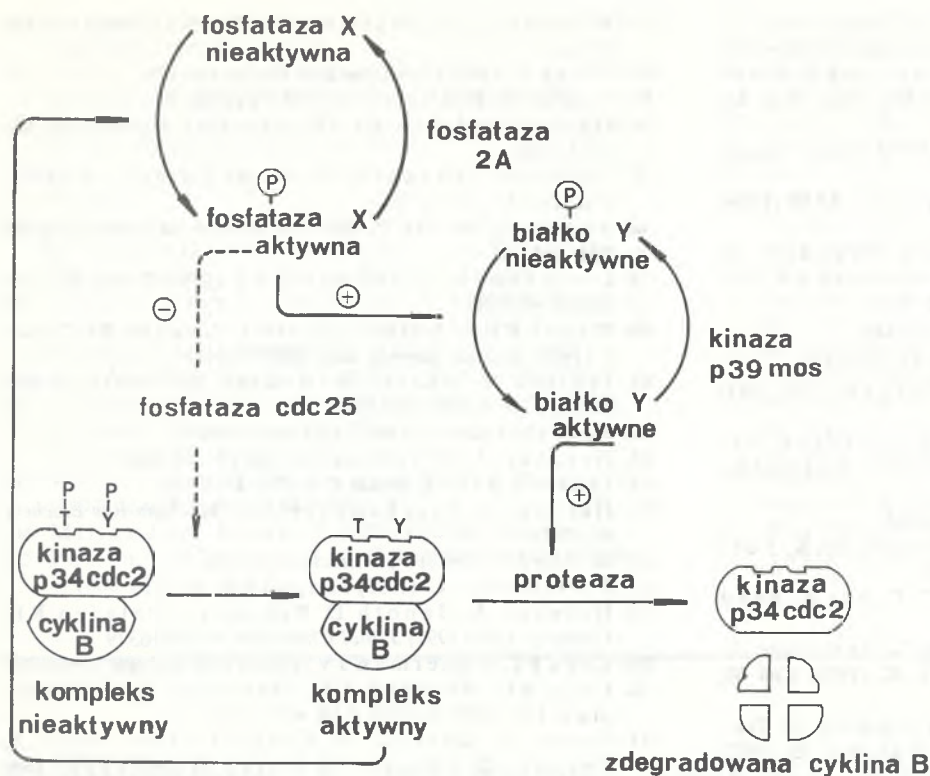
Drugą kinazę czynną w kontroli degradacji cyklin jest kinaza białkowa p39mos kodowana przez proto-onkogen *c-mos*, która u kręgowców wchodzi w skład czynnika cytostatycznego CSF, odpowiedzialnego za zatrzymanie jaj *Xenopus* w metafazie II-ego podziału mejotycznego [90]. W takich komórkach cykliny są stabilne [91] pomimo tego, że aktywność kinazy p34cdc2 utrzymuje się na wysokim poziomie.

Ponieważ cykliny są fosforylowane zarówno przez kinazę p34cdc2 [89] jak i kinazy p39mos [92] i MAP [93, 94] można było przypuszczać, że ufosforylowanie cyklin czyni je opornymi na proteolizę. Nie znalazło to jednak potwierdzenia doświadczalnego. Zastąpienie, w wyniku mutacji, w cząsteczce cyklin B1 i B2 z jaj *Xenopus* reszt serynowych ulegających fosforylacji (odpowiednio ser 94 lub 96 w cyklinie B1 i ser 90 w cyklinie B2) przez alaninę nie wywierało wpływu ani na efektywność degradacji cyklin pod koniec mitozy ani też na indukcję mitozy i dojrzewanie oocytów [93, 94]. Tak więc uruchomienie degradacji cyklin przez

powyższe kinazy wydaje się być bardzo złożone, i być może, ma związek z ufosforylowaniem innych niż cykliny białek — mediatorów [95]. Ostatnio nawet kwestionowana jest, postulowana wcześniej [96], niezbędność kinazy p39mos w regulacji degradacji cyklin i ukończenia II-ego podziału mejotycznego [95]. Sądzi się natomiast, że następująca szybko po zapłodnieniu jaj degradacja cyklin ma raczej związek z przejściowym wzrostem stężenia jonów Ca^{++} , niż z inaktywacją kinazy p39mos [95]. Przejściowy wzrost stężenia jonów Ca^{++} (μM) byłby odpowiedzialny za aktywację, najprawdopodobniej przy udziale kalmoduliny, niezidentyfikowanego dotąd enzymu bezpośrednio lub pośrednio uczestniczącego w degradacji cyklin. Należy zauważyć, że w tych warunkach, tzn. w obecności $\mu molowych$ stężeń jonów Ca^{++} kinaza p39mos pozostaje aktywna.

Szereg danych doświadczalnych przemawia za obecnością w komórkach eukariotycznych białkowych mediatorów (pośredników), które w zależności od stopnia swego ufosforylowania regulują aktywność proteaz degradujących cykliny. Dane te uzyskano [97-100] w badaniach z zastosowaniem kwasu okadejowego, inhibitora fosfataz typu 1 i 2A [101, 102]. Wynika z nich, że specyficzne zahamowanie przez kwas okadejowy fosfatazy 2A jest wystarczające do uruchomienia w ekstraktach metafazalnych jaj *Xenopus* degradacji cyklin [99]. Zaproponowano hipotetyczny udział kinaz p34cdc2 i kinazy p35mos oraz niezidentyfikowanych dotąd fosfataz w aktywacji proteaz degradujących cykliny (Ryc. 7). Przedstawiony schemat opiera się na założeniu, że aktywność proteazy degradującej cykliny regulowana jest przez hipotetyczne białko Y, aktywne w postaci zdefosforylowanej, nieaktywne po ufosforylowaniu przez kinazę p39mos. Jego defosforylację, a tym samym aktywację, przeprowadzać miałby hipotetyczna fosfataza X, której stopień ufosforylowania zależy od aktywności kinazy p34cdc2-cyklina B. Rolą fosfatazy 2A miałyby więc być utrzymanie równowagi pomiędzy ufosforylowaną (aktywną) i nieufosforylowaną (nieaktywną) formą fosfatazy X. Zahamowanie fosfatazy 2A przez kwas okadejowy wywoływać ma wzrost poziomu aktywnej formy fosfatazy X uczynniającej białko Y, które z kolei aktywowałoby proteazę cyklin. W tym przypadku inaktywacja kinazy p39mos nie byłaby konieczna do aktywacji proteazy.

Hipoteza o współdziałaniu kilku kinaz białkowych i fosfataz w aktywacji procesu degradacji cyklin jest bardzo atrakcyjna, niemniej jednak szereg jej elementów wymaga eksperymentalnego potwierdzenia. Duże zainteresowanie wzbudza fosfataza X, sugeruje się nawet, że może być ona fosfatazą odpowiedzialną za stopień ufosforylowania fosfatazy cdc25, enzymu kluczowego w uaktywnieniu na początku mitozy kompleksu kinazowego kinaza p34cdc2-cyklina B [3, 103, 105] (Fig. 7). Udokumentowanie, że w jajach *Xenopus* aktywność fosfatazy cdc25 jest bezpośrednio regulowa-



Ryc. 7. Hipotetyczny mechanizm współdziałania kinaz i fosfataz w regulacji aktywności proteaz degradujących cykliny (wg [95, 103] zmodyfikowany). Szczegółowy opis w tekście.

wana przez zmiany jej stopnia ufosforylowania [106] czyni przypuszczenie o roli fosfatazy X w regulacji aktywności cdc25 bardziej prawdopodobnym. Co więcej, postulowany jest udział aż trzech ostatnio wykrytych fosfataz tyrozynowych, w inicjacji mitozy w komórkach drożdży *S. pombe* [107, 108].

IV. Uwagi końcowe

Precyzyjnie regulowana degradacja cyklin mitotycznych wywołuje pod koniec mitozy rozpad, aktywnego enzymatycznie do tego momentu, kompleksu kinazy p34cdc2 i cykliny, w którym ufosforylowana jest nadal treonina w pozycji 161 podjednostki kinazowej [109]. Degradacja cyklin jest niezbędna do wystąpienia defosforylacji tego aminokwasu, będącej etapem wywołującym w anafazie cytkowity zanik aktywności kinazowej i dalszy prawidłowy przebieg cyklu [110].

Należy sobie zdawać sprawę, że cykliny nie są jedynymi istotnymi białkami w cyklu komórkowym, których degradacja zachodzi przy udziale systemu ubikwitynowego. Postuluje się, że przynajmniej *in vitro*, degradacji takiej podlega także szereg innych białek jądrowych, np. *myc*, *fos*, p53, E1A, będących często produktami działania protoonkogenów [111, 112]. Przemawia za tym wyraźna stymulacja ich proteolizy przez ATP, a przede wszystkim zahamowanie proteolizy po wyeliminowaniu (działaniem specyficznego przeciwciała) aktywności enzymu E1 aktywującego ubikwitynę. W promowaniu degradacji białka p53 (a więc inaktywacji tego supresora nowotworu) ma swój udział białko E6 kodowane przez ludzki wirus brodawczaka (*papilloma*). Przypuszcza się, że po zwią-

zaniu z białkiem E6 następują zmiany konformacyjne w białku p53 wywołujące, być może, odsłonięcie w nim domen rozpoznawanych przez właściwe eżymy proteolityczne [112]. Czy w degradacji powyższych białek uczestniczy proteasom 26S nie zostało dotychczas stwierdzone. Wiadomo natomiast, że proteasom 26S przeprowadza proteolizę dekarboksylazy ornitynowej [113], kluczowego enzymu w biosyntezie poliamin, odznaczającego się bardzo krótkim okresem półtrwania. Przynajmniej w komórkach ssaków enzym ten nie jest ubikwitynowany [114, 115], charakteryzuje go natomiast obecność sekwencji PEST. Przytoczone przykłady uzmysławiają ogromną złożoność procesów decydujących o momencie wystąpienia i mechanizmach zaangażowanych w degradacji krótko żyjących białek. Wskazują zarazem jak wiele jest jeszcze niewiadomych.

Artykuł otrzymano 19 stycznia 1993 r.
Zaakceptowano do druku 29 stycznia 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) *Cell* 33: 389-396
2. Jakubowicz T (1991) *Post Biochem* 37: 9-18
3. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* 38: 98-107
4. Lew DJ, Reed SI (1992) *Trends Cell Biol* 2: 77-81
5. Xiong Y, Beach D (1991) *Current Biol* 2: 362-364
6. Pines J, Hunter T (1991) *Trends Cell Biol* 1: 117-121
7. Hunter T, Pines J (1991) *Cell* 66: 1071-1074
8. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A (1991) *Nature* (Lond) 350: 512-515

9. Whithers DA, Harvey RC, Faust JB, Melnyk O, Carey K, Mekker TC (1991) *Mol Cell Biol* 11: 4846-4853
10. Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11012-11016
11. Murray AW, Kirschner MW (1989) *Nature* (Lond) 339: 275-280
12. Murray AW, Solomon MJ, Kirschner MW (1989) *Nature* (Lond) 339: 280-286
13. Minshull J, Pines J, Golsteyn R, Standart N, Mackie S, Colman A, Blow J, Ruderman JV, Wu M, Hunt T (1989) *J Cell Sci Suppl* 12: 77-97
14. Pines J, Hunter T (1989) *Cell* 58: 833-846
15. Draetta G (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 378-383
16. Nugent JHA, Alfa CE, Young T, Hyams JS (1991) *J Cell Sci* 99: 669-674
17. Hadwiger JA, Wittenberg C, Richardson HE, de Barros Lopes M, Reed SJ (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6255-6259
18. Cross F (1988) *Mol Cell Biol* 8: 4675-4684
19. Nash R, Tokiwa G, Annand S, Erickson K, Futcher AB (1988) *EMBO J* 7: 4335-4346
20. Richardson HE, Wittenberg C, Cross F, Reed SI (1989) *Cell* 59: 1127-1133
21. Surana U, Robitsch H, Price C, Schuster T, Fitch I, Futcher AB, Nasmyth K (1991) *Cell* 65: 145-161
22. Fitch I, Dahman C, Surana U, Amon A, Nasmyth K, Goetsch L, Byers B, Futcher B (1992) *Mol Biol Cell* 3: 805-818
23. Nurse P (1990) *Nature* (Lond) 344, 503-508
24. Bueno A, Richardson HE, Reed SI, Russel P (1991) *Cell* 66: 149-159
25. Forsburg SL, Nurse P (1991) *Nature* (Lond) 351: 245-248
26. Westendorf JM, Swenson KI, Ruderman JV (1989) *J Cell Biol* 108: 1431-1444
27. Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV (1986) *Cell* 47: 861-870
28. Pines J, Hunt T (1987) *EMBO J* 6: 2987-2995
29. Lehner C, O'Farrell PH (1990) *Cell* 61: 535-547
30. Whitfield WGF, Gonzales C, Maldonado-Codina G, Glover DM (1990) *EMBO J* 9: 2563-2572
31. Kobayashi H, Minshull J, Ford C, Golsteyn R, Poon R, Hunt T (1991) *J Cell Biol* 114: 755-765
32. Gautier J, Maller JL (1991) *EMBO J* 10: 177-182
33. Minshull J, Goldstein R, Hill CS, Hunt T (1990) *EMBO J* 9: 2865-2875
34. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) *Cell* 65: 701-713
35. Girard CF, O'Farrell PH (1989) *Cell* 56: 957-968
36. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2824-2828
37. Pines J (1991) *Cell Growth Differ* 2: 305-310
38. Leopold P, O'Farrell PH (1991) *Cell* 66: 1207-1216
39. Lew DJ, Dulic V, Reed SI (1991) *Cell* 66: 1197-1206
40. Xiong Y, Connolly T, Futcher B, Beach D (1991) *Cell* 65: 691-699
41. Surmacz E, Reiss K, Sell C, Baserga R (1992) *Cancer Res* 52: 4522-4525
42. Xiong Y, Zhang H, Beach D (1992) *Cell* 71: 505-514
43. Won KA, Xiong Y, Beach D, Gilman MZ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9910-9914
44. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nishimoto T, Moran DO, Franza BR, Roberts JM (1992) *Science* 257: 1689-1694
45. Dulic V (1992) *Science* 257: 1958-1961
46. Clarke PR, Leiss D, Pagano M, Karsenti E (1992) *EMBO J* 11: 1751-1761
47. Pines J, Hunter T (1990) *Nature* (Lond) 346: 760-763
48. Hunt T (1991) *Nature* (Lond) 349: 100-101
49. Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991) *Nature* (Lond) 349: 132-138
50. Moreno S, Nurse P (1990) *Cell* 61: 549-551
51. Kemp BE, Pearson RB (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 342-346
52. Reed SI (1991) *Trends Genet* 7: 95-99
53. Wittenberg C, Sugimoto K, Reed SI (1990) *Cell* 62: 225-237
54. Pines J (1992) *Curr Opin Cell Biol* 4: 144-148
55. Nasmyth K, Dirick L (1991) *Cell* 66: 995-1013
56. Ogas J, Andrews BJ, Herskowitz I (1991) *Cell* 66: 1015-1026
57. Tyers M, Tokiwa G, Nash R, Futcher B (1992) *EMBO J* 11: 1773-1784
58. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) *Science* 234: 364-368
59. Ciechanover A, Schwartz AL (1989) *Trends Biochem Sci* 14: 483-488
60. Mayer RJ, Arnold J, Laszlo L, Landon M, Lowe J (1991) *Biochim Biophys Acta* 1089: 141-157
61. Jentsch S, Seufert W, Hauser HP (1991) *Biochem Biophys Acta* 1089: 127-139
62. Rechsteiner M (1991) *Cell* 66: 615-618
63. Hershko A (1991) *Trends Biol Sci* 16: 265-268
64. Jentsch S (1992) *Trends Cell Biol* 2: 98-103
65. Hershko A, Ciechanover A (1992) *Annu Rev Biochem* 61: 761-807
66. Wiland E (1988) *Post Biochem* 34: 361-374
67. Piotrowska U (1993) *Post Biochem*, 39, 8-16
68. Hershko A, Ganoth D, Pehrson J, Palazzo RE, Cohen LH (1991) *J Biol Chem* 266: 16376-16379
69. Luca FC, Ruderman JV (1989) *J Cell Biol* 109: 1895-1909
70. Luca FC, Shibuya EK, Dohrman CE, Ruderman JV (1991) *EMBO J* 10: 4311-4320
71. Lorca T, Devault A, Colas P, Van Loon A, Fesquet D, Lazaro JB, Doree M (1992) *FEBS Lett* 306: 90-93
72. Gallant P, Nigg EA (1992) *J Cell Biol* 117: 213-224
73. Ghiara JB, Richardson HE, Sugimoto K, Henze M, Lew DJ, Wittenberg C, Reed SI (1991) *Cell* 65: 163-174
74. Hunt T, Luca FC, Ruderman JV (1992) *J Cell Biol* 116: 707-724
75. Bachmair A, Finley D, Varshavsky A (1986) *Science* 234: 179-186
76. Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984) *Cell* 37: 43-55
77. Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A (1984) *Cell* 37: 57-66
78. Kulka RG, Raboy B, Schuster R, Parag HA, Diamond G, Ciechanover A, Marcus M (1988) *J Biol Chem* 263: 15726-15731
79. Goebel MG, Yochem J, Jentsch S, McGrath JC, Varshavsky A, Byers B (1988) *Science* 241: 1331-1335
80. Finch JS, John TS, Krieg P, Bonham K, Smith HT, Fried VA, Bowden GT (1992) *Cell Growth Differen* 3: 269-278
81. Cook J, Chock PB (1991) *Biochem Biophys Res Commun* 174: 564-571
82. Cook J, Chock PB (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11388-11392
83. Goldberg AL (1992) *Eur J Biochem* 203: 9-23
84. Goldberg AL, Rock KL (1992) *Nature* (Lond) 357: 375-373
85. Seufert V, Jentsch S (1992) *EMBO J* 11: 3077-3080
86. Tanaka K, Fujiwara T, Kumatori A, Shin S, Yoshimura T, Ichihara A, Tokunaga F, Aruga R, Iwanaga S, Kakizuka A, Nakanishi S (1990) *Biochemistry* 29: 3777-3785
87. Kanahara H, Sawada H, Yokosawa H (1992) *FEBS Lett* 310: 119-122
88. Felix MA, Labbe JC, Doree M, Hunt T, Karsenti E (1990) *Nature* (Lond) 346: 379-382
89. Lorca T, Labbe JC, Devault A, Fesquet D, Strausfeld U, Nilsson J, Nygren PA, Uhlen M, Cavadore JC, Doree M (1992) *J Cell Sci* 102: 55-62
90. Sagata N, Watanabe N, Vande Woude GF, Iikawa Y (1989) *Nature* (Lond) 342: 512-518
91. O'Keefe SJ, Kiessling AA, Cooper GM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7869-7872
92. Roy LM, Singh J, Gautier J, Airlinghaus RB, Nordeen SK, Maller JL (1990) *Cell* 61: 825-831
93. Izumi T, Maller JL (1991) *Moll Cell Biol* 11: 3860-3867

94. Maller JL, Roy LM, Izumi T (1991) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 56: 533-538
95. Lorca T, Galas S, Fesquet D, Devault A, Cavadore JC, Doree M (1991) *EMBO J* 10: 2087-2093
96. Watanabe N, Vande Woude GF, Igawa Y, Sagata N (1989) *Nature (Lond)* 342: 505-511
97. Felix MA, Cohen P, Karsenti E (1990) *EMBO J* 9: 675-683
98. Yamashita K, Yasuda H, Pines J, Yasumoto K, Nishitani H, Ohtsubo M, Hunter T, Sugimura T, Nishimoto T (1990) *EMBO J* 9: 4331-4338
99. Lorca T, Fesquet D, Zindy F, Le Bouffant F, Cerruti M, Brechot C, Devauchelle G, Doree M (1991) *Mol Cell Biol* 11: 1171-1175
100. Vandre DD, Wills VL (1992) *J Cell Sci* 101: 79-91
101. Białojan C, Takai A (1988) *Biochem J* 256: 283-290
102. Cohen P, Holmes CFB, Tsukitani Y (1990) *Trends Biochem Sci* 15: 98-102
103. Walker DH, DePaoli-Roach AA, Maller JL (1992) *Mol Biol Cell* 3: 687-698
104. Millar JBA, Russel P (1992) *Cell* 68: 407-410
105. Pallen CJ, Tan YH, Guy GR (1992) *Curr Op Cell Biol* 4: 1000-1007
106. Izumi T, Walker DH, Maller JL (1992) *Mol Biol Cell* 3: 927-939
107. Millar JBA, Lenaers G, Russel P (1992) *EMBO J* 11: 4933-4941
108. Millar JBA, Russel P, Dixon JE, Guan KL (1992) *EMBO J* 11: 4943-4952
109. Krek W, Nigg EA (1992) *The New Biologist* 4: 323-329
110. Lorca T, Labbe JC, Devault A, Fesquet D, Capony JP, Cavadore JC, Le Bouffant F, Doree M (1992) *EMBO J* 11: 2381-2390
111. Ciechanover A, DiGiuseppe JA, Bercovich B, Orian A, Richter JD, Schwartz AL, Brodeur GM (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 139-143
112. Scheffner M, Werness BA, Hulbregste JM, Levine AJ, Howley PM (1990) *Cell* 63: 1129-1136
113. Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tansura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) *Nature (Lond)* 360: 597-599
114. Bercovich Z, Rosenberg-Hasson Y, Ciechanover A, Kahana C (1989) *J Biol Chem* 264: 15949-15952
115. Rosenberg-Hasson Y, Bercovich Z, Ciechanover A, Kahana C (1988) *Eur J Biochem* 185: 469-474

Prawidłowa i zaburzona funkcja kanału chlorkowego CFTR — biochemiczna analiza mukowiscydozy²

Normal and disturbed function of CFTR chloride channel — biochemical analysis of cystic fibrosis

TOMASZ TYRAKOWSKI¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura cząsteczki CFTR
- III. Elektrofizjologiczna charakterystyka kanału chlorkowego CFTR
- IV. Mechanizmy aktywacji kanałów chlorkowych
- V. Rola kanału (prądu) chlorkowego w czynności nabłonków wydzielających lub wchłaniających chlorki

Contents:

- I. Introduction
- II. CFTR protein structure
- III. CFTR chloride channel electrophysiology
- IV. Control systems of chloride channel activation
- V. Chloride channel (current) function in secretion and reabsorption by different epithelial tissues

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — trójfosforan adenozy-ny; CaM — kalmomodulina; cAMP — cykliczny jednofosforan adenozy-ny; CF — zwłóknienie torbielowate czyli mukowiscydoza; CFTR — produkt genu zwłóknienia torbielowatego (mukowiscydozy), akronim często używany także na określenie genu zwłóknienia torbielowatego; cpt-cAMP — cykliczny jednofosforan 8-(4-chlorofenylo)adenozy-ny; deltaF508-CFTR — określona mutacja genu CFTR; DIDS — inhibitor (bloker) kanału chlorkowego (4,4'-dwiwzotiocjaniano-2,2'-stilbenodwusulfonian); Gom — jednostka oporności elektrycznej (gigaom); GTP — trójfosforan guanozyny; GTP-gammaS — pochodna GTP (guanozyno-5'-0-(3-tiofosforan); NBD1 i NBD2 — domeny CFTR wiążące ATP; NPPB — inhibitor (bloker) kanału chlorkowego (5-nitro-2-(3-fenylopropyloamino)benzoesan); PKA — kinaza białkowa zależna od cAMP; PKC — kinaza białkowa zależna od diacyloglicerolu i jonów wapnia; pS — jednostka przewodności elektrycznej (pikosimens); SPQ — 6-metoksy-N-(3sulfopropyl)kwinalinum.

I. Wstęp

Zwłóknienie torbielowate (ang. *cystic fibrosis*), nazywane też mukowiscydozą, jest najczęstszą wadą gene-

¹ prof. dr hab. med., Pomorska Akademia Medyczna, Zakład Patofizjologii, 70-111 Szczecin, Al. Powstańców Wlkp. 72

² Opracowano na podstawie wykładu wygłoszonego na sympozjum „Mukowiscydoza, nowe osiągnięcia kliniki, genetyki i patofizjologii” Poznań, 18. marca 1992.

tyczną w populacji białych ludzi. Zaburzenie to dziedziczy się autosomalnie recesywnie, a fenotypowo powoduje subletalne lub letalne zaburzenia we wczesnym okresie noworodkowym. Zaburzenia funkcji w zwłóknieniu torbielowatym dotyczą nieswoistych reakcji obronnych, przystosowawczych i regulacyjnych ustroju, w szczególności dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz termoregulacji [7]. Intensywne wieloletnie badania nad patobiochemią tej wrodzonej choroby metabolicznej doprowadziły do stwierdzenia, że najbardziej prawdopodobną przyczyną tej choroby jest zaburzony transport jonów chlorokowych przez barierę tkanek nabłonkowych w całym ustroju [1-7].

W latach 1988/89 wyizolowano gen, którego mutacja powoduje mukowiscydozę [8-10]. (Zagadnienie to omawia artykuł J. B a l a w *Postęпах Biochemii* [11].) Produkt tego genu nazwano CFTR (od angielskiej nazwy *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), aby podkreślić regulacyjne podłoże zaburzeń charakterystycznych dla mukowiscydozy [12].

Współcześnie wykazano, że białko CFTR jest kanałem przewodzącym jony chlorokowe [13-15], ale kanał ten różni się od kanałów jonowych zależnych od potencjału lub zależnych od wiązania ligandu (opisanych np. w artykule J. K w i a t k o w s k i e j w *Postęпах Biochemii* [16], bo jego otwarcie następuje w wyniku pobudzenia wewnątrzkomórkowych mechanizmów aktywacji czynności komórki — nazywanych układem drugich posłańców. CFTR jest przedstawicielem kanałów jonowych typowych dla tkanek nabłonkowych.

Mimo spektakularnego postępu w zakresie badań nad CFTR, patobiochemia mukowiscydozy budzi nadal wiele wątpliwości, gdyż dotychczas nie ma jednolitych poglądów ani na fizjologiczną rolę prawidłowego białka, ani na znaczenie nieprawidłowego kanału CFTR w zaburzeniach narządowych, charakterystycznych dla tej choroby. Celem tego artykułu jest przedstawienie funkcji prawidłowego kanału chlorokowego CFTR, porównanie czynności prawidłowego białka z funkcją nieprawidłowego produktu zmutowanego genu, opisanie mechanizmów odpowiedzialnych za otwarcie tego rodzaju kanałów jonowych, oraz przedstawienie faktów i hipotez dotyczących udziału białka CFTR w powstaniu zaburzeń charakterystycznych dla mukowiscydozy.

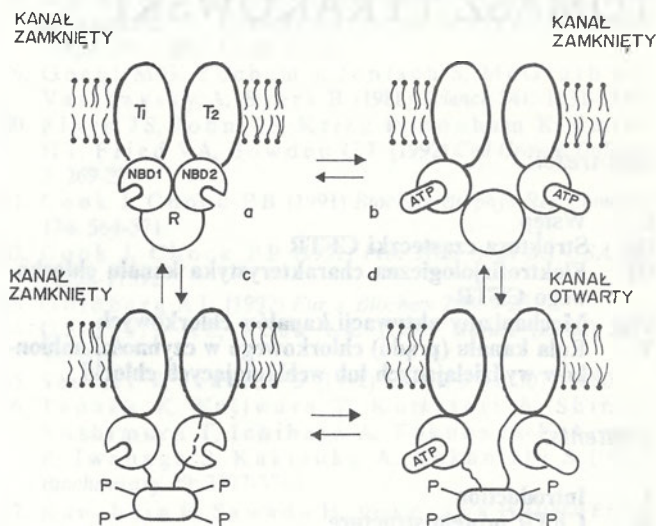
II. Struktura cząsteczki CFTR

Pierwszorzędową strukturę białka CFTR poznano dzięki wyizolowaniu genu [8]. Sekwencję aminokwasową tego białka określono na podstawie kodu

* Wartościowym wprowadzeniem do zagadnień analizy i przewidywania cech i funkcji białek jest artykuł A. G o d z i k a, G. B o g u t y i T. W e s o ł o w s k i e g o w *Postęпах Biochemii* (35, 45-61, 1989).

nukleotydów w DNA. Produktem ludzkiego genu CFTR jest polipeptyd o około 1480 resztach aminokwasowych i o masie cząsteczkowej wynoszącej około 168 kDa. Jego struktura drugorzędowa i trzeciorzędowa zostały opisane na podstawie matematycznych modeli budowy białek w oparciu o doświadczalnie potwierdzone wzory budowy cząsteczki* [8,17]. Modelowym białkiem dla określenia budowy CFTR są białka wiążące ATP, a w szczególności kinaza adenylanowa.

Białko CFTR, schematycznie przedstawione na rysunku 1, składa się z 5 wyraźnie określonych domen: T1 i T2 są integralnymi składnikami błony, NBD1 i NBD2 są podjednostkami wiążącymi ATP, a domena R, która może ulegać fosforylacji, stanowi część cząsteczki decydującą o jej aktywacji [17]. Domeny T1 i T2 wspólnie tworzą kanał penetrujący błonę. Wykazano, że mutacje prowadzące do substytucji zasadowych aminokwasów w obrębie tych obszarów zmieniają wybiórczość kanału CFTR dla jonów chlorowców [18]. Domeny wiążące ATP — NBD1 i NBD2 wpływają na przewodnictwo dla chloroków, choć hydroliza ATP nie jest konieczna dla transportu chloroków. Przypuszcza się, że wiązanie ATP powoduje zmiany konformacyjne w domenach błonowych cząsteczki [19]. Domena R może ulegać fosforylacji przez zależną od cAMP kinazę białkową (PKA). Fosforylacja czterech reszt serynowych tej domeny umożliwia otwarcie kanału, bądź zwiększenie jego przepuszczalności. Już jedno ufosforylowane miejsce (seryna 660) umożliwia otwarcie kanału CFTR [20]. Złożona budowa omawianego białka pozwala przypuszczać, że mutacje



Ryc. 1. Schemat działania cząsteczki CFTR, jako kanału przewodzącego jony chlorokowe. Domeny błonowe oznaczono — T1 i T2, domenę wiążącą nukleotydy — NBD1 i NBD2, a regulacyjną domenę łączącą — R. Mutacja deltaF508 w domenie NBD1 i mutacja K1250M w NBD2 powodują zwłóknienie torbielowate.

Do otwarcia kanału (d) niezbędna jest fosforylacja domeny R przez PKA (c) oraz wiązanie ATP przez domeny NBD1 i NBD2 (b). Nie wiadomo, czy kanał CFTR jest monomerym. Rola domen NBD1, NBD2 i R, jako struktur blokujących kanał nie została doświadczalnie potwierdzona. (Opracowano w/g 23, 69).

powinny raczej zmieniać jego czynność niż całkowicie ją usuwać.

CFTR wykazuje strukturalne podobieństwo do białek transportujących oznaczonych jako rodzina ABC (od ang. *ATP binding cassette*) [17]. Białka tej grupy mają kluczowe znaczenie w procesach aktywnego transportu różnych substancji u bakterii, drożdży, owadów i ssaków. Na podstawie strukturalnego podobieństwa białka CFTR do białek aktywnie transportujących przypuszcza się, że oprócz funkcji kanału chlorkowego białko to gra jeszcze inną rolę w komórce [17, 21]. Do tej pory nie ma jednak dowodów doświadczalnych na poparcie tych przypuszczeń, pomimo bardzo licznych publikacji, wskazujących na udział CFTR w transporcie chlorków. W ostatnim czasie opublikowano badania pośrednio wskazujące, że kanał CFTR przewodzi także jony wodorowęglanowe [22].

III. Elektrofizjologiczna charakterystyka kanału chlorkowego CFTR

Definitywne określenie funkcji transportowej białka można osiągnąć w eksperymencie rekonstrukcyjnym, czyli przez odtworzenie takiej samej czynności *in vitro* przez wprowadzenie wyizolowanego białka do błony lipidowej lub do liposomów. Do tej pory nie zbadano tą metodą białka CFTR, lecz podobne wnioski można wysuwać na podstawie doświadczeń polegających na wprowadzeniu do komórki genu, i spowodowaniu wystąpienia w tej komórce dotychczas nieobecnej funkcji. W tabeli 1 zestawiono badania transfekcji genu CFTR do komórek, w których nie wykazano

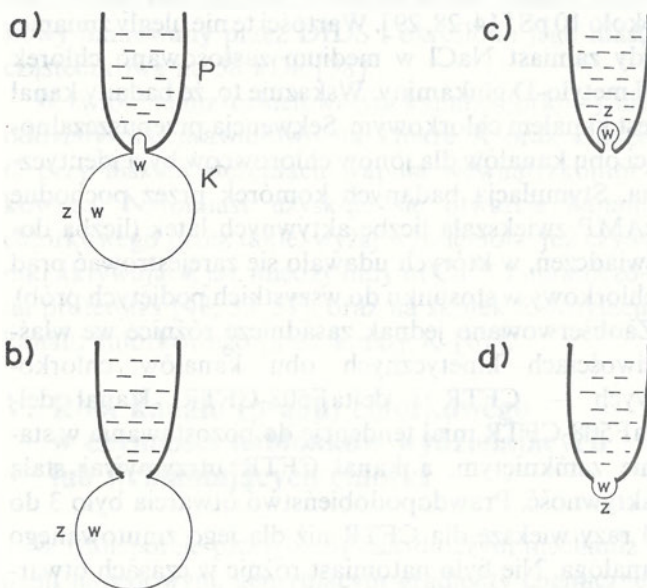
regulowanego przez cAMP kanału chlorkowego przed transfekcją. Do transfekcji użyto hodowane *in vitro* komórki (linie komórkowe): NIH3T3, Vero, L i inne lub też komórki, które utraciły prawidłowy gen CFTR na skutek mutacji powodującej mukowiscydozę, a także oocyty *Xenopus laevis*. Ekspresję białka CFTR zbadano metodami immunochemicznymi, mierząc prąd jonowy, strumień radioaktywnych jonów lub zmianę wewnątrzkomórkowego stężenia chlorków za pomocą mikrofluorymetrii.

Podstawową techniką elektrofizjologiczną umożliwiającą badanie kanałów jonowych jest metoda klamry łątkowej (ang. *patch clamp*) [24-26]. Na rycinie 2 przedstawiono zastosowania tej metody do pomiaru prądów jonowych z różnych obszarów błony komórkowej pojedynczej komórki. Istota pomiaru prądów jonowych według metody klamry łątkowej polega na elektrycznym odizolowaniu niewielkiego obszaru błony komórkowej — „łatki”, w ujściu mikropipety, dzięki wytworzeniu się bardzo ścisłego połączenia między błoną komórkową a ściankami mikropipety. Elektrycznym sprawdzianem tego połączenia jest zarejestrowanie zwiększenia się oporu elektrycznego mikropipety do wartości 10 G Ω lub więcej. Powszechnie uważa się, że oznaczane metodą klamry łątkowej

Tabela 1.

Badania ekspresji rekombinowanego genu CFTR na komórkach pozbawionych konstytucjonalnej ekspresji tego genu.

Komórki poddane transfekcji	Metody badania ekspresji	Piśm.
Fibroblasty (L, NIH3T3, Vero)	mikrofluorymetria SPQ, pomiar transportu za pomocą izotopów promieniotwórczych, klamra łątkowa	13, 27, 29, 50, 51
Komórki HeLa	mikrofluorymetria SPQ, klamra łątkowa	29, 51
Komórki CHO	wiązanie przeciwciał anti-CFTR, mikrofluorymetria SPQ, pomiar transportu za pomocą izotopów promieniotwórczych, klamra łątkowa	13, 28
Komórki z mutacją CF	mikrofluorymetria SPQ, klamra łątkowa	31, 32
Oocyty żaby <i>Xenopus laevis</i>	klamra łątkowa	30, 43
Komórki owadzie (Sf9)	wiązanie przeciwciał anti-CFTR, pomiar transportu za pomocą izotopów promieniotwórczych, klamra łątkowa	14



Ryc. 2. Zastosowanie metody klamry łątkowej do pomiaru prądów jonowych płynących przez różne obszary błony komórkowej pojedynczej komórki.

p — końcówka mikropipety wypełnionej roztworem elektrolitu (czujnik aparatury rejestracyjnej), k — komórka, z — zewnętrzna powierzchnia błony komórkowej, w — wewnętrzna (cytosolowa) powierzchnia błony komórkowej.

a.) Mikropipeta uzyskała połączenie z błoną komórkową izolując elektrycznie „łatkę” — małą powierzchnię błony komórkowej. Mówimy o rejestracji prądów jonowych w układzie „związanej łątki”.

b.) Mikropipeta pozostaje w trwałym połączeniu z błoną komórkową mimo przerwania łątki (przez krótkotrwałe zassanie lub przez działanie jonoforów). Mówimy o rejestracji prądów jonowych z całej komórki.

c. i d.) Mikropipeta utraciła kontakt z komórką, ale łątkę umożliwia pomiar prądów jonowych. Mówimy o rejestracji w układzie wolnej łątki — odwróconej c. i nieodwróconej d. (Opracowano w/g 26).

parametry cechujące określony kanał jonowy* identyfikują go w sposób jednoznaczny [15]. Do podstawowej charakterystyki kanałów jonowych należą: przewodność pojedynczego kanału (ang. *single channel conductance*), wybiórczość dla jonów (ang. *ion selectivity*) i wrażliwość na specyficzne inhibitory (ang. *blocker sensitivity*).

Podstawowe właściwości elektrofizjologiczne białka CFTR i jego zmutowanych analogów zestawiono w tabeli 2. Zarówno prawidłowe białko, jak i deltaF508-CFTR (produkt najczęstszej mutacji tego genu) wykazują zdolność zwiększenia prądu chlorkowego przez błonę komórkową w odpowiedzi na zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. W czasie działania przechodzącego przez błonę komórkową analoga cAMP w komórkach wytwarzających normalny CFTR prąd jonowy mierzony z całej błony komórkowej zwiększył się 10 razy, natomiast w obecności białka deltaF508-CFTR prąd chlorkowy był tylko 2 do 3 razy większy od kontroli. W komórkach wykazujących obecność CFTR i deltaF508-CFTR wykazano aktywność pojedynczych kanałów chlorkowych. Charakterystyki prądowo-napięciowe obu kanałów były liniowe, a nachylenie wynosiło odpowiednio 4,9 pS i 4,3 pS [27]. W nieco wcześniejszych publikacjach określono przewodność tego kanału na około 10 pS [14, 28, 29]. Wartości te nie uległy zmianie, gdy zamiast NaCl w medium zastosowano chlorek N metylo-D glukaminy. Wskazuje to, że badany kanał jest kanałem chlorkowym. Sekwencja przepuszczalności obu kanałów dla jonów chlorowców była identyczna. Stymulacja badanych komórek przez pochodne cAMP zwiększała liczbę aktywnych łątek (liczba doświadczeń, w których udawało się zarejestrować prąd chlorkowy w stosunku do wszystkich podjętych prób). Zaobserwowano jednak zasadnicze różnice we właściwościach kinetycznych obu kanałów chlorkowych — CFTR i deltaF508-CFTR. Kanał deltaF508-CFTR miał tendencję do pozostawania w stanie zamkniętym, a kanał CFTR utrzymywał stałą aktywność. Prawdopodobieństwo otwarcia było 3 do 4 razy większe dla CFTR niż dla jego zmutowanego analogu. Nie było natomiast różnic w czasach otwarcia. Czasy zamknięcia były jednak pięciokrotnie dłuższe w przypadku zmutowanego białka w stosunku do normalnego [27].

W przypadkach innych mutacji genu CFTR również zaobserwowano zmienioną czynność kanału chlorkowego. DeltaR-CFTR, cząsteczka pozbawiona obszaru R, przewodzi chlorki niezależnie od stymulacji przez cAMP, choć stymulacja przez cAMP dodatkowo zwiększa przewodność. Mutacja ta także osłabia od-

Tabela 2.

Podstawowe właściwości elektrofizjologiczne rekombinowanych białek CFTR

Rodzaj mutacji	Przewodność (pS)	Wybiórczość dla jonów	Mechanizm aktywacji	Písm.
CFTR (prawidłowy)	10,4 ± 0,2	Cl ⁻ > J ⁻	forskolin, cAMP, PKA	29
CFTR (prawidłowy)	9,6 ± 0,5	—	cpt-cAMP, dibutyryl-cAMP, forskolin, IBMX, PKA, PKC	28
CFTR (prawidłowy)	4,9	Br ⁻ > Cl ⁻ > J ⁻	cpt-cAMP	27
delta F508-CFTR	4,3	Br ⁻ > Cl ⁻ > J ⁻	cpt-cAMP	27

działanie innych mutacji np. w obszarze NBD-2 lecz już nie w obszarze NBD-1 [33].

Czynnościowe badanie kanałów chlorkowych występujących w komórkach normalnych nabłonków dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz w liniach komórkowych pochodzących z tych nabłonków potwierdziły występowanie aktywowanego przez cAMP kanału chlorkowego o niewielkiej (kilka pS) przewodności [14, 34-37]. Specyficznym blokerem tego kanału jest NPPB [34]. Związek ten hamuje prądy chlorkowe występujące w normalnych nabłonkach, lecz był nieaktywny w oddziaływaniu na CFTR na komórkach linii Vero [27]. Inne znane inhibitory kanałów chlorkowych [38-42] nie działają na kanał chlorkowy CFTR, choć mogą hamować transport chlorków w komórkach w których CFTR występuje. Kanał chlorkowy hamowany przez DIDS wyizolowano na przykład z szczytowych błon komórkowych nabłonków wołowych dróg oddechowych [38].

Zidentyfikowano co najmniej trzy rodzaje prądów chlorkowych w komórkach nabłonkowych, w których występuje CFTR [45]. Wyniki wcześniejszych badań sugerowały, że przyczyną zaburzeń transportu chlorków w zwłóknieniu torbielowatym może być występujący także w tych nabłonkach kanał chlorkowy o przewodności kilkudziesięciu pikosimensów, nieliniowej charakterystyce prądowo-napięciowej, aktywujący się w czasie depolaryzacji komórki (ang. *outwardly rectifying, depolarization-induced Cl channel* — ORDIC) [30, 37]. Wykazano brak korelacji pomiędzy ekspresją CFTR i funkcją kanału chlorkowego ORDIC zarówno w przypadku linii komórkowych, jak i w przypadku prawidłowych tkanek [46, 47].

IV. Mechanizmy aktywacji kanałów chlorkowych

Kanały chlorkowe CFTR (a także inne kanały o podobnej funkcji) ulegają aktywacji — „otwierają się” — w odpowiedzi na działanie ustrojowych układów regulacyjnych i wewnątrzkomórkowych mecha-

* W badaniach elektrofizjologicznych nazwy: prąd jonowy, przewodność dla jonu i przepuszczalność dla jonu są często używane zamiennie, bo odzwierciedlają właściwości kanału jonowego. W szerszym zakresie terminy te są synonimami nazwy kanał jonowy.

nizmów aktywujących. W zwłóknieniu torbielowatym na skutek obecności mechanizmów wyrównawczych, mimo braku czynnościowo sprawnego CFTR, można zarejestrować prąd chlorkowy, bo mogą otworzyć się inne kanały chlorkowe. Zidentyfikowano następujące niżej omówione mechanizmy aktywujące kanały chlorkowe w warunkach zdrowia i w przypadkach mukowiscydozy. Kanał chlorkowy CFTR jest aktywowany przez działanie kinazy białkowej A po pobudzeniu receptora uaktywniającego cyklazę adenylanową [28, 48-50]. W transfekowanych komórkach linii CHO uzyskano aktywację kanału oddziałując na komórki przechodzącymi przez błonę komórkową analogami cAMP oraz przez działanie kinaz białkowych A i C na oddzielną od komórki łątkę błony komórkowej. Dezaktywację tego kanału wywoływano przez działanie alkalicznej fosfatazy [28]. Obecność sprawnego układu aktywacji funkcji komórki przez agonistów receptora beta-adrenergicznego (jednak bez możliwości zwiększenia transportu chlorków) wykazano także w komórkach linii pochodzącej z nabłonka oskrzeli chorego na zwłóknienie torbielowe [49].

Warunkiem aktywacji kanału CFTR jest wiązanie ATP przez obszary NBD1 i NBD2. Obszar NBD1 jest krytyczny dla funkcji całego białka. Wiele spontanicznych mutacji powodujących zwłóknienie torbielowe skupiło się w tym rejonie. Zbadano ekspresję sztucznie wywołanych mutacji dotyczących obszarów NBD1 i NBD2 w komórkach HeLa i wykazano zaburzenia lub utratę czynności białka CFTR [51].

Przepuszczalność dla jonów chlorkowych błony szczytowej* komórek nabłonka dróg oddechowych oraz linii komórkowej T84 w hodowli tkankowej zwiększa się także pod wpływem zwiększenia stężenia Ca^{2+} w komórce, niezależnie od fosforylacji przez kinazy białkowe, oraz pod działaniem kinazy C i kinazy K zależnej od kalmoduliny [52-54]. W niskich stężeniach Ca^{2+} fosforylacja kanału Cl^{-} przez kinazę C otwiera ten kanał, a przy wysokich stężeniach wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} ta sama reakcja powoduje inaktywację kanału [55]. W komórkach jelita cienkiego wykazano otwarcie kanału chlorkowego o przewodności 20 pS po zastosowaniu GTP-gammaS, co sugeruje udział białek G w mechanizmie aktywacji [56].

W wielu tkankach nabłonkowych oprócz układów aktywacji kanałów chlorkowych istnieją także endogenne inhibitory. W przypadku kanału chlorkowego o pośredniej przewodności (30 pS) i właściwości prostowania prądu jonowego w kierunku poza komórkę (ang. *outwardly rectifying channel*) wykazano istnienie ciepłostalego inhibitora cytoplazmatycznego [57, 58].

* Błonę komórkową od strony „światła” przewodu, który wyszczelnia komórki tkanki nabłonkowej nazywa się błoną szczytową lub luminarną, a przeciwną błonę komórkową określa się jako podstawno-boczną.

Wykazano, że w warunkach *in vitro* kanał chlorkowy może otworzyć się podczas przedłużonej depolaryzacji komórki, pod wpływem podwyższania temperatury, proteolizy zewnętrznej powierzchni komórki lub na skutek zmian osmotyczności zewnętrznego środowiska komórki, lecz nie określono fizjologicznego znaczenia tych zmian [59].

Udowodniono, że cAMP i Ca^{2+} aktywują dwa różne kanały [60]. Kanał chlorkowy aktywowany przez cAMP występuje w nabłonku dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Kanał chlorkowy aktywowany przez jon Ca^{2+} występuje w nabłonkach dróg oddechowych, a nie występuje w nabłonkach jelitowych. Tylko kanał chlorkowy aktywowany przez wapń jest hamowany przez pochodną stilbenu (DIDS) — ta reakcja występuje tylko w drogach oddechowych. Oba te kanały mają różną przepuszczalność dla anionów. Zwiększenie stężenia Ca^{2+} i cAMP w komórkach nabłonkowych powoduje addytywne zwiększenie prądu chlorkowego tylko w nabłonkach dróg oddechowych [60]. Występowanie dwóch kanałów chlorkowych wykazano także w komórkach linii T84 [37]. Dalsze badania potwierdziły istnienie różnych kanałów chlorkowych w nabłonkach wykazujących ekspresję CFTR [47]. Z błon szczytowych nabłonków wołowych dróg oddechowych wyizolowano kanał chlorkowy hamowany przez DIDS i określono jego masę cząsteczkową na 38 kDa [38].

W zwłóknieniu torbielowatym kanał chlorkowy nie oddziałuje prawidłowo na kinazę A oraz kinazę C przy niskich stężeniach wapnia wewnątrzkomórkowego. Natomiast uzyskuje się otwarcie kanału chlorkowego przez takie, wyżej wymienione już czynniki aktywujące, jak między innymi Ca^{2+} i ograniczona proteoliza [43, 53, 57], oraz na skutek fosforylacji kanału chlorkowego przez kinazę K [61].

V. Rola kanału (prądu) chlorkowego w czynności nabłonków wydzielających lub wchłaniających chlorki

W transporcie przez błony zasadniczym mechanizmem napędowym, generującym gradienty chemiczne i elektrochemiczne są pompy jonowe (specyficzne ATP-azy) transportujące kationy (Na^{+} , K^{+} lub H^{+}), a kanały chlorkowe (lub ogólniej kanały jonowe) umożliwiają uzyskanie elektroobojętności (neutralizacja ładunków elektrycznych) strumienia jonów lub zmniejszenie różnicy stężeń. Kanały jonowe kontrolują więc optymalną dla komórki wartość potencjału elektrycznego lub różnicę stężeń przez błonę, w której są zlokalizowane, a w czasie aktywacji (otwarcia) sprzęgają strumień anionów z aktywnym transportem kationów. Jest to jeden z molekularnych mechanizmów, które umożliwiają efektywne wykorzystanie przez komórkę energii wydatkowanej w procesie aktywnego transportu. W taki właśnie sposób działają systemy transportowe komórek przewodów

gruczołów potowych — reasorbujące NaCl, oraz komórki błon śluzowych mogące wydzielać i wchłaniać NaCl w procesach sekrecji i reabsorpcji przebiegających w drogach oddechowych i w przewodzie pokarmowym. Kanał CFTR w komórkach dróg oddechowych prawdopodobnie transportuje także jony wodorowęglanowe [22], przyczyniając się w ten sposób do fizjologicznego alkalicznego odczynu dróg oddechowych.

Występowanie białka CFTR w tych tkankach zostało potwierdzone metodami morfologicznymi przy zastosowaniu przeciwciał anti-CFTR oraz sond molekularnych (ang. *probe*) dla CFTR-mRNA. Wykazano obecność CFTR w gruczołach potowych [19, 62-64], w przewodzie pokarmowym i w trzustce [65-67], w drogach oddechowych [67, 68] i w jądrze [67]. W hodowanych *in vitro* komórkach linii pochodzenia nabłonkowego wykazano zawartość CFTR porównywalną ze stężeniem tego białka w tkankach macierzystych, natomiast w tkankach nie nabłonkowych i w liniach komórkowych pochodzących z tych tkanek rozmiar ekspresji był od 200 do 400 razy mniejszy [69-72]. Wykazano, że ekspresja może zależeć od stopnia zróżnicowania i od fazy wzrostu komórek [70-72].

Badania subkomórkowej lokalizacji białka CFTR wskazują, że znajduje się ono w szczytowej błonie komórkowej komórek przewodów gruczołowych, dróg oddechowych i przewodu pokarmowego [31], oraz hodowanych *in vitro* komórek [73]. Kanał chlorkowy (prawdopodobnie CFTR) występuje także w siateczce endoplazmatycznej komórek trzustki, nerki i dwunastnicy [74-76]. Próbowano wykorzystać ten fakt do wyjaśnienia zmienionych właściwości śluzu w zwłóknieniu torbielowatym [77]. Nieprawidłowy kanał chlorkowy CFTR mógłby bowiem odpowiadać za zmniejszone zakwaszanie wewnątrzkomórkowych przedziałów (aparatu Golgiego, endosomy i prelizosomy), w których zachodzi sjalilacja, siarczanowanie i fukozyllacja białkowych składników śluzów dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Po transfekcji genu CFTR do komórek linii CFPAC wykazano zwiększone wewnątrzkomórkowe pH i naprawę tego zaburzenia [78].

Współczesne badania nad rolą prawidłowej i zaburzonej cząsteczki CFTR zmierzają do określenia jej roli na „mapie metabolicznej” wiążącej procesy transportowe zachodzące dzięki aktywacji różnych specyficznych kanałów w spójny system wyjaśniający wytwarzanie potu, transport enzymów w przewodach trzustkowych i produkcję śluzu w przewodzie pokarmowym, oraz oczyszczanie śluzowo-rzęskowe w drogach oddechowych [5, 79-82].

Przystępując do podsumowania zaznaczam, że we współczesnych poglądach na zwłóknienie torbielowe pozostaje nadal wiele wątpliwości i nierozstrzygniętych zagadnień.

W prawidłowo działających mechanizmach regula-

cyjnych, które ulegają zaburzeniu w tym schorzeniu kluczową rolę gra CFTR:

— umożliwia adekwatną reakcję komórki na aktywację receptorów w ogólnoustrojowych reakcjach adaptacyjnych,

— zabezpiecza komórkę przed nadmiernym obciążeniem jonami w stosunku do komórkowych zasobów energetycznych, przez oddziaływanie obszarów NBD z związkami wysokoenergetycznymi, oraz przez mechanizm hamowania transkrypcji tego genu w czasie aktywacji komórki [19].

Przystosowawcze znaczenie aktywacji kanału chlorkowego w drogach oddechowych i w przewodzie pokarmowym polega na ochronie przed infekcją. W procesie wydzielania potu aktywacja kanału chlorkowego umożliwia ochronę ustrojowej puli chlorku sodu i zabezpiecza przed zaburzeniami objętości płynów pozakomórkowych. Reakcja ta jest również wykorzystywana przez ustrój do produkcji płynu, który umożliwia przemieszczania enzymów trzustkowych z gruczołu do jelita. Wadliwy przebieg wymienionych procesów cechuje fenotyp zwłóknienia torbielowatego i powoduje przedwczesną umieralność tych chorych.

Perspektywy badań nad mukowiscydozą są korzystne. Po raz pierwszy w ponad pięćdziesięcioletniej historii badań tego schorzenia zastosowano metody badawcze oraz wysunięto hipotezy badawcze, które pozwolą na dalsze wyjaśnienie podłoża mukowiscydozy i na znalezienie adekwatnych metod leczenia.

Podziękowania

Panu dr Stanisławowi Głazewskiemu dziękuję za sugestie polskich określeń dla metody „patch-clamp”.

Artykuł otrzymano 26 maja 1992 r.

Zaakceptowano do druku 18 grudnia 1992 r.

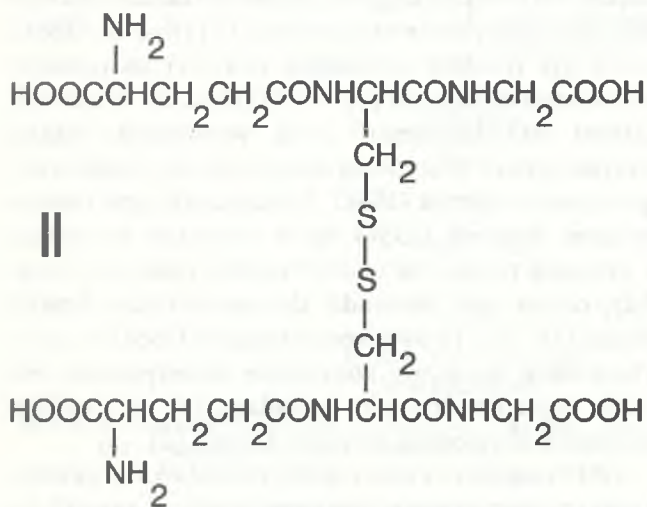
Piśmiennictwo

1. Knowles MR, Gatzy J, Boutcher A (1981) *N Engl J Med* **305**: 1489-1495
2. Quinton PM, Bijman J (1983) *N Engl J Med* **308**: 1185-1189
3. Quinton PM (1983) *Nature* (Lond) **301**: 421-422
4. Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer NL, Gatzy JT, Boucher RC (1983) *Science* **221**: 1067-1070
5. Welsh MJ, Liedtke CM (1986) *Nature* (Lond) **322**: 467-705
6. Widdicombe JH, Welsch MJ, Finkbeiner WE (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6167-6171
7. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL (1989) W: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (red) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill Information Services Company, New York, str 2649-2680
8. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavac N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC (1989) *Science* **245**: 1066-1073
9. Rommens LM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS (1989) *Science* **245**: 1059-1065

10. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC (1989) *Science* **245**: 1073-1080
11. Bal J (1991) *Post Biochem* **37**: 153-158
12. de Jonge HR (1989) *Acta Paediatr Scand Suppl* **363**: 14-18
13. Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1991) *Science* **251**: 679-682
14. Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ, Naismith AL, Sun SZ, Ackerley CA, Reyes EF, Tsui LC, Rommens JM, Bear CE, Riordan JR (1991) *Cell* **64**: 681-691
15. Frizzell RA, Cliff WH (1991) *Nature (Lond)* **350**: 277-278
16. Kwiatkowska J (1991) *Post Biochem* **37**: 122-128
17. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) *Nature (Lond)* **346**: 362-365
18. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ (1991) *Science* **253**: 202-205
19. Quinton PM (1990) *Nature (Lond)* **347**: 226-227
20. Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE (1991) *Cell* **66**: 1027-1036
21. Ringe D, Petsko G (1990) *Nature (Lond)* **346**: 312-313
22. Smith JJ, Welsh MJ (1992) *J Clin Invest* **89**: 1148-1153
23. Wine JJ (1991) *Nature (Lond)* **354**: 503-504
24. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) *Pflugers Arch* **391**: 85-100
25. Sachs F, Auerbach A (1983) *W Methods in Enzymology*, vol. 103. Academic Press, Inc. str 147-176
26. Petersen OH (1989) *W: Fleischer S, Fleischer B (red) Methods in Enzymology*, vol. 171. Academic Press, Inc. Orlando, str 663-678
27. Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq J-P, Lazdunski M (1991) *Nature (Lond)* **354**: 526-528
28. Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW (1991) *Nature (Lond)* **352**: 628-631
29. Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, Mulligan R, Smith AE, Welsh MJ (1991) *J Clin Invest* **88**: 1422-1431
30. Bear CE, Duguay F, Naismith AL, Kartner N, Hanrahan JW, Riordan JR (1991) *J Biol Chem* **266**: 19142-19145
31. Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM (1990) *Cell* **62**: 1227-1233
32. Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ (1990) *Nature (Lond)* **347**: 358-363
33. Rich DP, Gregory RJ, Anderson MP, Manavalan P, Smith AE, Welsh MJ (1991) *Science* **253**: 205-207
34. Gray MA, Pollard CE, Harris A, Coleman L, Greenwell JR, Argent BE (1990) *Am J Physiol* **259**: C752-C761
35. Champigny G, Verrier B, Gerard C, Mauchamp J, Lazdunski M (1990) *FEBS Lett* **259**: 263-268
36. Gray MA, Greenwell JR, Argent BC (1988) *J Membrane Biol* **105**: 131-142
37. Tabcharani JA, Low W, Elie D, Hanrahan JW (1990) *FEBS-Lett* **270**: 157-164
38. Ran S, Benos DJ (1991) *J Biol Chem* **266**: 4782-4788
39. Diener M, Rummel W (1989) *Acta Physiol Scand* **137**: 215-222
40. Champigny G, Verrier B, Lazdunski M (1990) *Biochem Biophys Res Commun* **171**: 1022-1028
41. Li M, McCann JD, Welsh MJ (1990) *Am J Physiol* **259**: C295-C301
42. Pope AJ, Richardson SK, Ife RJ, Keeling DJ (1991) *Biochim Biophys Acta* **1067**: 51-63
43. Drumm ML, Wilkinson DJ, Smit LS, Worrell RT, Strong TV, Frizzell RA, Dawson DC, Collins FS (1991) *Science* **254**: 1797-1799
44. Welsh MJ (1990) *FASEB J* **4**: 2718-2725
45. Cliff WH, Frizzell RA (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4956-4960
46. Ward CL, Krouse ME, Gruenert DC, Kopito RR, Wine JJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5277-5281
47. Wine JJ, Brayden DJ, Hagiwara G, Krouse ME, Law TC, Muller UJ, Solc CK, Ward CL, Widdicombe JH, Xia Y (1991) *Adv Exp Med Biol* **290**: 253-269
48. Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K, Ostedgaard L, Klinger KW, Welsh MJ, Smith AE (1990) *Nature (Lond)* **347**: 382-386
49. Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R, Guggino WB (1991) *Am J Respir Cell Mol Biol* **4**: 313-319
50. Rommens JM, Dho S, Bear CE, Kartner N, Kennedy D, Riordan JR, Tsui LC, Foscett JK (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7500-7504
51. Gregory RJ, Rich DP, Cheng SH, Souza DW, Paul S, Manavalan P, Anderson MP, Welsh MJ, Smith AE (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3886-3893
52. Rogers KV, Goldman PS, Frizzell RA, McKnight GS (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 8975-8979
53. Clancy JP, McCann JD, Welsh MJ (1990) *Am J Physiol* **259**: L410-L414
54. Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, Gruenert DC, Stryer L, Gardner P (1991) *Nature (Lond)* **349**: 793-796
55. Welsh MJ, Li M, McCann JD, Clancy JP, Anderson MP (1989) *Ann N Y Acad Sci* **574**: 44-51
56. Tilly BC, Kansen M, van-Gageldonk PG, van-den-Berghe N, Galjaard H, Bijman J, de-Jonge HR (1991) *J Biol Chem* **266**: 2036-2040
57. Krick W, Disser J, Hazama A, Burckhardt G, Fromter E (1991) *Pflugers Arch* **418**: 491-499
58. Kunzelmann K, Tilmann M, Hansen CP, Greger R (1991) *Pflugers Arch* **418**: 479-490
59. Welsh M, Li M, McCann JD (1989) *J Clin Invest* **84**: 2002-2007
60. Anderson MP, Welsh MJ (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6003-6007
61. Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, Gruenert DC, Stryer L, Gardner P (1991) *Nature (Lond)* **349**: 793-796
62. Davies K (1990) *Nature (Lond)* **348**: 110-111
63. Cohn JA, Melhus O, Page LJ, Dittrich KL, Vigna SR (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **181**: 36-43
64. Sorscher EJ, Kirk KL, Weaver ML, Jilling T, Blalock JE, LeBoeuf RD (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7759-7762
65. Marino CR, Matovcik LM, Gorelick FS, Cohn JA (1991) *J Clin Invest* **88**: 712-716
66. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 9262-9266
67. Trezise AE, Buchwald M (1991) *Nature (Lond)* **353**: 434-437
68. Trapnell BC, Chu CS, Paakko PK, Banks TC, Yoshimura K, Ferrans VJ, Chernick MS, Crystal RG (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 6565-6569
69. Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ (1991) *Cell* **67**: 775-784
70. Montrose-Rafizadeh C, Guggino WB, Montrose MH (1991) *J Biol Chem* **266**: 4495-4499
71. Buchwald M, Sood R, Auerbach W (1991) *Adv Exp Med Biol* **290**: 241-245
72. Chang EB, Bookstein C, Vaandrager A, DeJonge HR, Buse J, Musch MW (1991) *J Lab Clin Med* **118**: 377-381
73. Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ (1991) *J Clin Invest* **89**: 339-349
74. Schmid A, Gogelein H, Kemmer TP, Schulz I (1988) *J Membr Biol* **104**: 275-282
75. Bae H-R, Verkman AS (1990) *Nature* **348**: 637-639
76. Hoogeveen AT, Keulemans J, Willemsen R, Scholte BJ, Bijman J, Edixhoven MJ, De-Jonge HR, Galjaard H (1991) *Exp Cell Res* **193**: 435-437

[7] lecz obecny jest on w wysokim stężeniu w żółci (1-4 mmol/l) [8].

Glutation jest głównym reduktantem i antyoksydantem fazy wodnej komórek (a dzięki temu podstawowym elementem obrony przed stresem oksydacyjnym) i rezerwuarem reszt cysteinowych. Peptyd ten uczestniczy w detoksykacji ksenobiotyków i jonów metali ciężkich oraz w przemianach wielu związków endogennych, jest też niezbędny dla syntezy niektórych prostanoidów.



Wzór II. Disulfid glutationu

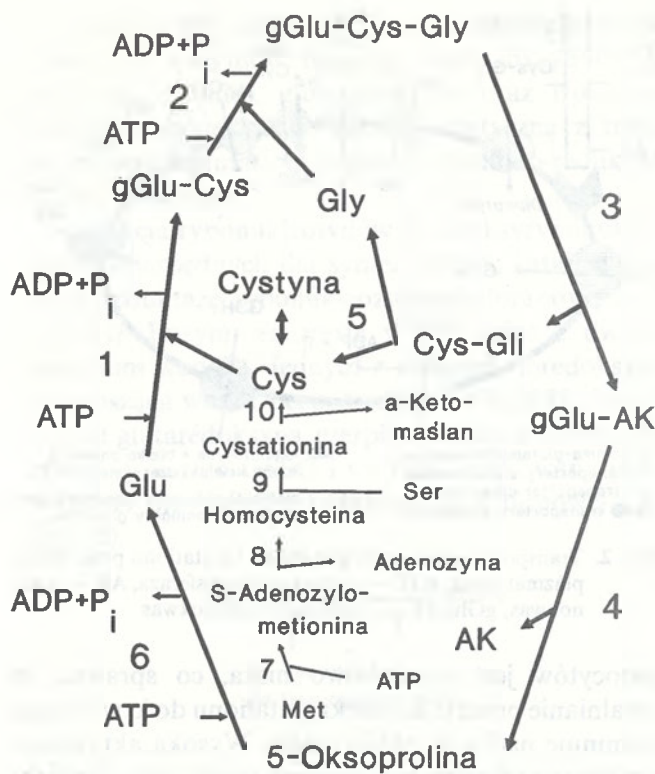
II. Biosynteza i katabolizm

Synteza glutationu zachodzi we wszystkich badanych komórkach eukariotycznych. Synteza i katabolizm glutationu przebiega poprzez cykl γ -glutaminy (Ryc. 1).

Synteza przebiega dwuetapowo (reakcje 1 i 2 na Ryc. 1). Obie reakcje wymagają ATP. W reakcji 1 powstaje γ -glutamylcysteina. Aktywność syntetazy γ -glutamylcysteinowej katalizującej tę reakcję regulowana jest na zasadzie sprzężenia zwrotnego, jest bowiem hamowana przez glutation. Nadmiar glutaminy znosi tę inhibicję [3, 5]. Glutation tworzony jest w reakcji 2 katalizowanej przez syntetazę glutationową.

Osobliwością struktury glutationu jest wiązanie izopeptydowe pomiędzy γ -karboksylową grupą glutaminy a grupą aminową cysteiny. Wiązanie to czyni peptyd opornym na działanie peptydaz. Katabolizm glutationu rozpoczyna więc nie peptydaza, lecz transpeptydaza D-glutamylowa (reakcja 3) przenosząca resztę glutamylową na inny aminokwas (preferowanym substratem jest cysteina). γ -Glutamylcyklotransferaza katalizująca reakcję 4 przekształca resztę glutamylową w 5-oksoprolinę uwalniając aminokwas, który w poprzedniej reakcji był akceptorem tej reszty. Drugi produkt reakcji 4, cysteinylglicyna, hydrolizowana jest przez dipeptydazy, zwłaszcza dipeptydazę cysteinylglicynową (E.C. 3.4.13.6; reakcja 5) [2-5].

Prekursory glutationu przenikają do komórek bądź na zasadzie dyfuzji ułatwionej, bądź drogą kotranspor-

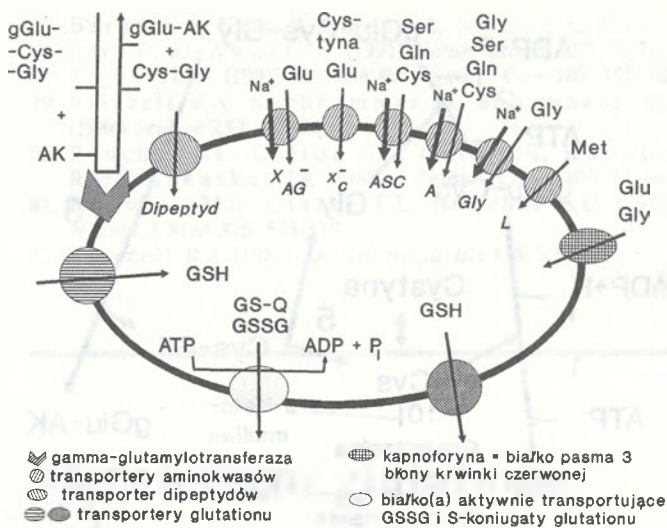


Ryc. 1. Biosynteza i katabolizm glutationu. Mniejszymi literami zaznaczono szlak metioninowy, umożliwiający niektórym komórkom (zwłaszcza hepatocytom) wykorzystanie metioniny do syntezy GSH. Następujące enzymy katalizują poszczególne reakcje: 1 — syntetaza γ -glutamylcysteinowa (E.C. 6.3.2.2), 2 — syntetaza glutationowa (E.C. 6.3.2.3), 3 — transpeptydaza D-glutamylowa (E.C. 2.3.2.1), 4 — γ -glutamylcyklotransferaza (E.C. 2.3.2.4), 5 — 5-oksoprolinaza (E.C. 3.5.2.9), 6 — dipeptydazy, 7 — adenozylotransferaza metioninowa (E.C. 2.5.1.6), 8 — hydrolaza adenozylometioninowa (E.C. 3.3.1.2), 9 — dehydrataza L-serynowa (E.C. 4.2.1.13), 10 — β -liaza cystationinowa (4.4.1.8), AK — aminokwas.

tu z kationami sodowymi, dzięki specyficznym transporterom aminokwasów i dipeptydów [9-14] (Ryc. 2).

W ogólności, glutaminy i glutamina występują w komórkach w dużym nadmiarze w stosunku do cystyny, cysteiny i glicyny, zatem na ogół stężenia tych ostatnich aminokwasów, zwłaszcza cysteiny limitują szybkość syntezy glutationu [10].

Wszystkie komórki wydają się być zdolne do wydzielania GSH lub GSSG. Jednak zdolność do pobierania glutationu w formie zredukowanej lub utlenionej mają tylko niektóre komórki (komórki nerki, prawdopodobnie także komórki nabłonkowe płuc typu II i komórki nabłonka jelitowego) [5, 15]. Większość komórek nie może pobierać glutationu ze środowiska, jednak ma na swej powierzchni γ -glutamylotransferazę przenoszącą resztę γ -glutamylową peptydu na aminokwasy (Ryc. 1, reakcja 4). Cysteinylglicyna i γ -glutamylaminokwasy przenikają przez błonę plazmatyczną przy udziale transporterów dipeptydów (Ryc. 2). Aktywność transglutamylacji na powierzchni komórek jest jednym z czynników decydujących o kierunkach obiegu glutationu w organizmie. Najistotniejszym miejscem syntezy glutationu w organizmie jest wątroba, skąd uwalniany jest on do krwi i do żółci. Aktywność γ -glutamylotransferazy na powierzchni he-



Ryc. 2. Transport prekursorów glutationu i glutationu przez błonę plazmatyczną; gGT — γ -glutamylotransferaza, AK — aminokwas, gGlu-AK — γ -glutamylolaminokwas.

patocytów jest stosunkowo niska, co sprawia, że uwalnianie przez te komórki glutationu do krwiobiegu dominuje nad jego pobieraniem. Wysoka aktywność enzymu na powierzchni komórek nerek, jelita i trzustki decyduje o tym, że narządy te są głównymi konsumentami uwalnianego do krwi glutationu [3-5].

III. Rola fizjologiczna

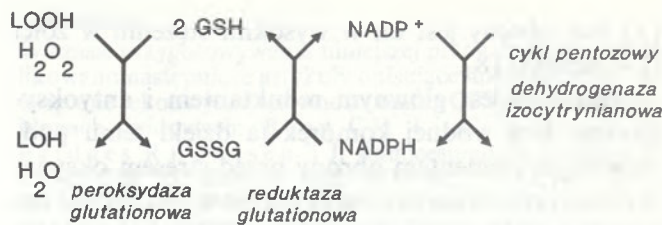
Najważniejszymi funkcjami fizjologicznymi glutationu wydają się być: funkcja głównego wewnątrzkomórkowego „buforu redoks” o dużej pojemności i funkcja „zmiatacza” reaktywnych związków elektrofilowych. Reakcje obu typów mogą zachodzić bez udziału enzymów, jednak w komórkach ssaków powszechnie występują enzymy katalizujące reakcje obu typów. Reaktywność glutationu uwarunkowana jest obecnością w jego cząsteczce grupy tiolowej. Utlenienie grup tiolowych w dwu cząsteczkach glutationu prowadzi do powstania disulfidu glutationu (Wzór II). Potencjał normalny redoks (w pH = 7) E_0' układu GSH/GSSG wynosi — 0,23 V [16]. Układ ten jest więc dobrym reduktorem nadtlenu ($E_0' = + 1,35$ V dla układu H_2O_2/H_2O) [17].



Disulfid glutationu powstający w wyniku redukcji nadtlenu wodoru czy nadtlenu organicznych składników komórek może być wtórnie zredukowany do GSH przez NADPH (potencjał normalny E_0' układu $NAD(P)^+/NAD(P)H + H^+$ wynosi — 0,32 V) [16].



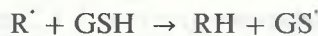
W komórkach ssaków reakcje redukcji nadtlenu wodoru i nadtlenu lipidów przez GSH katalizuje selenoenzym peroksydaza glutationowa (E.C. 1.11.1.9). Reakcję redukcji GSSG przez NADPH katalizuje reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2). Źródłem NADPH jest w krwinkach czerwonych cykl pen-



Ryc. 3. Glutationowy układ redukcji nadtlenu

tozowy. W innych komórkach (np. hepatocytach) więcej NADPH wydaje się jednak dostarczać reakcja dehydrogenazy izocytrynianowej [17] (Ryc. 3). GSSG może być również usuwany z komórki na zasadzie aktywnego transportu [1, 3-5, 18] (Ryc. 2). W stanach „stresu oksydacyjnego” czyli wzmożenia reakcji oksydacyjnych w komórce może dojść do przejściowego wzrostu stężenia GSSG. Sytuacja taka jest niebezpieczna, bowiem GSSG może wchodzić w reakcję z grupami tiolowymi białek tworząc mieszane disulfidy, co na ogół prowadzi do upośledzenia funkcji białek [19, 20]. Podwyższenie stężenia GSSG w mitochondriach może być szczególnie niebezpieczne, bowiem mitochondria nie posiadają, jak się wydaje, zdolności aktywnego eksportu GSSG [2].

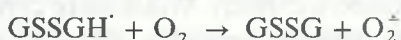
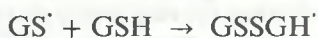
GSH reaguje również z wolnymi rodnikami przekazując im atom wodoru. Reakcja ta może prowadzić do odtworzenia wyjściowej struktury cząsteczki przekształconej w wolny rodnik i nazywana jest często reakcją „naprawy”. Termin ten nie zawsze jest słuszny, bowiem tworzenie wolnego rodnika posiadającego niesparowany elektron na atomie węgla często prowadzi do utraty identyczności stereochemicznej tego atomu:



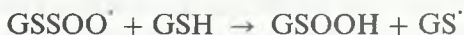
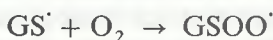
Powstający w reakcji rodnik glutationylowy GS^{\cdot} może dimeryzować tworząc disulfid glutationu



który może być redukowany przez reduktazę glutationową. Rodnik glutationylowy może wchodzić jednak również w inne reakcje. Między innymi, może tworzyć dimerowy rodnik $GSSGH^{\cdot}$ utleniający się do GSSG w reakcji z tlenem:

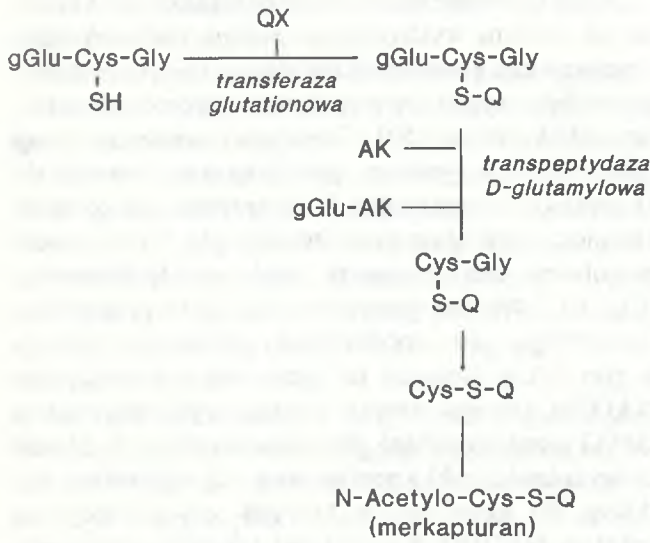


Reakcja rodnika glutationylowego z tlenem daje rodnik nadtlenu glutationu $GSOO^{\cdot}$, który reagując z inną cząsteczką GSH tworzy nadtlenek glutationu $GSOOH$ [21]:



Transferazy glutationowe (E.C. 3.1.27) katalizują tworzenie S-koniugatów glutationu z szerokim spektrem ksenobiotyków, zwłaszcza hydrofobowych (Ryc. 4). Jednym z najczęściej stosowanych w badaniach transferaz glutationowych związków jest 1-chloro-

-2,4-dinitrobenzen. Produktem S-koniugacji tego związku z GSH jest 2,4-dinitrofenyloglutation (Wzór III). Transferazy glutationowe uczestniczą również w metabolizmie takich związków endogennych jak sterydy i leukotrieny. Leukotrien C powstaje w wyniku koniugacji leukotrienu A z glutationem [22, 23].

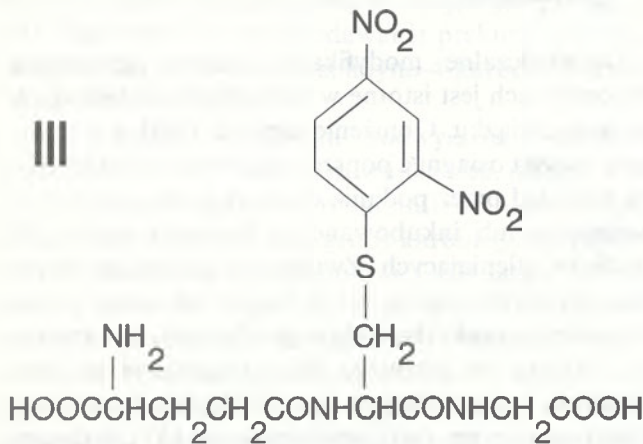


Ryc. 4. Powstawanie S-koniugatów glutationu i merkapturanów. QX — ksenobiotyki, AK — aminokwas.

Tworzenie glutationylo-S-koniugatów ksenobiotyków jest pierwszym etapem detoksykacji tych związków. Znane są jednak związki (chlorowcopochodne alkenów, hydrochinony i aminofenole), których toksyczność zwiększa się w następstwie takiej transformacji [24].

S-koniugaty glutationu usuwane są aktywnie z komórek (Ryc. 2) i ulegają dalszym przekształceniom, prowadzącym najczęściej do powstania merkapturanów. W takim przypadku reszty: γ -glutamyłowa, a następnie glicyłowa ulegają odłączeniu, powstający zaś w wyniku tych reakcji koniugat cysteinowy ulega N-acetylacji. Powstaje wtedy odpowiedni merkapturan, który wydalany jest w moczu [1, 5, 25] (Ryc. 4).

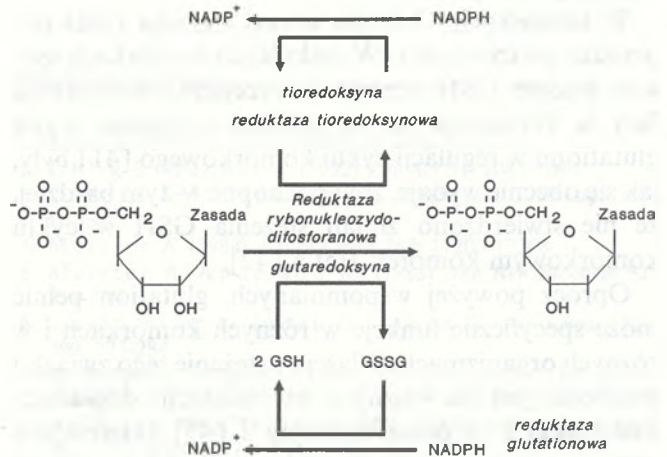
Kolejną z głównych funkcji fizjologicznych GSH jest utrzymanie grup -SH białek w stanie zredukowanym poprzez reakcje transhydrogenacji:



Wzór III. S-Koniugat glutationu: S-(2,4-dinitrofenylo)glutation

Reakcje transhydrogenacji mogą być katalizowane przez kilka enzymów: tiolotransferazę (oksydoreduktazę tiol: disulfid), glutaredoksynę oraz izomerazę disulfidów białek (E.C. 1.8.4.2, identyczną z transhydrogenazą glutation: insulina i disulfido-reduktazą białek) [26-28].

Redukcja rybonukleotydów do deoksyrybonukleotydów, niezbędnych dla syntezy DNA, katalizowana przez reduktazę rybonukleozydodifosforanową (E.C. 1.17.4.1). Enzym ten może współdziałać z dwoma donorami wodoru. Jednym z nich jest tioredoksyna, przenosząca wodór bezpośrednio z NADPH, drugim zaś jest glutaredoksyna, czerpiąca wodór z GSH. GSH utleniany jest do GSSG i wtórnie redukowany przez NADPH przy udziale reduktazy glutationowej [29] (Ryc. 5).



Ryc. 5. Udział glutationu w biosyntezie deoksyrybonukleotydów.

Glutation jest też substratem szeregu innych enzymów, m.in. dehydrogenazy formaldehydowej (E.C. 1.2.1.1), izomerazy maleiloacetoocetanowej (E.C. 5.2.1.2), glioksalazy (E.C. 4.4.1.5 i 3.1.2.6) i izomeraz endonadtlenków prostaglandyn (E.C. 5.3.99.2, 5.3.99.3) [2, 4].

Glutation tworzy stabilne kompleksy z jonami niektórych metali (m.in. rtęci, miedzi, srebra, cynku i chromu). Prawdopodobnie wiąże jony tych metali, gdy dostaną się one do wnętrza komórki (przekazując je następnie metalotioneinie) [30] i gra rolę w ich wydalaniu z żółcią [8].

Wewnątrzkomórkowe stężenia glutationu są dużo wyższe od stężeń cysteiny, glutation pełni więc funkcję magazynu i formy transportowej tego aminokwasu. Jest ona istotna dla wielu komórek, które nie posiadają możliwości biosyntezy cysteiny lub posiadają ją w ograniczonym zakresie [31].

Podwyższenie stężenia glutationu w komórkach zwiększa, a jego obniżenie zmniejsza ich oporność na działanie promieniowania jonizującego [32] i ultrafioletowego [33] hiperoksji, ozonu [34] i szeregu ksenobiotyków [2-5]. Obniżenie stężenia glutationu w wątrobie prowadzi do wzmożenia peroksydacji lipidów w następstwie reperfuzji po niedotlenieniu

narządów [35] oraz ekspozycji na ksenobiotyki [36]. Niekorzystne skutki obniżenia stężenia glutationu w komórkach narażonych na stres oksydacyjny wydają się być uwarunkowane obniżeniem szybkości dwu istotnych reakcji detoksykacyjnych, w których uczestniczy ten związek: reakcji redukcji nadtlenu (katalizowanej przez peroksydazę glutationową) oraz reakcji sprzęgania aldehydów powstających w procesie peroksydacji lipidów (katalizowanej przez transferazy glutationowe) [37, 38]. Ekspozycja na działanie tlenu o podwyższonym ciśnieniu parcjnym powoduje podwyższenie poziomu GSH w płucach szczurów, co ma znamiona reakcji adaptacyjnej [39].

Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy stężeniem glutationu w komórkach nowotworowych a opornością tych komórek na chemioterapię i radioterapię [32, 40].

W komórkach *Chlorella* wzrost stężenia GSH poprzedza podział jądra. W niektórych komórkach ssaków poziom GSH wzrasta po przejściu z fazy G₁ do fazy S. Wysuwane na tej podstawie sugestie o roli glutationu w regulacji cyklu komórkowego [41] były, jak się obecnie wydaje, zbyt pochopne — tym bardziej, że nie stwierdzono zmian stężenia GSH w cyklu komórkowym komórek HeLa [42].

Oprócz powyżej wspomnianych, glutation pełnić może specyficzne funkcje w różnych komórkach i w różnych organizmach. Właściwe stężenie tego związku niezbędne jest dla wiązania, internalizacji i degradacji interleukin 2 i 4 przez limfocyty T [43]. Interesujące jest stwierdzenie obniżenia stężenia glutationu w krwi i w osoczu krwi osób zarażonych wirusem HIV, choć nie jest jasne, czy niedobór glutationu odgrywa rolę w upośledzeniu funkcji komórek układu odpornościowego u tych chorych [43, 44].

Dla stulbi (*Hydra vulgaris*) GSH jest sygnałem indukującym reakcję żerną (serię skoordynowanych ruchów polegających na chwytaniu ofiary i uśmiercaniu jej za pomocą nematocyst, a następnie kurczenie się czułek i rozchylenie się otworu gębowego) [45]. Owady odporne na dichlorodifenylotrichloroetan (DDT) posiadają enzym inaktywujący insektycyd (dehydrochlorynazę DDT, E.C. 4.5.1.1). GSH jest ko-substratem tego enzymu [46].

IV. Genetyczne zaburzenia metabolizmu glutationu

Znane są wrodzone niedobory syntetazy γ -glutamylcysteinowej, syntetazy glutationowej, reduktazy glutationowej, γ -glutamylotranspeptydazy i 5-oksoprolinazy. Ich skutkiem jest obniżenie stężenia glutationu w komórkach. Nie zagraża ono życiu, lecz jego konsekwencją są: częste infekcje, przyspieszone powstawanie zaćmy, anemia hemolityczna i upośledzenie umysłowe [47, 48]. Niedobór γ -glutamylotransferazy prowadzi do podwyższenia stężeń GSH i GSSG w osoczu krwi i wydalania glutationu w moczu [3-5]. U owiec

wykryto dwa typy dziedzicznego niedoboru glutationu w krwinkach czerwonych. Jeden jest uwarunkowany defektem transportera aminokwasów C, drugi zaś niedoborem syntetazy γ -glutamylcysteinowej. W obu przypadkach wrażliwość erytrocytów na stres oksydacyjny ulega podwyższeniu [49].

Osoby dotknięte niedoborem reduktazy GSSG cierpią na wczesne występowanie zaćmy. Podobny efekt obserwowano u noworodków myszy, którym podawano inhibitor syntetazy γ -glutamylcysteinowej, butionosulfoksiminę [50]. Genetycznie uwarunkowany ostry niedobór syntetazy glutationowej prowadzi do akumulacji w organizmie 5-oksoproliny, czego skutkiem jest zagrażająca życiu kwasica [3]. Następstwem niedoboru dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (E.C. 1.1.1.49), pierwszego enzymu cyklu pentozofosforanowego, jest upośledzenie przemiany glukozy w tym cyklu. Oznacza to ograniczenie wytwarzania NADPH, którego stężenie limituje szybkość redukcji GSSG przez reduktazę glutationową (Ryc. 3). Skutki niewydolności cyklu pentozowego są najbardziej dotkliwe dla komórek, w których jest on jedynym źródłem NADPH. Komórkami takimi są erytrocyty i dlatego krwinki czerwone osób dotkniętych niedoborem dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej są bardziej podatne na stres oksydacyjny. Może on być indukowany przez leki o działaniu utleniającym lub niektóre składniki pożywienia (np. nasiona bobu) [51]. Niedobór peroksydazy glutationowej również zwiększa podatność komórek na stres oksydacyjny i prowadzi do anemii hemolitycznych [45].

W tym miejscu warto wspomnieć, że obniżenie stężenia glutationu w komórkach występuje również jako efekt wtórny w niektórych chorobach i zatruciach, w których występuje stres oksydacyjny (choroba Wilsona [52], zatrucie herbicydem bipyrydylowym parakwatem [53]). Podobna sytuacja ma miejsce w zatruciach ksenobiotykami, w których GSH zużywany jest w reakcjach tworzenia koniugatów z metabolitami tych ksenobiotyków (ostre zatrucie etanolem [54], zatrucie alkoholem allilowym [55] i acetoaminofenem [56]).

V. Doświadczalna modyfikacja poziomu glutationu

Doświadczalne modyfikacje stężenia glutationu w komórkach jest istotne w badaniach roli biologicznej tego związku. Obniżenie stężenia GSH w komórkach można osiągnąć poprzez utlenienie go do GSSG, na przykład przez podanie do środowiska, w którym hodowane lub inkubowane są komórki łagodnych środków utleniających. Związkami najczęściej stosowanymi w tym celu są: bis(N,N-dimetyloamid) kwasu diazobenzenodikarboksyłowego (diamid) i adriamycyna. Można też posłużyć się substancjami elektrofilowymi, które sprzęgane są z GSH przez transferazy glutationowe (np. dietylmaleinianem) [57]. Substancje te mogą jednak reagować w komórce nie tylko

z GSH, ale także z białkami, co utrudnia interpretację doświadczeń dotyczących roli glutationu w badanych zjawiskach. Ponadto, trwałemu obniżeniu poziomu GSH przeciwdziała aktywność reduktazy glutationowej. Skuteczniejsze jest poddawanie komórek stresowi oksydacyjnemu przy równoczesnym stosowaniu inhibitora reduktazy glutationowej, N,N'-bis(2-chloroetylo)-N-nitrozomocznika [58].

Znacznie lepszą metodą obniżenia stężenia glutationu zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* jest zablokowanie jego syntezy za pomocą inhibitorów syntetazy γ -glutamylcysteinowej, spośród których najbardziej specyficznym jest butioninosulfoksymina (BSO). Podanie go *in vitro* bądź *in vivo* prowadzi do obniżenia stężenia GSH w komórkach czy organach zwierząt [4, 59]. Wydaje się jednak, że związek ten hamuje nie tylko syntetazę γ -glutamylcysteinową, jest bowiem również inhibitorem transportu cysteiny [60]. W niektórych sytuacjach istotne jest zahamowanie aktywności γ -glutamyltranspeptydazy, co można osiągnąć stosując inhibitory kompetycyjne: L- γ -glutamyl(o-karboksy)fenylohydrazynę lub serynę plus boran, albo (częściej) niekompetycyjny inhibitor enzymu, kwas L-(α S,5S)- α -amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-izooksazolooctowy (acywicynę, związek AT-125) [3, 5, 61].

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że obniżenie stężenia glutationu w komórkach nawet o 30-70% zwykle nie prowadzi do widocznych niekorzystnych następstw, jeśli komórki nie są narażone na stres oksydacyjny. Jest to zrozumiałe, gdyż wartości K_m większości enzymów, których substratem jest GSH są dużo niższe od wewnątrzkomórkowych stężeń tego związku. Umiarkowane zmniejszenie stężenia GSH nie ma zatem istotnego wpływu na szybkości katalizowanych przez nie reakcji [2].

Podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia glutationu można uzyskać podając hodowanym komórkom czy zwierzętom doświadczalnym zwiększone ilości cysteiny, gdyż spośród prekursorów glutationu aminokwas ten jest zwykle czynnikiem limitującym jego syntezę. Szersze stosowanie tej metody ogranicza jednak toksyczność nawet umiarkowanych dawek cysteiny oraz szybkie utlenianie cysteiny przez tlen do cystyny, słabo rozpuszczalnej w obojętnym pH [4, 5, 62]. Skuteczniejsze jest podawanie prekursorów cysteiny, takich jak L-oksofotiadolidyno-4-karboksylian lub N-acetylocysteinę [63].

Interesującym sposobem podwyższenia stężenia glutationu w komórkach zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* jest podawanie monoestrów glutationu, otrzymywanych w wyniku estryfikacji grupy karboksylowej glicyny alkoholami. Estrы alkoholowe GSH łatwo przenikają do komórek i hydrolizowane są przez wewnątrzkomórkowe esterazy do glutationu i odpowiedniego alkoholu. Optymalny jest ester etylowy ze względu na niższą toksyczność etanolu w porównaniu z innymi alkoholami powstającymi podczas hydrolizy [64]. Ester ten stosowano dla podwyższenia stężenia gluta-

tionu zarówno w zawiesinach izolowanych komórek [65, 66], jak i w szeregu narządów myszy (zwłaszcza w wątrobie i w nerce) po podaniu dootrzewnowym czy nawet doustnym [65, 67, 68].

Obniżenie stężenia GSH w komórkach może mieć znaczenie terapeutyczne. Można w ten sposób zwiększyć podatność komórek nowotworowych na radio- i chemioterapię. Możliwe wydaje się w pewnym stopniu selektywne obniżenie stężenia GSH w komórkach nowotworowych, gdyż wiele z nich różni się od komórek prawidłowych pod względem wydajności układów transportujących prekursorы glutationu (np. cystynę) lub aktywności γ -glutamyltranspeptydazy [3, 69-71].

Artykuł otrzymano 11 grudnia 1992 r.

Zaakceptowano do druku 22 stycznia 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Sies H (1989) *Naturwissenschaften* 76: 57-64
2. Uhlig S, Wendel A (1992) *Life Sci* 51: 1083-1094
3. Deneke SM, Fanburg BL (1989) *Am J Physiol* 257: L163-L173
4. Meister A (1988) *J Biol Chem* 263: 17205-17208
5. Meister A, Anderson M (1983) *Ann Rev Biochem* 52: 711-760
6. Slivka A, Mytilineou C, Cohen G (1987) *Brain Res* 409: 275-284
7. Adams JD, Johannessen JN, Bacon JP (1987) *Clin Chem* 33: 1675
8. Ballatori N, Clarkson TW (1985) *Fundamental Appl Toxicol* 5: 816-831
9. Christensen HN (1979) *Adv Enzymol* 49: 41-100
10. Bannai S, Tateishi N (1986) *J Membr Biol* 89: 1-8
11. Bannai S (1986) *J Biol Chem* 261: 2256-2262
12. Fincham DA, Teoh R, Mason DK, Young JD (1989) *Bioch Soc Trans* 17: 541-542
13. Bannai S, Takada A, Kasuga H, Tateishi N (1986) *Hepatology* 6: 1361-1368
14. Anderson ME, Meister A (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 707-711
15. Meister A, Anderson ME, Hwang O (1986) *J Am Coll Nutr* 5: 137-151
16. *Consise Encyclopedia of Biochemistry* (1988) de Gruyter, Berlin, New York, str 529
17. Naqui A, Chance B (1986) *Ann Rev Biochem* 55: 137-166
18. Reed DJ (1986) *Biochem Pharmacol* 35: 7-13
19. Jenkinson SG, Black RD, Lawrence RA (1988) *J Lab Clin Med* 112: 345-351
20. Jenkinson SG, Marcum RF, Pickard JS, Orzechowski Z, Lawrence RA, Jordan JM (1988) *J Lab Clin Med* 112: 471-480
21. Wardman P (1988) W: Sies H, Ketterer B (red) *Glutathione Conjugation. Mechanisms and Biological Significance*. Academic Press, London, str 43-72
22. Ketterer B, Meyer DJ, Taylor JB, Pemble S, Coles B, Fraser G (1990) W: Hayes DJ, Pickett CB, Mantle TJ (red) *Glutathione S-Transferases and Drug Resistance*. Taylor and Francis, London, New York, Philadelphia, str 97-110
23. Kaplowitz N (1980) *Am J Physiol* 239: G439-G444
24. Koob M, Dekant W (1991) *Chem-Biol Int* 77: 107-136
25. Bakke JE (1990) *Drug Metabolism Rev* 22: 637-647
26. Bjelland S, Wallevik K, Kroll J, Dixon JE, Morin JE, Freedman RB, Lambert N, Verandani PT, Nafz MA (1983) *Biochim Biophys Acta* 747: 197-199
27. Mielal JJ, Starke DW, Gravina SA, Hocevar BA (1991) *Biochemistry* 30: 8883-8891

28. Ziegler DM (1985) *Ann Rev Biochem* **54**: 305-329
29. Latham M, Holmgren A (1982) *J Biol Chem* **257**: 6686-6690
30. Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J (1989) *J Biol Chem* **264**: 5598-5605
31. Cho ES, Sahyoun N, Stegink LD (1981) *J Nutr* **111**: 914-922
32. Bump EA, Brown JM (1990) *Pharmacol Ther* **47**: 117-136
33. Connor MMJ, Wheeler LA (1987) *Photochem Photobiol* **46**: 239-245
34. Deneke SM, Lynch BA, Fanburg BL (1985) *J Appl Physiol* **58**: 571-574
35. Stein HJ, Oosthuizen MMJ, Hinder RA, Lamprecht H (1991) *J Surg Res* **50**: 398-402
36. Preece NE, Evans PF, King LJ, Parke DV (1990) *Xenobiotica* **20**: 879-886
37. Michiels C, Remacle J (1988) *Eur J Biochem* **177**: 435-411
38. Spitz DR, Sullivan SJ, Malcolm RR, Roberts RJ (1991) *Free Radical Biol Med* **11**: 415-423
39. Kimball RE, Reddy K, Peirce TH, Schwartz LW, Mustafa MG, Cross CE (1976) *Am J Physiol* **230**: 1425-1431
40. Arrick BA, Nathan CF (1984) *Cancer Res* **44**: 4224-4232
41. Shaw JP, Chou IN (1986) *J Cell Physiol* **129**: 193-198
42. Kosower NS, Kosower EM (1978) *Int Rev Cytol* **54**: 109-160
43. Liang S-M, Lee N, Finbloom DS, Liang C-M (1992) *Immunology* **75**: 435-440
44. Buhl R, Holroyd KJ, Mastrangeli A, Cantin AM, Jaffe HA, Wells FB, Saltini C, Crystal RG (1989) *Lancet* **2**: 1294-1298
45. Grosvenor W, Bellis SL, Kass-Simon G, Rhoads DE (1992) *Biochim Biophys Acta* **1117**: 120-125
46. Lipke H, Kearns CW (1959) *J Biol Chem* **234**: 2123-2128
47. Meister A (1983) W: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Frederickson DS, Goldstein JL, Brown MS (red) *Metabolic Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, str 348-359
48. Marstein S, Jellum E, Nesbakken R, Perry TL (1981) *Clin Chim Acta* **111**: 219-228
49. Young JD, Tucker EM (1983) W: Larsson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B (red) *Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects*. Raven Press, New York, str 373-384
50. Calvin HI, Medvedovsky C, Worgul BV (1986) *Science* **233**: 553-555
51. Arese P, De Flora A (1990) *Sam Hematol* **27**: 1-40
52. Summer KH, Eisenburg J (1985) *Biochem Med* **34**: 107-111
53. Cotgreave IA, Moldeus O, Orrenius S (1988) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **28**: 189-212
54. Israël Y, Speisky H, Lança AJ, Iwamura S, Hirai M, Varghese G (1992) W: Clément B, Guillouzo A (red) *Cellular and Molecular Aspects of Cirrhosis*. John Libbey Eurotext, London, str 25-37
55. Mitchell JR, Thorgeirsson SS, Potter WZ, Jollow DJ, Keiser K (1974) *Clin Pharmacol Therap* **16**: 676-684
56. Kaye CM (1973) *Biochem J* **134**: 1093-1101
57. Bannai S (1984) *J Biol Chem* **259**: 2435-2440
58. Jenkinson SG, Jordan JM, Lawrence RA (1988) *J Appl Physiol* **65**: 2531-2536
59. Coursin DB, Cihla HP (1988) *Am Rev Respir Dis* **138**: 1471-1479
60. Brodie AE, Reed DJ (1985) *Toxicol Appl Pharmacol* **77**: 381-387
61. Allison RD (1988) *Meth Enzymol* **113**: 420-437
62. Olney JW, Ho O-L (1970) *Nature* **227**: 609-611
63. Taylor CG, Bauman PF, Sikorski B, Bray TM (1992) *FASEB J* **6**: 3101-3107
64. Anderson M, Meister A (1989) *Anal Biochem* **183**: 16-20
65. Anderson ME, Powrie F, Puri RN, Meister A (1985) *Arch Biochem Biophys* **239**: 538-548
66. Wellner VP, Anderson ME, Puri RN, Jensen GL, Meister A (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 4732-4735
67. Martensson J, Meister A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 471-475
68. Martensson J, Jain A, Frayer W, Meister A (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5296-5300
69. Meredith MJ, Williams GM (1986) *J Biol Chem* **261**: 4986-4992
70. Reed DJ (1986) *J Radiat Oncol* **12**: 1457-1461
71. Russo A, DeGraff W, Friedman N, Mitchell JB (1986) *Cancer Res* **46**: 2845-2848

KOMUNIKAT I

ZARZĄD GŁÓWNY POLSKIEGO TOWARZYSTWA FLEBOLOGICZNEGO (rok założenia 1991) informuje o rozpoczęciu działalności ogólnopolskiej. Towarzystwo ma charakter interdyscyplinarny i skupia lekarzy oraz wszystkie osoby zainteresowane problemami związanymi z układem żylnym.

Zapraszamy na następujące spotkania naukowe:

— II doroczna KONFERENCJA NAUKOWA PTF pt. „Postępy w leczeniu żylaków kończyn dolnych” (05 czerwca '93, Katowice),

— I KONGRES PTF, temat wiodący: „Zakrzepica żylna” (kwiecień '94, Bielsko-Biała).

Osoby zainteresowane dalszymi informacjami prosimy o kontakt listowny lub telefoniczny.

POLSKIE TOWARZYSTWO FLEBOLOGICZNE
ZARZĄD GŁÓWNY
ul. Ziołowa 47, 40-635 Katowice
Tel. (0-32) 527041 w. 1508 (12⁰⁰—14⁰⁰)

SEKRETARZ GENERALNY
Mgr Bogusław Saucha

PREZES PIF
Dr n. med. Tomasz Drązkiewicz

Analogi witamin D o działaniu antyproliferacyjnym

Vitamin D analogues of antiproliferative activity

ANDRZEJ KUTNER*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Działanie różnicujące i antyproliferacyjne witamin D a efekt wapniowy
- III. Aktywacja i biosynteza witamin D
- IV. Kierunki modyfikacji hormonu witaminowego
 - IV-1. Modyfikacje układu trienowego i grup hydroksylowych
 - IV-2. Dodatkowe hydroksylacje
 - IV-3. Analogi fluorowe
 - IV-4. Analogi tlenowe
 - IV-5. Modyfikacje szkieletu węglowego łańcucha bocznego
- V. Projektowanie struktury nowych analogów hormonu witaminowego
- VI. Strategia syntezy analogów hormonu witaminowego zmodyfikowanych w łańcuchu bocznym
- VII. Synteza dihomooanalogów witaminy D₂
- VIII. Współbieżna metoda syntezy analogów witamin D₂ i D₃
- IX. Aktywność biologiczna nowych analogów

Contents:

- I. Introduction
- II. Cell differentiation and antiproliferative activity of vitamins D and calcemic effect
- III. Activation and biosynthesis of vitamins D
- IV. Structural modifications of vitamin D hormone
 - IV-1. Triene system and hydroxyl groups
 - IV-2. Additional hydroxylations
 - IV-3. Fluorine analogues
 - IV-4. Oxa-analogues
 - IV-5. Hydrocarbon backbone of side chain
- V. Design of novel analogues of vitamin D hormone
- VI. Synthetic strategy of side-chain modified analogues of vitamin D hormone
- VII. Synthesis of dihomooanalogues of vitamin D₂
- VIII. Concurrent synthesis of analogues of vitamin D₂ and D₃
- IX. Biological activity of new analogues

Wykaz stosowanych skrótów: 1,25-(OH)₂D₃ — 1,25-dihydroksywitamina D₃, 1,25-dihydroksycholecalciferol, hormon witaminowy; 1 α -OH-D₃ — 1 α -hydroksywitamina D₃; 25-OH-D₃ — 25-hydroksywitamina D₃

I. Wstęp

W dziedzinie badań nad związkami steroidowymi szczególne zainteresowanie wzbudza od niedawna grupa witamin D. Jednym z powodów ponownego

zainteresowania tymi związkami było wykrycie ich działania antyproliferacyjnego i różnicującego komórki białaczkowe *in vitro*. Działanie antyproliferacyjne analogów witamin D, a w szczególności jej głównej formy aktywnej, tzw. hormonu witaminowego, przejawiało się również w skutecznym hamowaniu nadmiernego namnażania się komórek naskórka w pewnych odmianach łuszczyca. W odróżnieniu od szeregu innych związków o działaniu cytostatycznym, działanie aktywnych analogów hormonu witaminowego na komórki dotknięte wczesnymi zmianami chorobowymi ma charakter niedestrukcyjny. W miejsce niszczenia chorych komórek pewne analogi hormonu witaminowego stymulują ich przekształcenie się w kierunku komórek normalnych. Z uwagi na nowe własności biologiczne i potencjalne zastosowania terapeutyczne w onkologii i dermatologii grupa witamin D stała się w ostatnich latach przedmiotem interdyscyplinarnych badań w dziedzinie chemii medycznej, biochemii i biologii molekularnej.

II. Działanie różnicujące i antyproliferacyjne witamin D a efekt wapniowy

Od początku lat osiemdziesiątych nastąpił ponowny wzrost zainteresowania grupą związków sekosteroidowych określaną wspólną nazwą witamin D. Jednym z głównych czynników inicjujących podjęcie nowych interdyscyplinarnych badań w tej dziedzinie było wykrycie działania różnicującego głównej formy aktywnej witaminy D₃, tzn. 1,25-dihydroksycholecalciferolu [1,25-(OH)₂D₃].

Tego przełomowego odkrycia dokonała grupa badaczy japońskich z Uniwersytetu w Tokio kierowana przez Tatsu Suda. Stwierdzono, że 1,25-(OH)₂D₃ stymuluje różnicowanie się komórek promielocytarnych u myszy M1 w kierunku ich form dojrzałych typu monocytów [1]. Wkrótce okazało się również, że ten sam związek działa stymulująco na różnicowanie się ludzkich komórek promielocytarnych do monocytów w kulturze komórkowej [2], przy jednoczesnym korzystnym hamowaniu ich proliferacji. Badania wykonane przy użyciu linii komórkowej HL-60 [3], wyprowadzonej od pacjentów z chroniczną białaczką szpikową. Stężenie hormonu witaminowego w hodowli komórkowej, konieczne do wywołania efektu różnicowania, było jednakże o rząd wielkości wyższe od fizjologicznego.

* dr, Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

Główna aktywność biologiczna hormonu witaminowego, określana mianem działania wapniowego, polega na utrzymaniu homeostazy wapniowo-fosforowej w organizmie poprzez jelitowe wchłanianie wapnia, uruchamianie wapnia z kości oraz absorpcję wapnia w nerkach. Z uwagi na silne działanie wapniowe [4] hormonu witaminowego w organizmie, podwyższenie jego stężenia powyżej poziomu fizjologicznego spowodowałoby przede wszystkim gwałtowny niekorzystny efekt wapniowy (hiperkalcemia, hiperkalciuria, kalcyfikacja tkanek miękkich, etc.), a dopiero później ewentualne działanie różnicujące. Było więc oczywiste, że hormon witaminowy, w swojej naturalnej postaci, może mieć jedynie ograniczone zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Odkrycia badaczy japońskich stały się jednak impulsem do szerokiego zainteresowania grupą witamin D jako źródłem potencjalnych środków przeciwnowotworowych.

Początkowo przypuszczano, że może istnieć inny związek z licznej grupy aktywnych biologicznie naturalnych form witamin D [5], który wykaże podobne działanie w niższym stężeniu, a tym samym stanie się użyteczny terapeutycznie. Okazało się jednak, że tego typu profil aktywności biologicznej wykazały niektóre syntetyczne analogi witamin.

W połowie lat osiemdziesiątych dokonano przypadkowo odkrycia drugiej formy działania antyproliferacyjnego witamin D. S. M o r i m o t o z Uniwersytetu w Osace zauważył [6], że u pacjenta leczonego na osteoporozę za pomocą 1α -hydroksycholecalciferolu (1α -OH- D_3) ustąpiły zmiany łuszcycowe, polegające na nadmiernej proliferacji komórek naskórka i ich zahamowanym różnicowaniu się [7]. Podobne obserwacje poczyniono w tym samym czasie dla kultury ludzkich fibroblastów [8]. Obserwacja M o r i m o t o została następnie potwierdzona [9] w rozszerzonych badaniach. Ponadto stwierdzono, że skuteczne działanie przeciwłuszcycowe wykazuje nie tylko 1α -OH- D_3 , tzn. syntetyczny prekursor hormonu witaminowego, ale i sam hormon [10]. Skuteczne działanie obu witamin wiązało się jednak z występowaniem istotnego, chociaż w wielu przypadkach odwracalnego, niekorzystnego efektu wapniowego [11].

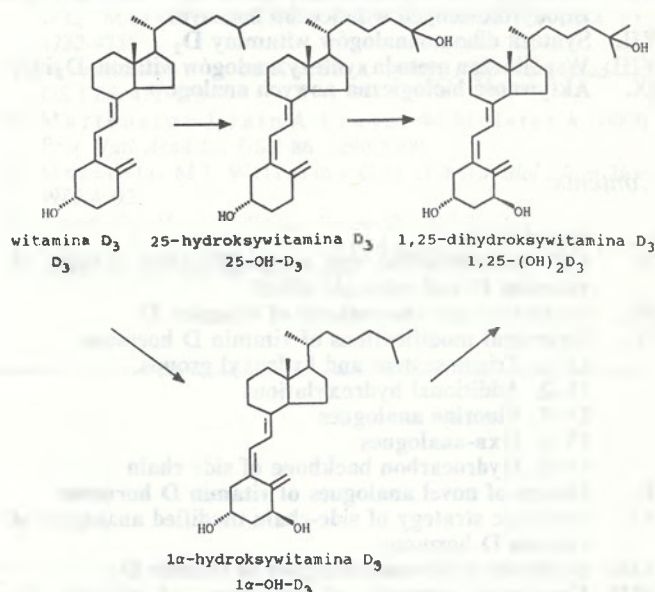
Jednym z głównych celów badań w dziedzinie witamin D stało się więc uzyskanie korzystnego różnicowania własności biologicznych hormonu witaminowego metodą selektywnych modyfikacji chemicznych jego struktury. Badania te zmierzały w kierunku otrzymania syntetycznego analogu hormonu witaminowego o korzystnie obniżonym głównym działaniu wapniowym przy zachowanym lub wzmocnionym działaniu antyproliferacyjnym. Dopiero cztery lata później uzyskano potwierdzenie hipotezy, że takie zmodyfikowanie własności biologicznych tej samej substancji czynnej jest w ogóle możliwe [12]. W wyniku kolejnych trzech lat intensywnych badań uzyskano efekt biologiczny bardzo już zbliżony do zamierzonego [13].

W ten sposób grupa witamin D stała się fascynującym obiektem prac chemicznych, opartych i stymulowanych przez kolejne wyniki badań biologicznych, zmierzających do otrzymania związków syntetycznych o zaplanowanym profilu aktywności.

III. Aktywacja i biosynteza witamin D

Z punktu widzenia dalszych rozważań wydaje się konieczne prześledzenie głównych dróg aktywacji witamin D w organizmie oraz zasadniczych etapów jej biosyntezy.

Podobnie jak inne witaminy z grupy D, witamina D_3 w swej pierwotnej postaci nie jest aktywna biologicznie. Dopiero w wyniku dwustopniowej aktywacji w organizmie powstaje jej główna forma aktywna. Pierwszy stopień aktywacji następuje w mikrosomach komórek wątroby [14] i prowadzi do wytworzenia 25-hydroksywitamin D_3 (25-OH- D_3). W wyniku kolejnej hydroksylacji w mitochondriach komórek kanalikowych nerek [15] powstaje $1\alpha,25$ -dihydroksywitamina D_3 [$1,25$ -(OH) $_2D_3$], uważana obecnie za główną aktywną formę witaminy.



Ryc. 1. Aktywująca hydroksylacja witaminy D_3 w organizmie.

Jej zasadnicze działanie biologiczne wyraża się w wyniku oddziaływania kompleksu receptorowo-witaminowego z regionem regulacyjnym DNA i uruchomienia transkrypcji genów odpowiedzialnych za kodowanie białek związanych z transportem wapnia i fosforu [16]. Tak więc ma ona z definicji działanie hormonalne i stąd $1\alpha,25$ -dihydroksywitamina D_3 jest nazywana hormonem witaminowym. Działanie tego hormonu polega na utrzymaniu homeostazy wapniowo-fosforowej poprzez stymulowanie wchłaniania wapnia i fosforu w jelitach, mineralizacji i uruchamiania wapnia z kości oraz reabsorpcji wapnia w nerkach [17]. Niedawne wykrycie receptora hormonu witaminowego w jądrach komórkowych szeregu organów [18] uważanych dotychczas za niezwiązane z działa-

niem biologicznym witaminy może sugerować, że działanie biologiczne witaminy D jest znacznie bardziej rozległe od dotychczas poznanego. Istotnym dla obecnego kierunku badań okazało się wykrycie występowania receptora hormonu witaminowego w wielu liniach komórek i guzów nowotworowych [19].

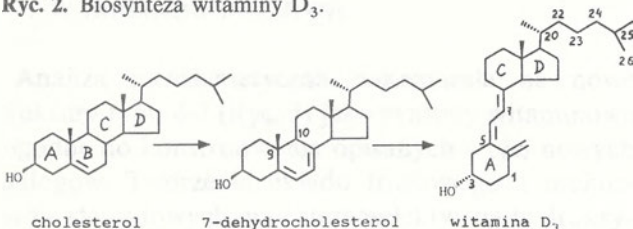
Istnieją jednak dwa zasadnicze czynniki ograniczające ewentualne stosowanie terapeutyczne hormonu witaminowego w jego naturalnej postaci. Jednym z nich jest, wspomniane poprzednio, wyższe od fizjologicznego stężenie hormonu witaminowego, konieczne do wywołania efektu różnicowania się komórek nowotworowych. Drugi to odwracalność działania różnicującego, które trwa tak długo, jak długo podawany jest hormon.

Przedstawione na schemacie aktywne metabolity oraz syntetyczny analog witaminy D₃ są również stosowane w licznych schorzeniach związanych z zakłóceniem procesu aktywacji witaminy D₃ do jej formy hormonalnej lub obniżonym poziomem tej postaci witaminy w organizmie. Wszystkie te związki są obecnie wytwarzane w Instytucie Farmaceutycznym jako substancje stanowiące składniki czynne leków.

Procesom aktywacji w pełni analogicznym do przedstawionych na schemacie ulega również witamina D₂, stosowana wraz ze swymi aktywnymi metabolitami na kontynencie amerykańskim, w miejsce witaminy D₃ preferowanej od lat w Europie.

Biogenetycznie, witamina D₃ wywodzi się z cholesterolu. Jego metabolit, 7-dehydrocholesterol, ulega w skórze, pod działaniem promieni ultrafioletowych, serii skomplikowanych przemian fotochemicznych oraz izomeryzacji termicznej prowadzącej do wytworzenia układu (5Z,7E)-9,10-sekosteroidowego stanowiącego podstawę struktury witamin D.

Ryc. 2. Biosynteza witaminy D₃.



Syntetyczne metody transformacji analogu 7-dehydrocholesterolu do odpowiedniego syntonu witaminowego (głównego fragmentu cząsteczki witaminy) opisano w dalszej części pracy.

IV. Kierunki modyfikacji hormonu witaminowego

Modyfikacje hormonu witaminowego, zmierzające do uzyskania zróżnicowania jego aktywności, objęły stopniowo wszystkie główne elementy strukturalne jego cząsteczki. Początkowe próby syntetyczne koncentrowały się wokół charakterystycznego dla witamin układu trienowego oraz typowego dla hormonu wita-

minowego układu (1R,3S) grup hydroksylowych. Rozległą grupę modyfikacji chemicznych stanowią analogi syntetyczne, związane również z badaniami dróg metabolizmu witaminy D, a zawierające dodatkowe grupy hydroksylowe, głównie w łańcuchu bocznym. Silnie eksplorowana, szczególnie przez ośrodki japońskie, jest grupa analogów fluorowych. Przedmiotem licznych prac syntetycznych są również analogi, w których jeden z atomów węgla łańcucha bocznego, lub ostatnio, pierścienia cykloheksanowego, jest zastąpiony atomem tlenu.

IV-1. Modyfikacje układu trienowego i grup hydroksylowych

Otrzymano i zbadano [14] wszystkie możliwe izomery naturalnego układu 1S,3R,5Z pierścienia A i podwójnego wiązania przy C-5 układu trienowego. Okazało się, że jakiegokolwiek modyfikacje tego fragmentu cząsteczki witaminy prowadzą do obniżenia aktywności wiązania się analogu z receptorem hormonu witaminowego [20]. Szczególnie istotna okazała się konfiguracja grupy hydroksylowej przy C-1. Jej inwersja prowadzi do drastycznego obniżenia aktywności wiązania o trzy rzędy wielkości.

IV-2. Dodatkowe hydroksylacje

Wprowadzenie dodatkowej grupy hydroksylowej do łańcucha bocznego hormonu witaminowego, analogicznie do deaktywującej hydroksylacji w procesie metabolizmu witaminy D, powoduje zwykle kilkukrotne obniżenie aktywności analogu w badaniach na linii komórkowej HL-60. I tak, (1S,24R)-1,24,25-trihydroksywitamina D₃ jest czterokrotnie mniej aktywna od hormonu witaminowego [21-23]. Natomiast zmiana położenia grupy hydroksylowej z C-25 do C-24R nie powoduje obniżenia aktywności analogu [23]. Okazało się jednak, że istotne znaczenie ma konfiguracja grupy hydroksylowej przy C-24. Aktywność 24S epimeru jest o połowę niższa od hormonu witaminowego [23].

IV-3. Analogi fluorowe

W grupie fluorowych analogów hormonu witaminowego szczególnie interesujące okazały się pochodne zawierające podstawniki trifluorometylowe przy terminalnym atomie węgla łańcucha bocznego [24]. Związki te okazały się blisko dziesięciokrotnie bardziej aktywne w hamowaniu proliferacji i indukowaniu różnicowania komórek linii HL-60 niż hormon witaminowy [25]. Jednakże aktywność wapniowa tych analogów jest również kilkukrotnie wyższa od wyjściowego hormonu. Ponadto niektóre z tych analogów wykazują przedłużone działanie w podwyższaniu stężenia wapnia i fosforu w surowicy krwi [25]. Wydaje się więc, że potencjalne zastosowania tych

związków leżą raczej w grupie aktywnych stymulatorów wapniowych niż czynników przeciwnowotworowych [26].

IV-4. Analogi tlenowe

Niedawno otrzymano dwa analogi hormonu witaminowego zawierające atom tlenu w strukturze szkieletu łańcucha bocznego [27, 28]. We wstępnych badaniach biologicznych oba analogi wykazują wyższą w stosunku do hormonu witaminowego aktywność w układzie modelowym HL-60 [27, 28] oraz korzystny brak aktywności w jednym z testów wapniowych, jakim jest badanie uruchamiania wapnia z kości [28]. Pełne wyniki badań aktywności biologicznej tych analogów nie zostały jeszcze opublikowane.

IV-5. Modyfikacje szkieletu węglowego łańcucha bocznego

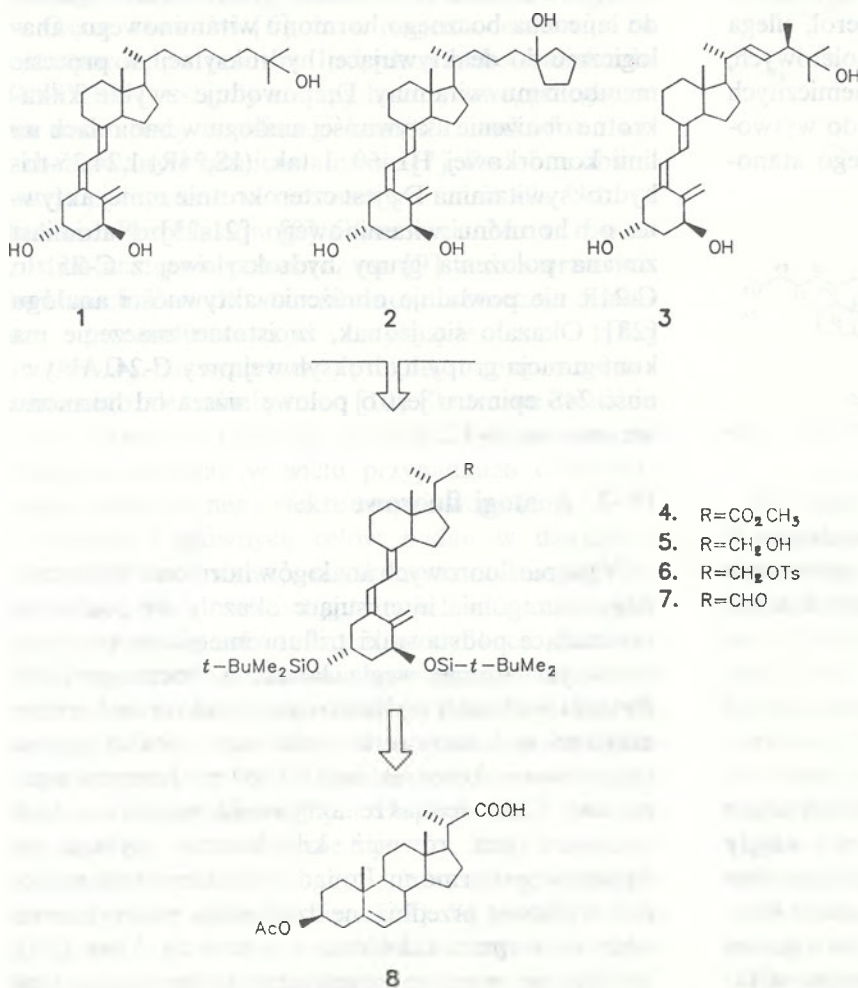
W celu ustalenia struktury chemicznej nowego metabolitu (24R)-25-hydroksywitaminy D₂ zsyntetyzowano dwa nowe analogi hormonu witaminowego o łańcuchu bocznym przedłużonym przy C-24 (24-homo) lub C-26 oraz ich C-22 nienasycone odpowiedniki [29]. Jeden z nich, 1,25-dihydroksy-22-dehydro-26-homowitamina D₃, okazał się identyczny z produktem naturalnym [30]. Natomiast 24-homo-

i 26-homoanalogi wykazały w testach na linii komórkowej HL-60 dziesięciokrotnie wyższą aktywność od hormonu witaminowego [31]. W badaniach *in vivo* oba analogi wykazały podobną do hormonu witaminowego aktywność w stymulowaniu transportu wapnia w jelitach. W badaniach uruchamiania wapnia z kości 24-homoanalog okazał się mniej aktywny, natomiast 26-homoanalog bardziej aktywny od hormonu witaminowego [31]. 26,27-dihomoanalog oraz seria analogów [32, 33] o rozbudowanych podstawnikach alkilowych przy C-25 wykazała taką samą jak hormon witaminowy lub obniżoną aktywność na modelu HL-60.

Analogi o skróconym łańcuchu bocznym [34] wykazały również korzystne obniżenie aktywności wapniowej. Związane było z tym jednak znaczne obniżenie aktywności w testach na modelu HL-60 [15, 34]. Usunięcie każdego kolejnego atomu węgla w łańcuchu bocznym powoduje dalszy spadek aktywności antyproliferacyjnej o blisko jeden rząd wielkości [23].

V. Projektowanie struktury nowych analogów hormonu witaminowego

Analiza opisanych w punkcie IV modyfikacji strukturalnych i odpowiadających im zmian własności biologicznych [32, 33] wykazuje, że główną dziedziną poszukiwania nowych analogów o korzystnie róż-



Ryc. 3. Nowa strategia syntezy analogów witamin D zmodyfikowanych w łańcuchu bocznym — analiza retrosyntetyczna. 1, 2 — Dihomoanalogi hormonalnej formy witaminy D₃, 3 — analog hormonalnej formy witaminy D₂.

nicowanej aktywności może być grupa związków o rozbudowanym szkielecie węglowym łańcucha bocznego.

Na tej podstawie opracowano struktury nowych analogów hormonu witaminowego (Ryc. 3, związki 1 i 2).

Nowe analogi zaprojektowano w celu zbadania konsekwencji biologicznych dalszego rozbudowania łańcucha bocznego oraz w celu uzyskania pełnego rozdzielania działania wapniowego i różnicującego hormonu witaminowego.

Zgodnie z tym projektem łańcuch boczny nowych związków jest powiększony o dwa dodatkowe atomy węgla dołączone do podstawowej struktury hormonu witaminowego na dwa różne sposoby: alifatyczny (analog 1) oraz alicykliczny (analog 2). Związki 1 i 2 są analogami witaminy D₃. Odpowiadające im związki, zawierające dodatkowe wiązanie podwójne przy C-22 oraz związek 3 (Ryc. 3) są analogami hormonalnej formy witaminy D₂. Pochodna cyklopentanowa 2 jest pierwszym analogiem hormonu witaminowego zawierającym pierścień alicykliczny w łańcuchu bocznym. W dalszych planach przewidywano syntezę analogów zawierających dodatkowe atomy węgla wprowadzone zarówno pomiędzy atomami węgla C-22 i C-25 jak i dołączone do terminalnych atomów węgla C-26 i/lub C-27, a także analogi zawierające w łańcuchu bocznym dodatkowe centra chiralne. Wydawało się więc celowe opracowanie metody syntezy prowadzącej do otrzymania nie tylko analogów 1-3, lecz także pozwalającej na dogodne konstruowanie dalszych analogów witamin z serii D₃ i D₂ zmodyfikowanych w łańcuchu bocznym [35].

VI. Strategia syntezy analogów hormonu witaminowego zmodyfikowanych w łańcuchu bocznym

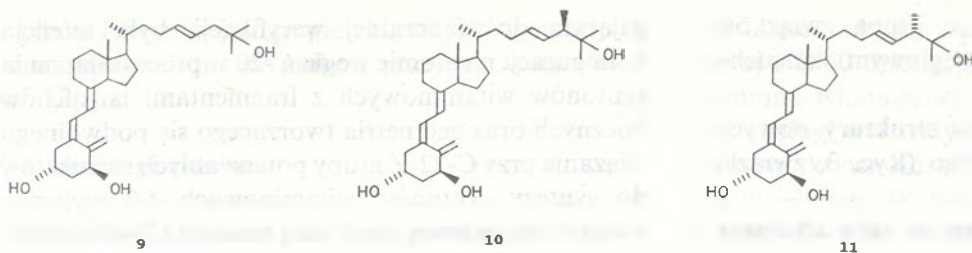
Analiza retrosyntetyczna wskazywała na nowe struktury typu 4-7 (Ryc. 3) jako syntony witaminowe dogodne do konstruowania opisanych wyżej nowych analogów. Tworzenie układu trienowego z prekursorów steroidowych oraz stereoselektywną hydroksylację przy C-1, tzn. procesy stanowiące zwykle końcowy fragment syntezy analogów witamin, zostały tu przesunięte na początek syntezy. Strategia ta eliminowała konieczność powtarzania obu tych żmudnych i niskowydajnych kilkietapowych procedur w syntezie każdego kolejnego analogu. Stwarzała jednak szereg nowych problemów syntetycznych i preparatywnych. Najważniejsze z nich wynikały z konieczności prowadzenia dalszej części syntezy (tzn. dołączenia łańcucha bocznego i usunięcia grup aktywujących i zabezpieczających) przy użyciu zwykle nietrwałych i wrażliwych na szereg czynników związków witaminowych.

Nowe zagadnienia syntetyczne wiązały się z opracowaniem metody tworzenia funkcji aldehydowej przy C-22. Istotnym problemem stereochemicznym, wyma-

gającym doświadczalnej weryfikacji, była retencja konfiguracji na atomie węgla C-20 w procesie łączenia syntonów witaminowych z fragmentami łańcuchów bocznych oraz geometria tworzącego się podwójnego wiązania przy C-22. Z grupy potencjalnych substratów do syntezy syntonów witaminowych 4-7 wybrano związek steroidowy, pochodną kwasu 22,23-dinorchołanowego (8, (Ryc. 3)). Główny synton witaminowy, jakim jest C-22 alkohol 5 otrzymano [35, 36] według klasycznego schematu syntezy witamin z odpowiednich prekursorów steroidowych. Aldehyd 7, stanowiący produkt wyjściowy do syntezy C-22 nienasyconych analogów otrzymano dwoma metodami [35-38]. Fragmenty łańcuchów bocznych nowych analogów otrzymano znanymi metodami z dostępnych handlowo surowców. We wszystkich przypadkach użyto grupy sulfonowej do stabilizowania karboanionów wytworzonych w procesach sprzęgania tych fragmentów z odpowiednimi syntonami witaminowymi. Kluczowym etapem syntezy jest łączenie syntonu witaminowego 6 lub 7 z odpowiednim fragmentem łańcucha bocznego. W ten sposób, metodą alkilowania odpowiedniego deprotonowanego sulfonu łańcucha bocznego za pomocą tosyłanu witaminowego 6 otrzymano, po usunięciu grup aktywujących i zabezpieczających, analog 1 lub 2. Kondensacja aldehydu 7 z odpowiednim chiralnym sulfonem fragmentu łańcucha bocznego doprowadziła do otrzymania analogu 3 o pożądanej geometrii *trans* olefiny przy C-22. W ten sposób wykazano również możliwość łatwego wytworzenia nową metodą preparatywnych ilości otrzymanego wcześniej inną metodą [39] analogu witaminy D₂. W sposób zbliżony do opisanego wyżej otrzymano również analog związku 1 [40] zawierający dodatkowe wiązanie podwójne przy C-22.

VII. Synteza dihomooanalogów witaminy D₂

W poprzednich badaniach [40] stwierdzono, że obecność dodatkowego wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym witamin D przy C-22, tzn. w położeniu typowym dla witaminy D₂, nie zmienia w istotny sposób profilu aktywności antyproliferacyjnej analogu. Późniejsze prace [44] wykazały jednak udział tego wiązania podwójnego w deaktywującym metabolizmie niektórych syntetycznych analogów witamin D. Wydawało się więc celowe dokładne zbadanie wpływu tego elementu strukturalnego na aktywność biologiczną analogu. W tym celu zaprojektowano struktury nowych analogów 9-11 (Ryc. 4), w których wspomniane wiązanie podwójne zostało formalnie przesunięte z naturalnego położenia przy C-22 do położenia przy C-24. W ten sposób związki 10 i 11 stanowią również pierwsze analogi witaminy D₂ o przedłużonym łańcuchu bocznym [45]. W projektowaniu syntezy analogów 9-11 dokonano dalszej modyfikacji opisanej powyżej strategii syntezy. W miejsce stosowanego poprzednio syntonu witaminowego C₂₂ zastoso-



Ryc. 4. Struktury pierwszych dihomologów hormonalnej formy witaminy D₂.

wany został nowy synton witaminowy C₂₄. Synton ten został otrzymany [45] z naturalnego (C₂₄) hiodezoksycholanu metylu. Poprzedni synton C₂₂ otrzymano z kwasu 22,23-dinorcholanowego (8, (Ryc. 3), powstałego w wyniku usunięcia dwóch terminalnych atomów węgla z cząsteczki kwasu cholanowego na drodze dwukrotnej oksydacyjnej dekarboksylacji. Synton ten stwarzał możliwości syntezy analogów zarówno o skróconym jak i przedłużonym łańcuchu bocznym. Po wykryciu szczególnie korzystnych własności tej drugiej grupy analogów, wydaje się znacznie dogodniejsze stosowanie nowego syntonu C₂₄.

VIII. Współbieżna metoda syntezy analogów witamin D₂ i D₃

Z uwagi na wzrastające zainteresowanie analogami zarówno z serii witaminy D₃ jak i D₂ opracowano również metodę pozwalającą na dogodne otrzymanie obu serii analogów witaminowych z tych samych związków pośrednich [46]. W syntezie wykorzystano nowy synton witaminowy C₂₂, w którym układ trienowy został zabezpieczony w formie adduktu Dielsa-Aldera. Synton ten został zaprojektowany w celu uzyskania możliwości dokładnego zbadania przebiegu głównego etapu syntezy analogów witamin D. Etap ten, jak wspomniano w części VI, polega na kondensacji syntonu witaminowego z fragmentem łańcucha bocznego w reakcji olefinowania metodą Julia. Metoda ta jest często stosowana w reakcjach łączenia fragmentów strukturalnych w wielu grupach związków naturalnych. Jednakże dotychczas mieszanina β-hydroksysulfonów, powstających jako związki pośrednie w reakcji Julia, nie była rozdzielana, lecz poddawana w całości kolejnej reakcji dehydroksy-desulfonylowania. Dzięki użyciu nowego syntonu witaminowego [46] okazało się po raz pierwszy możliwe rozdzielanie i identyfikacja wszystkich czterech izomerycznych β-hydroksysulfonów. Z kolei rozdzielanie β-hydroksysulfonów pozwoliło na zastosowanie metody rodnikowej dehydroksylacji B a r t o n a do usunięcia grupy hydroksylowej przy C-22 z utworzeniem odpowiedniego analogu witaminy D₃.

IX. Aktywność biologiczna nowych analogów hormonu witaminowego

Dużym zaskoczeniem były wyniki badań aktywności biologicznej nowych analogów 1 i 2 (Ryc. 3). Nastąpiło bowiem znacznie bardziej korzystne niż

oczekiwano zróżnicowanie aktywności biologicznej [40, 41]. Oba analogi wykazały wyższą od hormonu witaminowego aktywność w stymulowaniu różnicowania i hamowaniu proliferacji komórek nowotworowych linii HL-60.

Zbadany dotychczas najbardziej szczegółowo [42] analog 1 okazał się pięć do dziesięciu razy bardziej aktywny od hormonu witaminowego w indukowaniu różnicowania komórek linii HL-60 w hodowli komórkowej [40]. Stwierdzono nie tylko korzystne obniżenie, ale całkowity zanik niektórych form aktywności wapniowej tego analogu. Wykazywał on [40] całkowity brak aktywności w procesie mineralizacji kości oraz ponad dziesięciokrotnie niższą od hormonu witaminowego aktywność w stymulowaniu transportu wapnia w jelitach i uruchamianiu wapnia z kości. Tak więc stwierdzono, że analog 1 wykazuje typ aktywności właściwy dla projektowanego środka przeciwbiałaczkowego. Jednocześnie okazało się, że aktywność wiązania się analogu z receptorem, uważana dotychczas za miarę jego aktywności biologicznej i podstawę wstępnej selekcji syntetycznych analogów, nie wykazuje ścisłej korelacji z aktywnością antyproliferacyjną analogu [40].

Wyniki badań aktywności analogu 1 zostały również potwierdzone przez innych autorów, którzy otrzymali później ten sam związek inną metodą [43]. Ostatnio analog 1 stał się pewnego rodzaju standardem przy określaniu aktywności analogów hormonu witaminowego [42]. Analog 2 wykazywał zarówno wysoką aktywność antyproliferacyjną jak i wapniową [41]. Okazał się blisko pięciokrotnie bardziej aktywny od hormonu witaminowego w indukowaniu różnicowania się komórek białaczkowych. Jego aktywność w stymulowaniu jelitowego transportu wapnia była zbliżona do aktywności hormonu witaminowego, natomiast analog ten był bardziej aktywny w uruchamianiu wapnia z kości. Ze względu na szczególnie profil aktywności analog 2 może znaleźć zastosowanie jako czynnik regulujący poziom wapnia.

Określenie profilu aktywności analogów 9-11 znajduje się we wstępnej fazie badań biochemicznych. Oczekuje się szczególnie korzystnych własności analogów 10 i 11, z uwagi na stwierdzone niedawno ogólnie słabsze działanie toksyczne analogów witaminy D₂ w porównaniu do odpowiednich analogów witaminy D₃.

Artykuł otrzymano 18 listopada 1992 r.
Zaakceptowano do druku 29 grudnia 1992 r.

Piśmiennictwo

1. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S, Suda T (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4990-4995
2. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Kuribayashi T, Konno K, Nishi Y, Suda T (1982) *Biochem J* **204**: 713-717
3. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE (1977) *Nature (Lond)* **270**: 347-348
4. DeLuca HF (1984) W: Makin HLJ (red) *Biochemistry of Steroid Hormones*. Blackwell Scient Publ, Oxford, str 71-116
5. DeLuca HF, Schnoes (1983) *Ann Rev Biochem* **52**: 411-439
6. Morimoto S, Kumhara Y (1985) *Med J Osaka Univ* **35**: 51-57
7. Langner A, Stąpór V, Verjans H, Frączykowska M, Mol M (1992) *Przegl Dermatol* **79**: 5-10
8. MacLaughlin JA, Gange W, Taylor D, Smith E, Holick MF (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5409-5413
9. Morimoto S, Yoshikawa K, Kozuka T (1986) *Br J Dermatol* **115**: 421-427
10. Smith EL, Walworth ND, Holick MF (1986) *J Invest Dermatol* **86**: 709-716
11. Smith EL, Pincus SH, Donovan L, Holick MF (1988) *J Am Acad Dermatol* **19**: 516-521
12. Lau WF (1986) Praca doktorska, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI (USA)
13. DeLuca HFD, Ostrem VK (1987) *Steroids* **49**: 73-102
14. Blunt JW, DeLuca HF, Schnoes HK (1968) *Biochemistry* **7**: 3317-3322
15. DeLuca HF (1992) *Drug News Perspect* **5**: 87-92
16. Link RP, DeLuca HF (1985) W: Conn PM (red) *The Receptors*. Academic Press, New York, t 2, str 1-35
17. DeLuca HF (1986) W: *Steroid Hormone Resistance. Mechanisms and Clinical Aspects*. Plenum Press, New York, str 361-375
18. Russell J, Lettieri D, Sherwood LM (1986) *Endocrinology* **119**: 2864-2867
19. Eisman JA, Suva LJ, Frampton RJ (1984) *Cancer Res* **43**: 4443-4447
20. Paaren HE, Mellon WS, Schnoes HK, DeLuca HF (1985) *Bioorg Chem* **13**: 62-75
21. Ikekawa N, Morisaki M, Koizumi N, Kato Y, Takeshita T (1975) *Chem Pharm Bull* **23**: 695-701
22. Eguchi T, Yoshida M, Ikekawa N (1989) *Bioorg Chem* **17**: 294-307
23. Ostrem VK, Lau WF, Lee SH, Perlman K, Prah J, Schnoes HK, DeLuca HF (1987) *J Biol Chem* **262**: 14164-14171
24. Inaba M, Okuno S, Nishizawa Y, Yukioka K, Otani S, Matsui-Yuasa I, Morisawa S, DeLuca HF, Mori H (1987) *Arch Biochem Biophys* **258**: 421-425
25. Kobayashi Y, Taguchi Z, Mitsuchashi S, Eguchi T, Ohshima E, Ikekawa N (1982) *Chem Pharm Bull* **30**: 4297-4304; Tanaka Y, DeLuca HF, Kobayashi Y, Ikekawa N (1984) *Arch Biochem Biophys* **229**: 348-354
26. Ikekawa N, komunikat prywatny
27. Murayama E, Miyamoto K, Kubodera N, Mori T, Matsunga I *Chem Pharm Bull* (1986) **34**: 4410-4414
28. Kubodera N, Miyamoto K, Ochi K, Matsunaga I (1986) *Chem Pharm Bull* **34**: 2286-2293
29. Sai H, Takatsuto S, Ikekawa N, Tanaka Y, DeLuca HF (1986) *Chem Pharm Bull* **34**: 4508-4515
30. Tanaka Y, Siciński RR, DeLuca HF (1986) *Biochemistry* **25**: 5512-5518
31. Ostrem VK, Tanaka Y, Prah J, DeLuca HF, Ikekawa N (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 2610-2614
32. Eguchi T, Ikekawa N, Sumitani K (1990) *Chem Pharm Bull* **38**: 1246-1249
33. Honda A, Mori Y, Ishizuka S, Ikekawa N (1991) *Steroids* **56**: 142-147
34. Lee S-H (1983) Praca doktorska, University of Wisconsin-Madison, USA; DeLuca HF, Schnoes HK, Lee S-H (1985) US Patent 4,512,925
35. Kutner A, Perlman KL, Siciński RR, Phelps ME, Schnoes HK, DeLuca HF (1987) *Tetrahedron Lett* **28**: 6129-6132; DeLuca HF, Schnoes HK, Kutner A, Perlman K, Siciński RR, Phelps ME (1989) US Patent 4,847,012
36. Kutner A, Perlman KL, Lago A, Schnoes HK, DeLuca HF (1988) *J Org Chem* **53**: 3450-3457 oraz literatura cytowana w tej pracy
37. Tsuji M, Yokoyama S, Tachibana Y (1989) *Bull Chem Soc Jpn* **62**: 3132-3137
38. Kutner A, Perlman KL wyniki niepublikowane
39. Siciński RR, Tanaka Y, Schnoes HK, DeLuca HF (1985) *Bioorg Chem* **13**: 158-169
40. Perlman K, Kutner A, Prah J, Smith C, Inaba M, Schnoes HK, DeLuca HF (1990) *Biochem* **29**: 190-196
41. Kutner A, Perlman KL, Schnoes HK, DeLuca HF wyniki niepublikowane; DeLuca HF, Schnoes HK, Perlman KL, Kutner A (1989) US Patent 4,851,401
42. Bretting C, Calverley MJ, Binderup L (1991) W: *Vitamin D. Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*. Proc VIIIth Workshop Vit D, Walter de Gruyter, Berlin, str 159-160
43. Bouillon R, Allewaert K, Tan BK, Van Baelen H, de Clercq P, Vandewalle M (1991) *Vitamin D. Gene Regulation, Structure-Function Analysis and Clinical Application*. Proc VIIIth Workshop Vit D, Walter de Gruyter, Berlin, str 131-138
44. Sorensen H, Binderup L, Calverley MJ, Hoffmeyer L, Andersen NR (1990) *Biochem Pharmacol* **39**: 391-397
45. Chodyński M, Kutner A (1991) *Steroids* **56**: 311-315; (1990) Pol Pat P-284259
46. Kutner A, Chodyński M, Halkes SJ, Brugman J (1992) *Bioorg Chem*, w druku
47. Nenrickx W, De Clercq PJ, Couvenhoven C, Overbeek WRM, Halkes SJ (1991) *Tetrahedron* **47**: 9419-9430



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”.

Analogi witamin D do fotoznakowania białka transportującego i receptora hormonu witaminowego

Photoactivable analogues of vitamin D for labeling of serum binding protein and vitamin D receptor

ANDRZEJ KUTNER*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Fotoznakowanie białek związanych z działaniem witamin D — koncepcja ogólna
- III. Projektowanie fotoanalogów witamin D
- IV. Synteza fotoanalogów witamin D
- V. Badanie aktywacji fotoanalogów witamin D
- VI. Badanie aktywności wiązania fotoanalogów witamin D z odpowiednimi białkami
- VII. Synteza fotoanalogów witamin D znaczonej izotopowo
- VIII. Fotoznakowanie białek witamin D

Contents:

- I. Introduction
- II. Photoaffinity labeling vitamin D proteins — general concept
- III. Design of photoactivable analogues of vitamin D
- IV. Synthesis of photoactivable analogues of vitamin D
- V. Activation of analogues of vitamin D
- VI. Binding affinity of photoactivable analogues of vitamin D to the respective proteins
- VII. Synthesis of radiolabeled photoaffinity analogues of vitamin D
- VIII. Photoaffinity labeling of vitamin D proteins

Wykaz stosowanych skrótów: 1,25-(OH)₂D₃ — 1,25-dihydroksywitamina D₃, 1,25-dihydroksycholecalciferol, hormon witaminowy; 25-OH-D₃ — 25-hydroksywitamina D₃; DBP — vitamin D binding protein, białko transportujące 25-OH-D₃; VDR — vitamin D receptor, receptor 1,25-(OH)₂D₃; HPLC — high-performance liquid chromatography, wysokosprawna chromatografia cieczowa; FT-IR — Fourier transformed infra red, spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera

I. Wstęp

Metoda fotoznakowania makromolekuł jest ostatnio coraz częściej stosowana w badaniach strukturalnych białek biorących udział w transporcie związków aktywnych w organizmie oraz w badaniach funkcjonowania szeregu enzymów [1-3]. Metoda ta wykorzystuje wysoce specyficzne wiązanie się aktywnych biologicznie ligandów z cząsteczkami odpowiednich

białek. Istota metody polega na wytworzeniu dodatkowego trwałego wiązania pomiędzy białkiem i ligandem, w miejsce normalnie istniejących wiązań odwracalnych, metodą aktywacji ligandu promieniowaniem ultrafioletowym. W ten sposób ligand, użyty w formie znaczonej izotopowo, może służyć do oznakowania wybranego białka. Ułatwia to m.in. identyfikację białka w złożonych mieszaninach oraz śledzenie procesów jego oczyszczania i ilościowego oznaczania. Metoda fotoznakowania jest szczególnie przydatna w badaniach tzw. miejsc aktywnych białek, w których następuje ich wiązanie się z ligandem.

Metodą fotoznakowania zidentyfikowano i częściowo scharakteryzowano białka wiążące różne klasy związków steroidowych, takich jak kwasy żółciowe [4], glukokortykoidy [5], progesterony [6]. Do czasu wykonania opisanych niżej badań metoda ta nie była stosowana dla białek biorących udział w transporcie i działaniu witamin D [7-9].

II. Fotoznakowanie białek związanych z działaniem witamin D — koncepcja ogólna

Dotychczas wyizolowano dwa białka związane z funkcjonowaniem witamin D w organizmie [10]: — białko transportujące (*vitamin D binding protein*, DBP [11]), odpowiedzialne za rozprowadzanie witamin D w organizmie — receptor witamin D (*vitamin D receptor*, VDR [16]), biorący udział w działaniu hormonalnym witamin D.

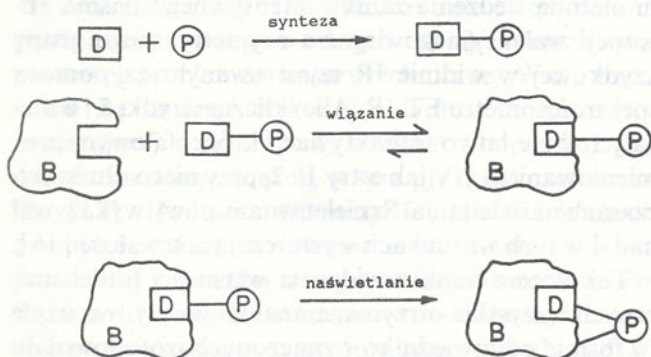
Spośród metabolitów witamin D największe powinowactwo wiązania się z DBP wykazuje 25-OH-D₃, a z receptorem 1,25-(OH)₂D₃ [1]. Z tego powodu do fotoznakowania DBP użyto fotoanalog 25-OH-D₃, a do fotoznakowania receptora fotoanalog hormonu witaminowego.

Zbadano już szereg podstawowych własności fizykochemicznych i strukturalnych DBP i receptora [10], jednakże nadal nie jest poznany mechanizm tworzenia kompleksu białkowego z ligandem witaminowym oraz umiejscowienie i struktura miejsca lub miejsc aktywnych tych białek.

* dr, Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

Fotoznakowanie białka jest procesem wieloetapowym. Pierwszy etap polega na syntezie chemicznej fotoanalogu witaminy D (D-P) zawierającego grupę ulegającą fotoaktywacji (P). Następnie wytworzony fotoanalog poddaje się wiązaniu z odpowiednim białkiem (B) i usuwa nieskompleksowany ligand witaminowy (D-P). Kolejne naświetlenie otrzymanego kompleksu (B-D-P) promieniowaniem ultrafioletowym (UV) prowadzi do wytworzenia dodatkowego wiązania i trwałego połączenia analogu witaminy D (D-P) z odpowiednim białkiem (B).

Jeżeli fotoanalog (D-P) jest dodatkowo oznaczony izotopowo to w rezultacie procesu fotoznakowania dokonuje się trwałe oznakowanie izotopowe białka transportującego witaminę D lub receptora witaminy D (B). Proces ten ma charakter silnie selektywny z uwagi na specyficzne wiązanie witamin D i ich pochodnych z odpowiednimi białkami.



Ryc. 1. Schemat metody fotoznakowania białka związanego z działaniem witaminy D.

D — cząsteczka witaminy D; P — grupa ulegająca fotoaktywacji; D-P — fotoanalog witaminy D; B — białko związane z działaniem witaminy D; B-D-P — kompleks fotoanalogu witaminy D z odpowiednim białkiem.

III. Projektowanie fotoanalogów witamin D

Efektywny przebieg procesu fotoznakowania stwarza szereg wymagań dotyczących syntezy fotoanalogu D-P oraz jego własności. Z tego względu syntezę fotoanalogu D-P zaplanowano w taki sposób, aby była ona możliwa do wykonania przy użyciu znaczonej izotopowo wyjściowej witaminy D. Celem było opracowanie możliwie jak najkrótszej, najlepiej jednoetapowej, syntezy fotoanalogu D-P. Chodziło o to, aby w czasie syntezy nie następowało istotne obniżenie radioaktywności właściwej wyjściowej witaminy. Syntezę fotoanalogu zaprojektowano w ten sposób, aby otrzymany związek D-P był wystarczająco trwały w normalnych warunkach oraz nadal wykazywał względnie wysoką (w porównaniu z wyjściową witaminą) aktywność wiązania się z odpowiednim białkiem. Projektowane fotoanalogi D-P powinny ulegać na tyle łatwo fotoaktywacji, aby w czasie ich naświetlania nie nastąpił rozkład witaminy D, wrażliwej na pewne zakresy promieniowania UV.

Z poprzednich badań wynikało, że w procesie wiązania cząsteczki witaminy D z odpowiednim białkiem

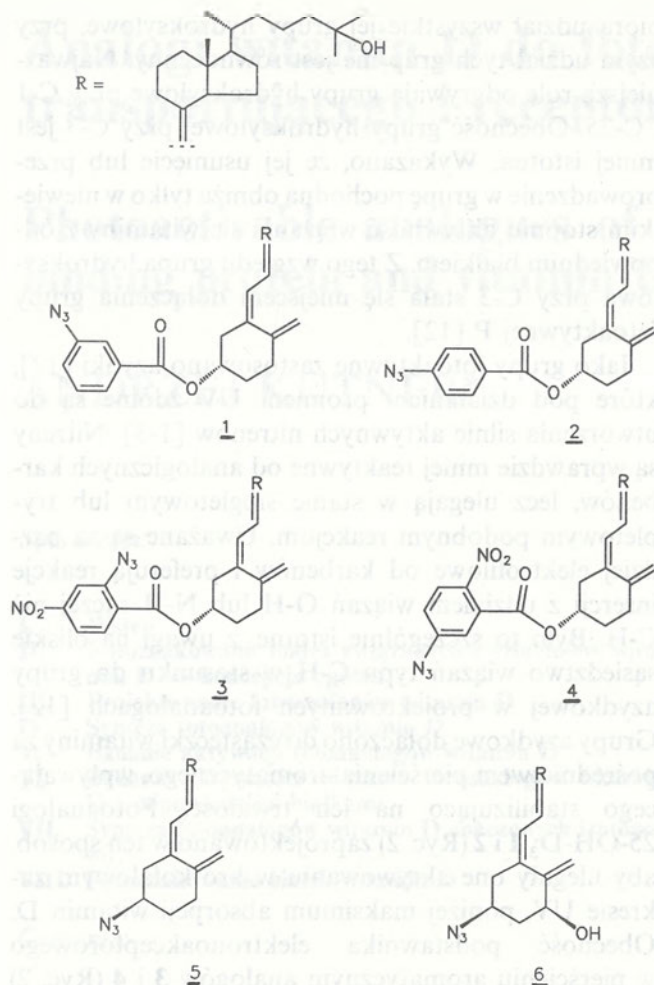
biorą udział wszystkie jej grupy hydroksylowe, przy czym udział tych grup nie jest równocenny. Najważniejszą rolę odgrywają grupy hydroksylowe przy C-1 i C-25. Obecność grupy hydroksylowej przy C-3 jest mniej istotna. Wykazano, że jej usunięcie lub przeprowadzenie w grupę pochodną obniża tylko w niewielkim stopniu aktywność wiązania się witaminy z odpowiednim białkiem. Z tego względu grupa hydroksylowa przy C-3 stała się miejscem dołączenia grupy fotoaktywnej P [12].

Jako grupy fotoaktywne zastosowano azydki [12], które pod działaniem promieni UV zdolne są do utworzenia silnie aktywnych nitrenów [1-3]. Nitreny są wprawdzie mniej reaktywne od analogicznych karbenów, lecz ulegają w stanie singletowym lub trypletowym podobnym reakcjom. Uważane są za bardziej elektrofilowe od karbenów i preferują reakcje insercji z udziałem wiązań O-H lub N-H raczej niż C-H. Było to szczególnie istotne, z uwagi na bliskie sąsiedztwo wiązań typu C-H w stosunku do grupy azydkowej w projektowanych fotoanalogach [12]. Grupy azydkowe dołączono do cząsteczki witaminy za pośrednictwem pierścienia aromatycznego, wpływającego stabilizująco na ich trwałość. Fotoanalogi 25-OH-D₃ **1** i **2** (Ryc. 2) zaprojektowano w ten sposób, aby ulegały one aktywowaniu w krótkofalowym zakresie UV, poniżej maksimum absorpcji witamin D. Obecność podstawnika elektronoakceptorowego w pierścieniu aromatycznym analogów **3** i **4** (Ryc. 2) miała na celu zwiększenie reaktywności generowanych arylonitrenów. Spodziewano się również przesunięcia maksimum ich absorpcji (a tym samym ich aktywacji) w kierunku długofalowego zakresu UV, zgodnie ze znanym efektem batochromowym. Stwarzało to warunki do aktywowania analogów **3** i **4** promieniowaniem UV o obniżonym działaniu destrukcyjnym na cząsteczki witaminy D.

IV. Synteza fotoanalogów witamin D

Estry **1-4** (Ryc. 2) otrzymano w wyniku regioselektywnego (tzn. zachodzącego tylko w wybranym miejscu cząsteczki) acylowania 25-OH-D₃ za pomocą uprzednio otrzymanych chlorków odpowiednich kwasów azydo- i azydonitrobenzoesowych [12].

(3R)-3-Deoksy-3-azydowitaminy **5** i **6** (Ryc. 2) otrzymano metodą nukleofilowego podstawienia odpowiednich tosylianów za pomocą jonu azydkowego [12]. Zgodnie z przewidywaniem reakcja przebiegała według mechanizmu S_N2 z inwersją konfiguracji przy C-3. Stwierdzono nieoczekiwaną regioselektywność tosylowania 1,25-(OH)₂D₃. W stosowanych warunkach reakcji tosylowaniu ulegała wyłącznie grupa hydroksylowa przy C-3. Regioselektywność tego typu nie została stwierdzona w przypadku acetylowania 1,25-(OH)₂D₃ [13]. Regioselektywne tosylowanie stanowić więc może dogodną metodę selektywnej funkcjonalizacji grup hydroksylowych w 1,25-(OH)₂D₃.



Ryc. 2. Struktury fotoanalogów witamin D.

1-5 — fotoanalogi 25-OH-D₃ do znakowania białka transportującego (DBP)
6 — fotoanalog 1, 25-(OH)₂D₃ do znakowania receptora hormonu witaminowego (VDR).

Wbrew wcześniejszym doniesieniom [14] o dużej nietrwałości 3-deoksy-3-azydowitamin D₃ otrzymane azydowitaminy **5** i **6** wykazały, w temperaturze otoczenia, trwałość typową dla witamin, a więc wystarczającą do ich użycia w procesie fotoznakowania białek. Stwierdzono jednak gwałtowny rozkład próbek azydowitamin, które nie były precyzyjnie oczyszczone techniką HPLC.

V. Badanie aktywacji fotoanalogów witamin D

Zgodnie z przewidywaniem fotoanalogi **1** i **2** (Ryc. 2) wykazały maksimum absorpcji w krótkofalowym zakresie UV, natomiast analog **3** wykazał dodatkowe maksimum absorpcji powyżej 300 nm [12]. Dość nieoczekiwanie, maksimum takie nie występowało w widmie UV analogu **4**. Efekt ten nie daje się wyjaśnić na podstawie znanego wpływu podstawników na widma absorpcyjne UV związków aromatycznych. Niezależnie od nietypowej charakterystyki UV ester **4** ulegał fotoaktywacji pod działaniem długofalowego promieniowania UV.

Przebieg procesu fotoaktywacji analogów **1-6** (Ryc. 2) badano w warunkach zbliżonych do zamierzonego procesu fotoznakowania, jednakże bez obecności odpowiednich białek. Proces kontrolowano metodą spektrometrii UV (rejestracja zmian krzywej absorpcji). Wszystkie otrzymane analogi względnie łatwo ulegały aktywacji w odpowiednim zakresie promieniowania UV. Kontrolny eksperyment wykazał, że destrukcja szkieletu witaminowego badanych analogów w warunkach fotoaktywacji nie jest na tyle silna, aby uniemożliwiała przeprowadzenie procesu fotoznakowania białek [15]. Okazało się jednak niemożliwe śledzenie procesu aktywacji azydowitamin **5** i **6** za pomocą spektrometrii UV. Słabe maksimum absorpcji chromoforu azydkowego było dla tych związków całkowicie ukryte za intensywnym pasmem absorpcji skoniugowanego trienu. Do wyznaczenia optymalnych warunków procesu fotoaktywacji posłużono się tu metodą śledzenia zaniku intensywnego pasma absorpcji walencyjnego drgania asymetrycznego grupy azydkowej w widmie IR rejestrowanym za pomocą spektrofotometru FT-IR. Alicykliczne azydki **5** i **6** ulegały równie łatwo fotoaktywacji krótkofalowym promieniowaniem UV jak estry **1** i **2**, przy nieco dłuższych czasach naświetlania. Szkielet witaminowy wykazywał nadal w tych warunkach wystarczającą trwałość [15].

Tak więc z punktu widzenia własności fotochemicznych wszystkie otrzymane analogi mogły być użyte (w formie odpowiedników znaczonych izotopowo) do fotoznakowania białek.

VI. Badanie aktywności wiązania fotoanalogów witamin D z odpowiednimi białkami

Aktywność wiązania się fotoanalogów **1-6** z odpowiednimi białkami zbadano metodą tzw. testu kompetencyjnego [10]. Polega on na pomiarze stopnia podstawienia znakowanego izotopowo ligandu witaminowego (25-OH-D₃ lub 1,25-(OH)₂D₃) przez badany analog, w jego połączeniu z odpowiednim białkiem. Aktywność wiązania się analogu z białkiem określa się wielkością stężenia analogu, przy którym następuje obniżenie wiązania znakowanej wzorcowej witaminy do 50% swej pierwotnej wartości.

Wbrew oczekiwaniom, dołączenie do cząsteczki witaminy grupy azydobenzooesowej lub azydonitrobenzooesowej, przy atomie węgla C-3, spowodowało drastyczne obniżenie aktywności wiązania fotoanalogów **1-4** z odpowiednimi białkami [12]. Ten spadek aktywności był na tyle istotny, że wykluczał on możliwość użycia fotoanalogów **1-4** do dalszych badań, określonych w części II. Stwierdzono natomiast nadal względnie wysoką aktywność wiązania się fotoanalogu **5** z DBP oraz fotoanalogu **6** z VDR [12]. Celowe było więc otrzymanie obu analogów w formie znakowanej izotopowo do wykonania dalszych badań.

VII. Synteza fotoanalogów witamin D znaczonej izotopowo

W przypadku reakcji przeprowadzonych przy użyciu substancji znaczonej izotopowo zachodzi konieczność posługiwania się substancjami w skali nanogramowej. Z uwagi na znaczne trudności techniczne, jakie są zwykle z tym związane, zastosowano w tym przypadku witaminę D₃ jako nośnik [16, 17] w procesie otrzymywania fotoznakowanego i znaczonego izotopowo analogu 25-hydroksywitminy D₃. Syntezę znaczonej trytem azydowitamin wykonano z odpowiednich radioaktywnych analogów 25-OH-D₃ i 1,25-(OH)₂D₃ [18, 19].

W celu otrzymania odpowiedniej ilości znaczonej izotopowo azydowitamin konieczne było wykonanie dwuetapowej syntezy w skali rzędu 0.5 mC substancji wyjściowej. Odpowiada to ilości rzędu 1 µg substancji. Wykonanie reakcji oraz wyizolowanie i oczyszczenie produktu końcowego w tak niewielkich ilościach stwarza szereg problemów natury technicznej. Wielu z nich udało się uniknąć wykonując syntezę z mieszaniny zawierającej radioaktywny substrat i odpowiadający mu nieznaczony związek, w tym przypadku witaminę D₃ [17]. Dodatek witminy D₃ ułatwił kontrolę przebiegu reakcji tosyłowania oraz wyizolowanie odpowiedniej znaczonej izotopowo azydowitminy. Pochodną witminy D₃ usunięto w procesie oczyszczania znaczonej izotopowo azydowitamin metodą HPLC.

Zastosowana metoda syntezy znaczonej izotopowo azydowitamin pozwoliła na otrzymanie produktów o zachowanej wysokiej radioaktywności właściwej użytych do syntezy substratów.

VIII. Fotoznakowanie białek witamin D

Metodą opisaną w części II dokonano trwałego fotoznakowania białka transportującego, wyizolowanego z ludzkiej surowicy krwi [17]. Uzyskane kilkuprocentowe oznakowanie białka znaczoną izotopowo azydowitaminą D (znaczony odpowiednik analogu 5) okazało się wystarczające do podjęcia pierwszych badań nad charakterem i strukturą miejsca aktywnego tego białka. Przede wszystkim stwierdzono, że znaczone izotopowo azydowitamina łączy się z badanym białkiem w tym samym miejscu co naturalny aktywny metabolit, 25-OH-D₃. Następnie wykazano, że fotoznakowana witamina zachowuje się w stosunku do badanego białka jak inhibitor kompetencyjny 25-hydroksywitminy D₃ o względnie wysokiej stałej hamowania [17].

Istotną zaletą zastosowanej metody okazała się możliwość skutecznego fotoznakowania białka witaminowego w złożonej mieszaninie białek zawartych w nieoczyszczonej ludzkiej surowicy krwi [17]. Białko transportujące (DBP) było jedynym składnikiem tej mieszaniny, który ulegał fotoznakowaniu przy nieobecności 25-OH-D₃ oraz pozostawał nieoznakowany

przy dodaniu 25-OH-D₃ do roztworu poddawanego naświetlaniu.

Nieoczekiwanym rezultatem badań nad fotoznakowaniem białka transportującego było wykrycie trzech innych białek surowicy krwi, które ulegają również fotoznakowaniu przy użyciu znaczonej izotopowo azydowitamin. Fotoznakowanie tych białek miało charakter niespecyficzny, ponieważ zachodziło zarówno w obecności jak i w nieobecności 25-OH-D₃. Może ono wynikać z wysokiej względnej zawartości tych białek w surowicy krwi lub też być spowodowane pewnego rodzaju niespecyficznym oddziaływaniem z witaminami D i ich analogami.

Poprzednio sugerowano [20] istnienie połączenia witminy D z lipoproteinami o wysokiej gęstości na zasadzie oddziaływania o charakterze powierzchniowym. Wydaje się, że znaczone izotopowo azydowitminy mogą być również wykorzystane do badania wspomnianych wyżej drugorzędowych nośników białek, typu apolipoprotein.

Przedmiotem badań biochemicznych jest obecnie region białka transportującego, w którym następuje wiązanie się z witaminą D. Z uwagi na poznaną już sekwencję aminokwasową białka transportującego ustalenie położenia wiążącej domeny tego białka może mieć istotne znaczenie dla poznania mechanizmu oddziaływania witminy D z białkiem i jej transportu w organizmie. Zaawansowane są również prace nad fotoznakowaniem receptora witminy D za pomocą znaczonej izotopowo 1,25-dihydroksy-3-deoksy-3-azydowitminy D₃.

Artykuł otrzymano 18 listopada 1992 r.

Zaakceptowano do druku 29 grudnia 1992 r.

Piśmiennictwo

1. Eberle AN (1983) *J Receptor Res* 3: 313-326
2. Ji TH (1983) W: Hirs CHW, Timasheff SN (red) *Methods in Enzymology*, t 91, Academic Press, New York, str 580-609
3. Oppenheimer CL, Czech MP (1984) W: Guroff G (red) *Growth and Maturation Factors*, Wiley, New York, str. 193-221
4. Henderson CJ, Percy-Robb IW (1984) *Biochim Biophys Acta* 795: 257-262
5. Wrange O, Okret S, Radojicic M, Carlstedt-Duke J, Gustafsson J-A (1984) *J Biol Chem* 259: 4534-4539
6. Horwitz KB, Alexander PS (1983) *Endocrinology* 113: 2195-2201
7. Ray R, Holick SA, Holick MF (1985) *J Chem Soc Chem Commun* 702-703
8. Ray R, Rose S, Holick SA, Holick MF (1985) *Biochem Biophys Res Commun* 132: 198-203
9. Ray R, Holick SA, Holick MF (1986) *Biochemistry* 25: 4729-4737
10. DeLuca HF (1984) W: Kumar R (red) *Vitamin D*, Martinus Nijhoff, Boston, str 1-68
11. Haddad JG (1984) W: Kumar R (red) *Vitamin D*, Martinus Nijhoff, Boston, str 382-395

12. Kutner A, Link RP, Schnoes HK, DeLuca HF (1986) *Bioorg Chem* 14: 134-147
13. Napoli JL, Fivizzani MA, Schnoes HK, DeLuca HF (1979) *Biochemistry* 18: 1641-1646
14. Loibner H, Zbiral E (1978) *Tetrahedron* 34: 713-717
15. Kutner A, Link RP dane niepublikowane.
16. Link RP, Kutner A, Schnoes HK, DeLuca HF (1986) *Fed Proc Fed Am Soc Exp Biol* 45: 1612
17. Link RP, Kutner A, Schnoes HK, DeLuca HF (1987) *Biochemistry* 26: 3957-3964
18. Napoli JL, Fivizzani MA, Hamstra AJ, Schnoes HK, DeLuca HF (1979) *Anal Biochem* 96: 481-486
19. Napoli JL, Fivizzani MA, Hamstra AJ, Schnoes HK, DeLuca HF (1980) *Biochemistry* 19, 2515-1521
20. Ziv E, Bar-On H, Silver J (1985) *Eur J Clin Invest* 15: 95-101

Spektryny erytrocytarna i nieerytrocytarne — struktura i funkcje*

Erythroid and nonerythroid spectrins — structure and functions

ALEKSANDER F. SIKORSKI¹,
KATARZYNA BIAŁKOWSKA²,
BRYGIDA BISIKIRSKA³,
JAN SZOPA⁴

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Spektryna erytrocytarna
 - II-1. Struktura pierwszorzędowa
 - II-2. Warianty spektryny erytrocytarnej
 - II-3. Nadrodzina spektryny- α -aktyliny-dystrofiny
- III. Spektryny nieerytrocytarne
 - III-1. Występowanie
 - III-2. Struktura i właściwości
 - III-3. Struktura pierwszorzędowa
 - III-4. Izoforny
- IV. Funkcje spektryn nieerytrocytarnych
 - IV-1. Szkielet błon komórek nieerytrocytarnych — oddziaływania spektryny nieerytrocytarnej z błonami komórkowymi
 - IV-2. Interakcje z elementami szkieletu komórkowego
 - IV-3. Niektóre zjawiska zachodzące w komórce z udziałem spektryny
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Erythroid spectrin
 - II-1. Primary structure
 - II-2. Erythroid spectrin variants
 - II-3. Spectrin- α -actinin-dystrophin superfamily
- III. Nonerythroid spectrins
 - III-1. Occurrence
 - III-2. Structure and properties
 - III-3. Primary structure
 - III-4. Isoforms
- IV. Functions of nonerythroid spectrins
 - IV-1. Membrane skeleton of nonerythroid cells — interactions of spectrins with cell membranes
 - IV-2. Interactions of nonerythroid spectrins with the elements of cytoskeleton
 - IV-3. Events in the cell involving spectrins
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: kD — kilodalton.

¹ dr hab., ² mgr, ³ mgr, ⁴ prof. dr hab. Uniwersytet Wrocławski, Instytut Biochemii, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

* Praca dotowana z Grantu KBN nr 4 11 43 91 01

I. Wstęp

Spektryna erythrocytarna jest głównym elementem sieci białek peryferyjnych, zwanej szkieletem błony wyścielających jej cytoplazmatyczną powierzchnię. Szkielet błony odgrywa zasadniczą rolę w fizjologii erythrocytu zapewniając m.in. utrzymywanie normalnego kształtu komórki, nadaje jej zdolność do odwracalnych odkształceń podczas krążenia (erythrocyt o średnicy 8 μm przeciska się wielokrotnie przez kapilary o średnicy około 2 μm), nadaje stabilność błonie, reguluje ruchliwość boczną białek integralnych oraz bierze udział w utrzymywaniu asymetrycznego rozmieszczenia aminofosfolipidów.

Głównym składnikiem szkieletu błony (75% jego masy) jest heterotetrameryczna spektryna, która oddziałując z krótkimi (37 nm długości) filamentami aktynowymi oraz innymi białkami peryferyjnymi tworzy gęstą sieć. (Ryc. 1). Domenę hydrofobową błony (dwumolekularna warstwa lipidowa z zanurzonymi w niej białkami integralnymi) wiąże spektryna poprzez oddziaływanie z ankiryną, która z kolei wiąże się z białkiem przenoszącym aniony błony erythrocytu. Miejsca wiązania ankiryny znajdują się w podjednostkach β spektryny, w pobliżu środka tetramery. Końce tetramery wiążą się ze strukturą zwaną obecnie kompleksem węzłowym (*junctional complex*), którego osią jest krótki filament aktynowy, a w jego skład wchodzi: białko 4.1, adducyna oraz białko 4.9 (dematyna). Zarówno białko 4.1 jak i adducyna (każde z osobna) aktywują znacznie tworzenie kompleksu spektryny z aktyną. Funkcja dematyny nie jest, jak dotąd, poznana.

Defekty genetyczne spektryny, a także innych białek szkieletu błony erythrocytu leżą u podłoża dziedzicznych anemii hemolitycznych, do których należą: żółtaczka konstytucyjna (sferocytoza), dziedziczna elip-

tocytoza oraz pyropoikilocytoza. Przykłady niektórych wariantów spektryny związanych z tymi schorzeniami przytoczono w niniejszym artykule.

Do roku 1981 uważano, że spektryna jest białkiem charakterystycznym tylko dla erythrocytów, do 1984 r. spektrynę lokalizowano tylko w komórkach kręgowców. W 1986 r. wykryto ją u *Śluzowców*, a w 1988 r. w komórkach roślinnych. Mamy również dane, że białka reagujące z przeciwciałami skierowanymi przeciw spektrynie występują także u roślin niższych oraz bakterii.

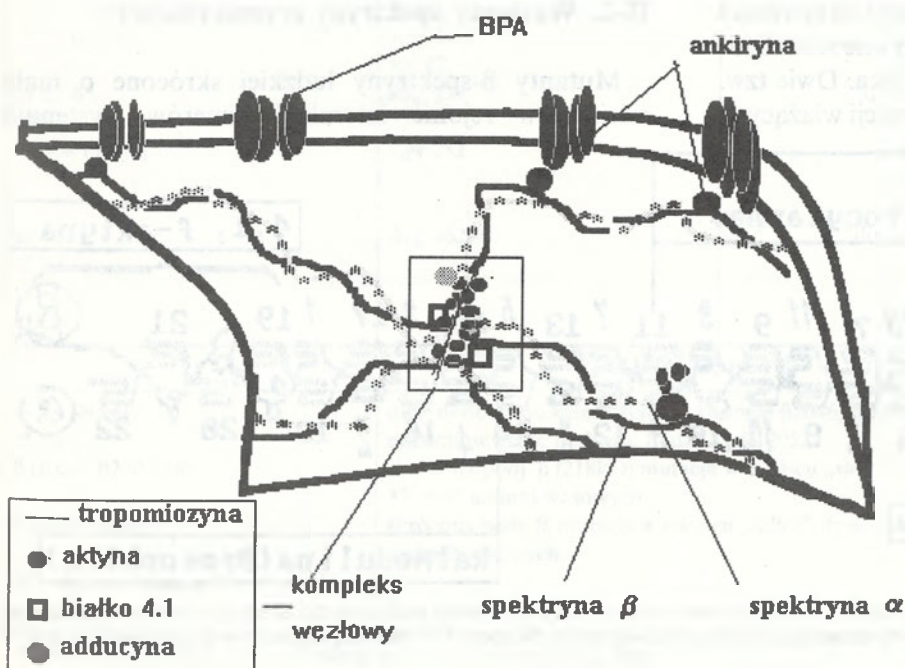
Co więcej, różnorodność izoform spektryny, często występujących w obrębie tych samych komórek może wskazywać na znaczne zróżnicowanie funkcjonalne tych białek. Powszechność występowania oraz homologia spektryn lub niektórych ich domen z innymi białkami szkieletu komórkowego wiążącymi aktyne może wskazywać na wspólne pochodzenie tych białek.

Poniżej przedstawiono przegląd piśmiennictwa dotyczącego struktury spektryn erythrocytarnych oraz nieerythrocytarnych. Szczególnie duży postęp zanotowano ostatnio w badaniach struktury pierwszorzędowej oraz homologii spektryn z innymi białkami. Znacznie zaawansowano ostatnio badania nad funkcją różnych spektryn.

II. Spektryna erythrocytarna

II-1. Struktura pierwszorzędowa

Spektryna jest głównym białkiem peryferyjnym błony erythrocytu zbudowanym z dwóch podjednostek: α o masie 280 kD (2429 reszt aminokwasowych) i β o masie 246 kD (2137 reszt aminokwasowych) [1, 2]. Tetramer spektrynowy o długości 200 nm powstaje w wyniku oddziaływania dwóch heterodimerów o długości 100 nm i średnicy 2.5 nm utworzonych w wyniku



Ryc. 1. Schemat struktury szkieletu błony erythrocytu. Podstawowym elementem szkieletu jest tetramer spektryny zbudowany z dwóch oddziałujących końcami heterodimerów utworzonych przez podjednostki α i β . Końce tetramery wiążą się z kompleksem węzłowym, którego osią jest krótki filament aktynowy. BPA — białko przenoszące aniony. Nie uwzględniono białek 4.9, 4.2 oraz glikoforyn, których funkcje nie są w pełni wyjaśnione.

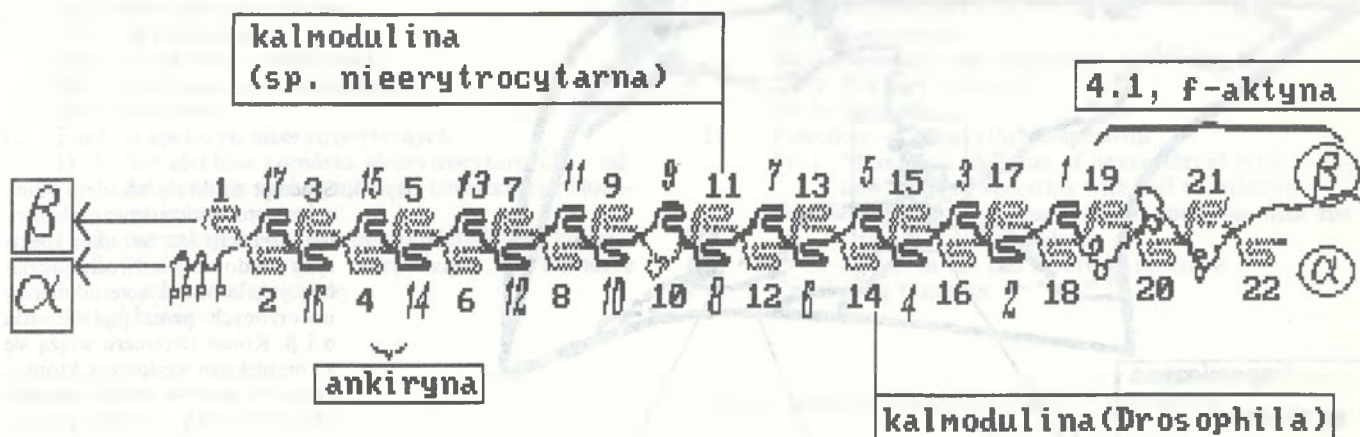
oddziaływań antyrównolegle ułożonych podjednostek α i β tworzących podwójną spiralę (por. przegląd [3]). Podjednostki spektryny można oddzielić od siebie stosując chromatografię na kolumnach z hydroksyapatytu lub DEAE-celulozy w obecności mocznika. Istnieją dane, że pod wpływem ogrzewania spektryny do temperatury ponad 49°C następuje jej dysocjacja do podjednostek α i β [4]. Zjawisko to może wyjaśniać przejście temperaturowe obserwowane w badaniach konformacji izolowanej spektryny oraz białek błon erytrocytów [5]. Badania reasocjacji podjednostek wskazują na to, że oddziaływanie podjednostki α z podjednostką β jest znacznie bardziej uprzywilejowane od oddziaływań α - α i β - β [przepl. 3]. Kilka ostanich lat przyniosło kompletne rozwiązanie struktury pierwszorzędowej spektryny erythrocytarnej [1, 2 i piśmiennictwo tam zawarte], jak i nieerythrocytarnych [6 i piśmiennictwo tam zawarte]. Już pierwsze dane [7] dotyczące sekwencji α i β spektryny erythrocytarnej wykazały, że charakterystyczną jej cechą jest występowanie powtarzalnej struktury złożonej ze 106 reszt aminokwasowych. (Ryc. 2). Podjednostka α zawiera 22, a podjednostka β 17 takich segmentów. Homologia poszczególnych segmentów nie jest wysoka: w podjednostce α liczba identycznych reszt w różnych segmentach porównywanych parami wynosi od 11 do 36. Segmenty 1-9 i 12-19 podjednostki α są wysoce homologiczne, a segmenty 11, 20, 21 i N-kończącą połowę segmentu 22, aczkolwiek mniej homologiczne, można uznać za segmenty „spektrynowe”. N-końcowe 22 reszty (segment 22), segment 10 oraz C-końcowe 150 reszt nie pasują do sekwencji 106 aminokwasowej [1]. Segment 10, choć niepodobny do pozostałych, obecny jest także w podjednostce α ptasiej spektryny mózgowej (jest to fragment o najwyższej, sięgającej 65% homologii pomiędzy tymi polipeptydami). Domena ta zwana (SH3) [7a] jest homologiczna z N-kończącą połową białek src. Postuluje się, że sekwencja ta bierze udział w regulacji aktywności kinazy tyrozylowej, której centrum aktywne zlokalizowane jest w C-końcowej części tego białka. Dwie tzw. struktury „EF-hand” podobne do sekwencji wiążących

jony Ca^{2+} kalmoduliny występujące w C-końcowym segmencie (22) α spektryn mózgowych są także zachowane w α -spektrynie erythrocytarnej (54-57% identyczności). Podjednostka α spektryny erythrocytarnej nie zawiera 24 aminokwasowej domeny odpowiedzialnej za wiązanie kalmoduliny [8]. Spektryna erythrocytarna wiąże kalmodulinę słabo ($K_D 1.2 \times 10^{-4} \text{M}$) [9], a miejsce jej wiązania znajduje się w domenie βIV [10].

Struktura pierwszorzędowa podjednostki β spektryny erythrocytarnej [2] cechuje się występowaniem 3 domen: pierwsza, N-kończąca charakteryzująca się brakiem podobieństwa do 106 aminokwasowego segmentu „spektrynowego”, ale za to wykazuje duże podobieństwo do domen wiążących aktynę innych białek. Odcinek pomiędzy resztami 51 a 270 wykazuje 51% identyczności z dystrofiną ludzką. Więcej szczegółów dotyczących tej domeny przedstawiono poniżej. Domenę II tworzy 17 typowych segmentów spektrynowych, z tym, że niektóre segmenty (szczególnie 1, 2, 12 i C-kończąca połowa segmentu 15) wykazują znaczne odstępstwa od sekwencji 106 aminokwasowej. Leucyna 26 i tryptofan 45 są najbardziej konserwatywnymi resztami we wszystkich 17 segmentach β spektryny. W domenie II znajduje się miejsce wiązania ankiryry o czym wspomniano poniżej. Domena III złożona z 52 reszt aminokwasowych w sekwencji nieprzystającej do struktury typowego segmentu spektrynowego. Zawiera ona 4 miejsca fosforylacji [3, 8] przy pomocy nieswoistej, niezależnej od cAMP kinazy podobnej do kinazy kazeinowej. Mimo wielu prób, nie udało się, jak dotąd, znaleźć fizjologicznej roli fosforylacji spektryny, choć często pojawiają się atrakcyjne, aczkolwiek bardzo słabo udokumentowane spekulacje na temat jej udziału w kontroli kształtu erythrocytu [np. 31]. Domena ta łącznie z N-kończącym odcinkiem podjednostki α tworzy miejsce asocjacji dimerów w tetramerze.

II-2. Warianty spektryny erythrocytarnej

Mutanty β -spektryny ludzkiej skrócone o małe odcinki w rejonie interakcji dimerów występują



Ryc. 2. Struktura dimerycznej spektryny. Poszczególne białka wiązane przez spektrynę, również podjednostki drugiego dimeru w tetramerze oznaczono w ramkach. Potrójne struktury oznaczają poszczególne segmenty. Numery 1-22 dotyczą segmentów podjednostki α , a 1-17 podjednostki β .

w przypadkach dziedzicznej eliptycytozy i pyropoiki-
locytozy. Spektryna tych pacjentów wykazuje obniżo-
ną znacznie zdolność do tworzenia tetramerów
[przeł. 3, 11], co jest najpowszechniejszym defektem
molekularnym w przypadkach tych anemii. Oprócz
wspomnianych wyżej mutacji podjednostki β polega-
jących na jej skróceniu (przykłady przedstawiono
w Tabeli I) stwierdzono wiele wariantów podjednostki
 α charakteryzujących się zmienioną wrażliwością
N-końcowej strefy podjednostki α (domeny αI i αII) na
proteolizę. Zamiast N-końcowego fragmentu αI o ma-
sie cząsteczkowej 80 kD obserwuje się fragmenty
o mniejszych masach (Tabela I).

II-3. Nadrodzina spektryny- α -aktyniny-dystro- finy

Struktury pierwszorzędowe α -aktyniny [32], dys-
trofiny [33] wykazują podobieństwa, które skłaniają
do przypuszczeń, że ich pochodzenie jest wspólne;
białka te tworzą nadrodzinę. α -Aktynina jest białkiem
w kształcie pałeczki o długości 30-40 nm złożonym
z dwóch identycznych podjednostek o masie 100 kD
ułożonych antyrównolegle. Jest ona składnikiem „dys-
ków z” w mięśni. Wiele izoform α -aktyniny występuje
w asocjacji z filamentami aktynowymi w wielu różnych
komórkach. Dystrofina jest białkiem o masie cząstecz-
kowej 427 kD, którego gen znajduje się w chromo-

somie X nieobecny u pacjentów z dystrofią mięśni-
ową Duchenne’a [34]. Dystrofina występuje w błonie
plazmatycznej włókien mięśniowych. Spektryny, α -ak-
tynina i dystrofina są spokrewnione w trzech różnych
regionach: (1) wszystkie trzy białka zawierają po-
wtarzalne segmenty (α -aktynina 4 segmenty zawierają-
ce po 122 reszty aminokwasowe, a dystrofina 26
segmentów po 110 reszt) homologiczne do 106 amino-
kwasowego segmentu spektrynowego, (2) koniec kar-
boksylowy podjednostki α spektryny, dystrofiny i α -ak-
tyniny zawierają sekwencje podobne do domen wią-
żących jony Ca^{2+} tzw. *EF-hand* oraz (3) rejony ami-
nowego końca α -aktyniny, dystrofiny i β -spektryny
zawierają domenę wiążącą aktyne. Ostatnie dane wska-
zują na bardzo zbliżoną lokalizację genów α -aktyniny
i β -spektryny w chromosomie 14 (β -spektryna 14q23-
q24.2, α -aktynina 14q22-q24 [35, 36], co wskazuje na
to, że białka te powstały przez częściową duplikację
pra-genu.

Porównanie długości natywnej spektryny z długo-
ścią wynikającą ze struktury pierwszorzędowej nasu-
nęło przypuszczenie, że strukturę segmentu spekt-
rynowego stanowi potrójna spirala [7]. Ostatnio poja-
wiły się doniesienia sugerujące występowanie pięcio-
krotnej struktury globularnej, tzn. 3 helisy α oraz dwóch
odcinków o strukturze β [37]. Inni badacze postulują
dłuższą helisę α obejmującą również odcinek pomiędzy
segmentami, dla którego postulowano strukturę elas-

Tabela 1.

Niektóre warianty spektryny erytrocytarnej występujące w przypadkach dziedzicznej eliptycytozy i pyropoiki-
locytozy

Fenotyp	Miejsce trawienia trypsyną	Defekt molekularny	Pozycja piśmiennictwa
POJEDNOSTKA α			
αI 78 (Sp Tunis)	lys 10	substytucja Arg \rightarrow Trp 35 lub Arg \rightarrow Ser 39	[39] [40]
αI 74 (Culoz) (Lyon)	lys 42 Arg 39 lys 42	Gly \rightarrow Val 40 Leu \rightarrow Fen 43 arg \rightarrow his 22	[41] [41] [49]
αI 65-68 αI 61 αI 50a (αI 46)	Arg 131 Lys 252	duplikacja Leu 148	[42-46] [50]
αI 50b αI 43 αII 47 αII 21	Arg 462/4	Substytucja Leu \rightarrow Pro 254 i Ser \rightarrow Pro 255 GluNH ₂ \rightarrow Pro 465	[45, 46] [45] [51] [53] [47]
POJEDNOSTKA β			
αI 74 (Nice) αI 74 β (Ruen $\beta 220/218$) β (Göttingen) βIV (Saint Chamond)* (Tlemcen)*	dwie dodatkowe zasady (GA) w kodonie $\beta 2046$, skrócona przy C-końcu podj. β (β') mutacja w genie podjedn. β ala \rightarrow pro 2053 skrócona podj. β (218kD) mutacja w miejscu „splice”, opuszczony ekson Y, delecja 33 reszt aminokwasowych skrócona podj. β , mutacja w miejscu „splice”, opuszczony ekson X, delecja 129 reszt aminokwasowych		[48, 55] [52] [57] [58] [54]

* osoby posiadające tak zmienioną spektrynę nie wykazują objawów anemii.

tycznej pętli [38, 39], a także układ, w którym jednostka konformacyjna pokrywa się z segmentem 106 aminokwasowym. Ostatnio pojawiło się doniesienie z laboratorium Brantona [40], w którym autorzy wykazali, że syntetyzowane przez bakterie sklonowane fragmenty spektryny owadziej odpowiadające dokładnie segmentowi 106 aminokwasowemu są odporne na proteolizę i wykazują strukturę przestrzenną podobną do natywnej spektryny. Dane te dość jednoznacznie przemawiają za tym, że jednostka konformacyjna odpowiada segmentowi 106 aminokwasowemu.

Miejsca wiązania ankiryiny znajduje się w podjednostce β w odległości 20 nm od środka tetrameru, prawdopodobnie w pobliżu granicy pomiędzy proteolitycznym fragmentem trypsynowym spektryny T65 i T28 (domeny chemiczne β I i β II) [por. przegląd 3]. Kennedy i wsp. [41] wykazali, że sklonowany fragment podjednostki β zawierający segment 15 stanowi miejsce wiązania ankiryiny. Do tej aktywności niezbędny jest cały ten fragment oraz niewielka część segmentu 16. Region ten zawiera także odcinek o bardzo dużej homologii (94%) pomiędzy spektryną erytrocytarną i nieerytrocytarną obejmujący 33 reszty aminowego końca segmentu 15 i 3 reszty segmentu 14 [42].

Miejsca wiązania aktyny i białka 4.1 znajdują się na obu końcach tetrameru. Białko 4.1 aktywuje wiązanie spektryny i aktyny zwiększając wielokrotnie powinowactwo tych białek [43]. Stała dysocjacji kompleksu dimerycznej spektryny i f-aktyny wynosi $2 \times 10^{-4} \text{M}$, a w obecności białka 4.1 — $1 \times 10^{-12} \text{M}$ [43].

Spektryna ludzka, izolowana z przechowywanych w bankach krwi erytrocytów, wykazuje obniżoną zdolność wiązania aktyny, co prawdopodobnie jest przyczyną zmniejszenia powierzchni błony erytrocytu przez uwalnianie pęcherzyków błonowych pozbawionych szkieletu [44]. Ta zdolność może być przywrócona po potraktowaniu spektryny ditiotritolem.

Miejsce wiązania aktyny przez spektrynę zostało ostatnio określone przez Karinch i wsp. [45]. Izolowała ona mianowicie z mieszaniny produktów trawienia spektryny trypsyną fragment wiążący aktynę znacznie mocniej niż natywna spektryna. Fragment ten o masie cząsteczkowej około 17 kD okazał się N-końcowym fragmentem podjednostki β , co wykazano w mapowaniu peptydowym oraz analizie sekwencji. Sekwencja końca aminowego β -spektryny zarówno *Drosophila* jak i ludzkiej, erytrocytarnej okazała się homologiczna z tzw. „domeną wiążącą aktynę” dystrofiny i α -aktyny [33, 46, 47]. Co więcej, domena ta jest wysoce homologiczna z wiążącą aktynę konserwatywną domeną białka ABP-120 z *Dictyostelium discoideum* i filaminy mięśni gładkich [48]. Poza tą domeną, obydwie te białka charakteryzują się występowaniem powtarzającego się 96 aminokwasowego motywu o strukturze β ; są zatem całkowicie niepodobne do spektryny. Inną grupą białek zawierających tę domenę (a właściwie dwie, ułożone jedna za drugą) jest fimbryna i jej homologi: plastyna i ABP-67 [49].

Analiza struktury pierwszorzędowej wymienionych wyżej białek wykazała, że zawierają one sekwencję homologiczną o długości 250 reszt aminokwasowych podzieloną na dwa odcinki. N-końcowa połówka tej domeny wykazuje prawdopodobnie aktywność wiązania aktyny [49 i piśmiennictwo tam zawarte]. Ostatnio udało się ograniczyć miejsce wiązania aktyny do 27 reszt aminokwasowych [50]. Poziom identyczności sekwencji 27 aminokwasowej domeny tych białek waha się pomiędzy 60 a 70%, podczas gdy dla całych białek 6-19% [50].

Miejsce wiązania białka 4.1 przez spektrynę znajduje się także w podjednostce β , w pobliżu miejsca wiązania aktyny [51]. Prawdopodobnie związanie białka 4.1 odsłania domenę wiążącą aktynę, gdyż izolowany fragment β spektryny wiąże aktynę bardzo mocno, podobnie jak spektryna w obecności białka 4.1 [45]. Jak dotąd niejasny jest udział podjednostki α spektryny w wiązaniu aktyny, dawniejsze bowiem dane [3] wskazywały na niezbędność obu podjednostek do wiązania aktyny i białka 4.1. Podjednostka α może przypuszczalnie brać udział w regulacji wiązania spektryny i aktyny poprzez wiązanie jonów wapnia. Tzw. strukturę „*EF-hand*”, homologiczną do wiążącej jony Ca^{2+} domeny w kalmodulinie, troponinie C i lekkim łańcuchu miozyny obserwuje się w pobliżu karboksylowego końca α -aktyny, w podjednostce α nieerytrocytarnej spektryny ptaków [6], *Drosophila* [52] oraz erytrocytarnej ssaków [1]. Pozycja tej domeny w podjednostce α (koniec karboksylowy) pokrywa się z pozycją domeny wiążącej aktynę w podjednostce β (koniec aminowy) w cząsteczce natywnej spektryny. Spektryny erytrocytarne jak i nieerytrocytarne wiążą jony Ca^{2+} . Spektryna nieerytrocytarne zawiera w dimerze 4 miejsca wiązania o wysokim powinowactwie: 2 w domenach „*EF-hand*”, 1 w okolicach miejsca o dużej wrażliwości na proteazy (pomędzy segmentem 11 a 12 podjednostki α) i jedno miejsce w podjednostce β [53].

III. Spektryny nieerytrocytarne

III-1. Występowanie

Spektryna nieerytrocytarne po raz pierwszy wykryta w roku 1981 przez Godmana i wsp. [54] znaleziona została w komórkach prawie wszystkich tkanek ssaków i ptaków (por. przegląd [3]). Spektrynę wykazano także w komórkach bezkręgowców [52, 55]. Białka o właściwościach spektryn wykryto także u prymitywnych *Eukariontów* [56-58, 58a, 59]. Białko reagujące z przeciwciałami skierowanymi przeciw α i β spektrynie erytrocytarnej wykazano w komórkach roślinnych [60]. Mamy także dane, że przeciwciała skierowane przeciw podjednostce α spektryny reagują z białkami roślin niższych oraz bakterii (60a, dane własne, niepublikowane).

III-2. Struktura i właściwości

Podjednostki spektryny z różnych źródeł tworzą „hybrydowe” heterodimery: tak np. podjednostka α spektryny mózgowej oddziałuje zarówno z podjednostką β spektryny mózgowej jak i erytrocytarnej, zaś podjednostka α spektryny *Drosophila* oddziałuje zarówno z podjednostką β tego samego gatunku jak i mózgu ssaków.

Masa cząsteczkowa podjednostek β spektryn nieerytrocytarnych różni się od masy β -spektryny erytrocytów i wynosi zwykle 267 kD (235 kD wyznaczona w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS), choć występują izoformy tych podjednostek o masie zarówno $\sim 246(220)$ kD jak i $\sim 320(260)$ kD lub nawet 430 kD (tzw. β_H u *Drosophila*, kodowana przez osobny gen, podobna do dystrofiny kręgowców [61]).

III-3. Struktura pierwszorzędowa

Dotychczas poznano całkowicie strukturę pierwszorzędową podjednostek α kilku spektryn nieerytrocytarnych, w tym ptasiej, mózgowej [6], fibroblastów płuc ludzkich [62] oraz *Drosophila* [52]. Sekwencję nieerytrocytarnej spektryny β wyznaczono w przypadku *Drosophila* [63], ludzkiego mięśnia szkieletowego [64] oraz mózgu myszy [42]. Analiza sekwencji aminokwasowej obu podjednostek spektryny nieerytrocytarnej wykazuje: (1) występowanie segmentu 106 aminokwasowego obserwowanego w strukturze spektryny erytrocytarnej, (2) występowanie domen wiążących ankiryne, aktyne i kalmodulinę, (3) dziesiąty segment jest homologiczny z domenami regulatorowymi kinaz tyrozynowych i fosfolipazy C. Jak już wspomniano, istotną cechą nieerytrocytarnej spektryny α jest wiązanie kalmoduliny. Analiza serii białek-rekombinantów [8] pozwoliła zidentyfikować miejsce wiązania kalmoduliny w spektrynie nieerytrocytarnej. Aktywny 24 aminokwasowy peptyd o sekwencji odcinka pomiędzy segmentami 11 a 12 spektryny α hamował wiązanie kalmoduliny zarówno przez mózgową α -spektrynę jak i białko rekombinanta. Sekwencja **KTASPWKSARL-MVHTVATFNSIKE** wykazuje wspólny motyw strukturalny z miejscami wiązania kalmoduliny innych białek, mianowicie grupy reszt hydrofobowych poprzedzielanych resztami zasadowymi. Przewidywania struktury przestrzennej wskazują na to, że miejsca te tworzą amfipatyczne helisy [8]. Stosując podobne metody, zidentyfikowano miejsce wiązania kalmoduliny w spektrynie α *Drosophila* [65]. Miejsce wiązania kalmoduliny w tej spektrynie znajduje się pomiędzy segmentami 14 i 15; zaczyna się resztą 1473 i jest sekwencją 22 aminokwasów: **KRKQVLERWRHL-KEGLIEKRSR** spełniających kryteria miejsc wiążących kalmodulinę [65].

III-4. Izofomy

Spektryny są białkami powszechnie występującymi, charakteryzującymi się wielością form. U ptaków wykryto, jak dotąd, przynajmniej 3 formy spektryny charakteryzujące się stałą podjednostką α kodowaną przez pojedynczy gen [8] i zmiennymi podjednostkami β : spektryna erytrocytarne, nieerytrocytarne oraz tzw. TW 240/260 [przeł. 3] występuje w komórkach nabłonka szczoteczki jelita obok spektryny nieerytrocytarnej 240/235 i jest ono charakterystyczne tylko dla tych komórek ptaków. Wśród spektryn mózgowych ssaków wyróżnia się kilka izoform: spektryna 240/235 charakteryzująca się podobieństwem antygenowym do jednostki α spektryny ptaków [66] występująca głównie w ciele komórki nerwowej i aksonach. Spektryna mózgowa 240/235E jest podobna antygenowo do spektryny erytrocytarnej i występuje w ciele neuronu i dendrytach. Oba rodzaje spektryny mózgowej wykazują zróżnicowaną ekspresję podczas rozwoju mózgu ssaków [67]. Ekspresja obu podtypów spektryny regulowana jest na poziomie syntezy mRNA [42]. W mózgu ssaków przy pomocy przeciwciał monoklonalnych wykryto jeszcze jedną izoformę spektryny charakterystyczną dla astrocytów [68].

Kilka izoform występuje również w mięśniu szkieletowym ssaków: $\alpha\beta$ 240/235, $\alpha\beta$ 240/235E oraz spektryna β (220), [69], która nie asocjuje z podjednostką α i jest bardzo podobna do erytrocytarnej podjednostki β . Ta niezwykła spektryna zasocjowana jest z pęczkami (agregatami) receptorów acetylocholinu [69]. Agregacja receptorów acetylocholinu w błonie postsynaptycznej jest wczesnym stadium formowania się złącza nerwowo-mięśniowego. Mechanizm agregacji nie jest poznany, ale przypuszcza się, że główną rolę odgrywa szkielet komórkowy lub błonowy, którego ważnym elementem jest wspomniana powyżej spektryna (β). Potraktowanie miotuby chymotrypsyną powoduje redystrybucję receptorów w płaszczyźnie lateralnej błony, czemu towarzyszy utrata spektryny (β).

Struktura pierwszorzędowa β -spektryny (240/235E) mięśnia szkieletowego jest prawie identyczna ze [64] strukturą pierwszorzędową erytrocytarnej podjednostki β (produkt tego samego genu) za wyjątkiem końca karboksylowego, który zawiera niehomologiczny odcinek (21.6 kD) 213 reszt aminokwasowych w porównaniu z 22 resztami w spektrynie β erytrocytarnej [64]. Podobne wyniki uzyskano dla spektryny mózgowej 240/235E [42] oraz dla tzw. spektryny β_R mózgu człowieka [42a]. Postuluje się, że zróżnicowana, swoista tkankowo poliadenylacja jest przyczyną swoistej obróbki mRNA [64].

Odkrycie izoform, szczególnie spektryny mózgowej, a następnie poznanie ich struktury pierwszorzędowej i lokalizacja genów w chromosomach metodą hybrydyzacji *in situ* wyjaśnia, jak się wydaje, relacje pomiędzy nimi. Erytrocytarne spektryna α , którą ostatnio proponuje się [42] określać αSpI jest kodowana przez gen zlokalizowany w ludzkim i mysim chromosomie 1. Nieerytrocytarne spektryna α (αSpII)

kodowana jest przez gen zlokalizowany w mysim chromosomie 2 i ludzkim 9. Gen erytrocytarnej spektryny β (β SpI) położony jest w mysim chromosomie 12 i ludzkim 14, natomiast gen nieerytrocytarnej podjednostki β (β SpII) w chromosomie 11 myszy i 2 człowieka. Wyżej wspomniane izoformy powstałe na skutek zróżnicowanej obróbki mRNA tego samego genu proponuje się określać dodając a,b ..[42] (Tabela 2).

Tabela 2.

Niektóre spektryny nieerytrocytarne

Źródło	Izoforma	Masa cz. pod jedn. [kD]	Chromosom		Identyczność ze spektryną ludzką
			Gen α	Gen β	
Spektryna erytrocytów myszy	α SpIa/ β SpIa	280/246	1	12	~90
Spektryna erytrocytów człowieka	α SpIa/ β SpIa	280/246	1	14	100
Spektryna mózgowa myszy	α SpIIa/ β SpIIa	283/267	2	11	50-55
Spektryna mózgowa myszy (E)	α SpIb/ β SpIb	283/267	1	12	~90

IV. Funkcje spektryn nieerytrocytarnych

IV-1. Szkielet błon komórek nieerytrocytarnych — oddziaływania spektryny nieerytrocytarnej z błonami komórkowymi

Główną różnicą pomiędzy prostym układem jakim jest erytrocyt a innymi komórkami jest to, że spektryna komórek innych niż erytrocyty zlokalizowana jest nie tylko w błonie, ale także w cytoplazmie, co nasuwa możliwości fizjologicznie istotnych przemieszczeń spektryny oraz występowania dodatkowych oddziaływań różnych od obserwowanych w erytrocytach. Przykładem ewolucyjnego zróżnicowania funkcjonalnego spektryn jest wspomniane już białko TW 240/260, które nie jest w ogóle białkiem błony, a jego podjednostka 260 kD (β) nie zawiera miejsc wiązania ani ankiryiny, ani białka 4.1. Tworzenie kompleksu tego białka z aktyną nie jest stymulowane przez białko 4.1 [70]. U ssaków spektryna nieerytrocytarna nie tylko sieciuje „korzonki” rdzenia mikrokosmka, ale także bierze udział w połączeniach filamentów aktynowych z błoną w strefie apikalnej oraz filamentami pośrednimi. Uorganizowanie spektryny i białek jej towarzyszących nie zostało, jak dotąd, opisane w komórkach innych niż erytrocytarnych. Zdolność spektryn nieerytrocytarnych do wiązania i sieciowania filamentów aktynowych, występowanie w komórkach nieerytrocytarnych receptorów spektryny podobnych do receptorów erytrocytarnych (ankiryna, białko przenoszące aniony i inne białka zdolne do oddziaływania z ankiryną, białko 4.1 oraz jego analogi, a także adducyna) może nasuwać przypuszczenie o występowaniu w ko-

mórkach nieerytrocytarnych podobnego do erytrocytarnego szkieletu błonowego [70a].

Niezwykle zachowanie spektryny można obserwować w limfocytach, gdzie występuje ona w postaci wewnątrzkomórkowych agregatów [71] i podlega przemieszczeniu do błony plazmatycznej po potraktowaniu limfocytów czynnikami powodującymi ich różnicowanie.

Połączenia spektryn nieerytrocytarnych z błoną(-ami) komórek obejmują prawdopodobnie oddziaływania z różnymi izoformami ankiryiny, oddziaływania niezależne od ankiryiny, tzn. z innymi białkami integralnymi [72, 73], a być może z fosfolipidami błony (S i k o r s k i A. F., D i a k o w s k i W., — dane niepublikowane). Spektryna mózgowa *in vitro* oddziałuje z wysokim powinowactwem z błonami synaptycznymi pozbawionymi ankiryiny ($K_D \sim 5 - 10 \times 10^{-9} M$) [72]. Błony komórek nerwowych wiążą spektrynę mózgową w ilości 20-30 pmol/mg, co pokrywa się z ilością spektryny w tej tkance. Spektryna erytrocytarna oddziałuje także z błonami mózgu, ale liczba miejsc jest czterokrotnie mniejsza. Błony erytrocytów także zawierają niewielką ilość (5-8%) niezależnych od ankiryiny receptorów spektryny [72], które wiążą raczej spektrynę mózgową niż erytrocytarną. Oddziaływanie wyżej wspomnianych miejsc ze spektryną jest konkurencyjnie hamowane (maksymalnie w około 70%) przez kalmodulinę w obecności submikromolarnych stężeń Ca^{2+} [74]. Miejscem oddziaływania kompleksu kalmodulina- Ca^{2+} jest prawdopodobnie białko receptorowe. Jednym z możliwych receptorów spektryny mogłyby być cząsteczki białek odpowiedzialnych za rozpoznanie i adhezję komórek nerwowych, glikoproteiny z nadrodziny immunoglobulin tzw. N-CAM (*neural cell adhesion molecule*). N-CAM w błonie komórek nerwowych myszy stanowią glikoproteiny o masach 120, 140 i 180 kD. Białka te różnią się długością C-końcowej domeny cytoplazmatycznej. Wykazano, że N-CAM 180 współizoluje się ze spektryną mózgową i wiąże ją *in vitro* [73]. Oddziaływanie to może być odpowiedzialne za stosunkowo niską

ruchliwość tego białka w porównaniu z N-CAM 140. Nie ma danych o regulacji tego oddziaływania przez kompleks Ca^{2+} -kalmodulina.

IV-2. Interakcje z elementami szkieletu komórkowego

Spektryna, jak wykazano, oddziałuje z filamentami pośrednimi, a miejsce ich wiązania zlokalizowane jest w aminowym końcu podjednostki β [75]. Bezpośrednie oddziaływania z podjednostką o masie cząsteczkowej 70 kD neurofilamentów oraz białkiem filamentów komórek glejowych zachodzi ze stałą dysocjacji $K_D \sim 0.2-0.4 \times 10^{-6} \text{M}$ i stechiometrią 1 cząsteczka spektryny na 50 podjednostek filamentów pośrednich. Miejsce wiązania spektryny jest, jak się przypuszcza, zlokalizowane w aminowym końcu podjednostki zaangażowanej w wydłużanie filamentu [75].

Spektryna nieerytrocytarna oddziaływać może z mikrotubulami sieciując je *in vitro*. Stwierdzono, że miejscem oddziaływania jest białko τ (tau) zasocjowane z mikrotubulami, a być może tubulina [76]. Tubulina wiąże się z domeną oddziałującą z białkiem przenoszącym aniony ankiryne [77]; ankiryne zatem powinna tworzyć trójskładnikowy kompleks ze spektryną i mikrotubulami, ale dotąd nie ma na to dowodów eksperymentalnych. Obserwacje mikroskopowe wskazują na to, że mikrotubule są połączone z błoną plazmatyczną aksonów poprzez białko przypominające rozmiarami i kształtem spektrynę [78].

IV-3. Niektóre zjawiska zachodzące w komórce z udziałem spektryny

Jak już wspomniano, spektryny i ankiryne są w niektórych przypadkach skoncentrowane w niektórych regionach błony komórkowej i jak się uważa, mogą odgrywać istotną rolę w formowaniu i utrzymywaniu domen charakteryzujących się występowaniem określonych białek integralnych. Przykładami silnie spolaryzowanych domen o wysokiej zawartości spektryny są przewężenia Ranviera, „czepki” hodowanych limfocytów oraz limfocytów wyizolowanych z organizmu. Udział spektryny w powstaniu „czepków” zaobserwowano także w przypadku agregacji receptorów czynnika wzrostu naskórka (EGF) w komórkach epidermalnych karcinoma A431 [79]. Spektryna jest także istotnym składnikiem ziarnistości postsynaptycznych mózgu [80].

Istotnym wydaje się pytanie, czy spektryna lub spektryna i ankiryne odgrywają ważną rolę w organizacji domen błonowych. Wyizolowano kompleks spektryny, ankiryne i $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP-azy}$ rozpuszczalny w detergencie niejonowym, który może być prekursorem nierozpuszczalnego połączenia tych białek obecnego w błonach spolaryzowanych komórek [81].

Spektryna obecna jest w rejonach kontaktu komórek w stadium dwóch komórek (zarodki mysie) [82]

oraz w połączeniach komórek nabłonka w hodowli [83]. Stabilne kompleksy spektryny (pozostające nierozpuszczalne po ekstrakcji detergentem niejonowym) wykrywane były tylko w obecności jonów Ca^{2+} w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [83]. Kadherynę, białko odpowiadające za adhezję komórek zależną od Ca^{2+} , zidentyfikowano w kompleksie ze spektryną i ankiryną [81]. Uważa się, że spektryna łącznie z innymi białkami takimi jak ankiryne, adducyna [84] oraz białko 4.1 stabilizuje błonę w rejonach połączeń komórkowych jeszcze przed utworzeniem się desmosomu.

Dane dotyczące roli spektryn w sekrecji pochodzą głównie z badań nad komórkami chromafinowymi rdzenia nadnercza (komórki wydzielające katecholaminę). Pobudzeniu wydzielania neurotransmitera przez te komórki towarzyszy reorganizacja spektryny, z równomiernej dystrybucji pod błoną plazmatyczną do lokalnych agregatów [85]. Przeciwciała skierowane przeciw spektrynie nieerytrocytarnej wprowadzone do tych komórek hamują częściowo wydzielanie [86] utrudniając redystrybucję spektryny. U podłoża redystrybucji może leżeć dysocjacja spektryny z kompleksów z nieankirynowymi receptorami pod wpływem Ca^{2+} i kalmoduliny. Trzeba dodać, że oprócz spektryny inne białka wiążące aktyne takie jak α -aktylina, żelsolina i kaldesmon występują w rejonie korowym tych komórek łącznie z filamentami aktynowymi. Podwyższenie stężenia jonów Ca^{2+} powodować może także dezorganizację korowego szkieletu aktynowego przez (1) skracanie filamentów aktynowych indukowane przez żelsolinę i (2) dysocjację połączeń kaldesmonu z f-aktyną. Są też dane, że pod wpływem zwiększonego stężenia jonów Ca^{2+} następuje aktywacja zależnej od Ca^{2+} proteazy I (kalpajny) [87] hydrolizującej spektrynę nieerytrocytarną. Co więcej podatność α spektryny nieerytrocytarnej na proteolizę znacznie wzrasta, a proteoliza podjednostki β zależy całkowicie od obecności kalmoduliny. Proteoliza obu podjednostek uniemożliwia funkcjonowanie tetrameru [87].

Innym przykładem udziału spektryny nieerytrocytarnej w regulacji egzocytozy jest uwalnianie neurotransmitera w synapsie. Neurony komunikują się przy pomocy neurotransmiterów, które upakowane są w małych pęcherzykach synaptycznych o średnicy najczęściej około 50 nm. Po stymulacji (depolaryzacji) neuronu pęcherzyki synaptyczne ulegają fuzji z błoną presynaptyczną i uwalniają swą zawartość do szczeliny pomiędzy zakończeniem pre- i postsynaptycznym. Fakt wiązania spektryny mózgowej przez synapsę oraz obserwacje ultrastrukturalne wskazujące na występowanie spektryny mózgowej w kompleksie z pęcherzykami synaptycznymi nasuwały przypuszczenia o udziale spektryny mózgowej w regulacji tego procesu. W naszych badaniach [88] wykazaliśmy, że spektryna mózgowa wiąże *in vitro* izolowane pęcherzyki synaptyczne z wysokim powinowactwem w pH 7.5-7.8 i umiarkowanej sile jonowej. Stała dysocjacji tego

kompleksu wynosi 59 $\mu\text{g/ml}$, co odpowiada ~ 24 nM synapsyny. Izolowana synapsyna I konkurencyjnie hamuje powstawanie tego kompleksu z pozorną stałą $K_1 \sim 46$ nM. Tworzenie kompleksu pęcherzyków synaptycznych z elementami szkieletu komórkowego, takimi jak spektryna oraz f-aktyna, stało się podstawą kilku hipotez dotyczących regulacji ruchliwości pęcherzyków oraz uwalniania ich zawartości [por. przegl. 89]. Istotnym elementem tych hipotez było uwalnianie pęcherzyków synaptycznych z kompleksu spektryna-aktyna (synapsyna związana z błoną pęcherzyka mogłaby odgrywać rolę białka 4.1 w tym kompleksie) pod wpływem zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny fosforylacji synapsyny. Badania nad wpływem fosforylowanej *in vitro* synapsyny I zarówno za pomocą zależnej od cAMP kinazy białkowej oraz zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny kinazy białkowej II na wiązanie pęcherzyków synaptycznych przez izolowaną spektrynę mózgową wykazały brak efektu fosforylacji w obu rodzajach miejsc [90]. Jaka zatem może być fizjologiczna rola kompleksu spektryny mózgowej z pęcherzykami synaptycznymi? Można zakładać, że pęcherzyki synaptyczne są czynnie transportowane do strefy zakończenia synaptycznego położonej około 100 nm od błony presynaptycznej i tu „zagęszczone” poprzez utworzenie kompleksu ze spektryną. Takie strefy zagęszczonych pęcherzyków obserwowano w badaniach nad ultrastrukturą zakończeń synaptycznych. Co więcej, utrzymywane są one w tej odległości od błony presynaptycznej przez włókna odpowiadające rozmiarami i kształtem spektrynie mózgowej [91]. Zatem funkcją kompleksu byłoby utrzymywanie pęcherzyków w „zagęszczonej” strefie gotowych do fuzji. Zwiększenie stężenia Ca^{2+} na skutek depolaryzacji aksonu powodować może uwalnianie spektryny z niezależnych od ankiry receptorów błonowych i (równocześnie) natychmiastową fuzję pęcherzyków (również wzajemną) i błony presynaptycznej.

Postuluje się [92, 93], że degradacja spektryny mózgowej przez kalpainę oraz wzrost ilości dostępnych receptorów glutaminianu po stymulacji synaptycznej związane są z tzw. długotrwałą potencjacją, a zatem pamięcią. Efekty długotrwałej potencjacji były znacznie mniejsze w przypadku skrawków hipokampusu utrzymywanych w środowisku o niskiej zawartości jonów Ca^{2+} . Warunki, które powodowały wzrost ilości wiązanego glutaminianu korelowały dobrze ze wzrostem degradacji spektryny mózgowej przez kalpainę.

Powyższe rozważania ilustrują jak wiele możliwości udziału spektryn nieerytrocytarnych w regulacji zjawisk w różnych komórkach zostało zaledwie wstępnie poznane.

V. Uwagi końcowe

Przedstawiony powyżej krótki przegląd piśmiennictwa dotyczącego spektryn i ich struktury wskazuje na

dynamiczny rozwój badań nad tymi białkami. Nagromadzone informacje dotyczące struktury tych białek pozwalają na bardzo dokładne studia funkcji poszczególnych domen spektryn zarówno w badaniach *in vitro* jak i w badaniach nad wariantami spektryny pacjentów cierpiących na anemie hemolityczne.

Badania spektryn nieerytrocytarnych wskazują na ich znacznie bardziej zróżnicowaną w porównaniu do spektryny erytrocytarnej funkcję w komórkach. Mia nowicie, oprócz funkcji podobnych do spełnianych przez spektrynę erytrocytarną biorą one udział w wielu procesach włączając w to regulację zjawisk związanych z przewodzeniem synaptycznym.

Najbliższa przyszłość spektrynologii należeć będzie zapewne do badań prowadzonych technikami biologii molekularnej mających na celu wyjaśnienie roli poszczególnych domen różnych spektryn oraz funkcji i udziału poszczególnych izoform spektryny w różnych procesach.

Artykuł otrzymano 13 grudnia 1992 r.

Przyjęto do druku 29 stycznia 1993 r.

Piśmiennictwo

1. Sahr KE, Laurila P, Kotula L, Scarpa A, Coupal E, Leto TL, Linnenbach A, Winkelman JC, Speicher DW, Marchesi VT, Curtis PJ, Forget BG (1990) *J Biol Chem* **265**; 4434-4443
2. Winkelman JC, Jan-Gowth C, Tse WT, Scarpa A, Marchesi VT, Forget BG (1990) *J Biol Chem* **265**; 11827-11832
3. Sikorski AF (1984) *Post Biochem* **30**; 409-434
4. Yoshino H, Minari O (1987) *Biochim Biophys Acta* **905**; 100-108
5. Brandts JF, Erickson L, Lysko K, Schwartz AT, Taverna RD, (1977) *Biochemistry* **16**, 3450-3454
6. Wasenius V-M, Seraste M, Salven P, Eramaa M, Holm L, Lehto V-P (1989) *J Cell Biol* **108**; 79-83
7. Speicher DW (1986) *J Cell Biochem* **30**; 245-258
- 7a. Musachio A, Gibson T, Lehto V-P, Saraste M (1992) *FEBS Lett.* **307**, 55-61
8. Leto TL, Pleasic S, Forget BG, Benz EJJr, Marchesi VT (1989) *J Biol Chem* **264**; 5826-5830
9. Tanaka T, Kadowaki K, Lazarides E, Sobue K (1991) *J Biol Chem* **266**; 1134-1140
10. Anderson JP, Morrow JS (1987) *J Biol Chem* **262**; 6365-6372
11. Pothier B, Morle L, Alloisio N, Ducluzeau MT, Caldani C, Feo C, Garbarz M, Chaveronche I, Dhermy D, Lecomte MC, Boivin P, Delaunay J (1987) *Blood* **69**; 1759-1765
12. Morle L, Morle F, Roux F, Godet J, Forget BG, Denoroy L, Garbarz M, Dhermy D, Katally R, Delaunay J (1989) *Blood* **74**; 828-832
13. Lecomte MC, Garbarz M, Grandchamp B, Feo C, Gautero H, Devaux J, Bournier O, Galand C, d'Auriol L, Galibert F, Sahr KF, Forget BG, Boivin P, Dhermy D (1989) *Blood* **74**; 1126-1133
14. Morle L, Roux AF, Alloisio N, Pothier B, Starck J, Denoroy L, Morle F, Rudigoz RC, Forget BG, Delaunay J, Godet J (1990) *J Clin Invest* **86**; 548-554
15. Coetzer T, Lawler J, Jarolim P, Palek J (1988) *Blood* **72**; Suppl 1, 38a

16. Roux AF, Morle F, Guetarni D, Colonna P, Sahr K, Forget BG, Delaunay J, Godet J (1989) *Blood* 73; 2196-2201
17. Sahr KE, Garbarz M, Dhermy D, Lecomte MC, Boivin P, Agre P, Laughinghouse K, Scarpa A, Coetzer T, Palek J, Marchesi SL, Forget BG, (1990) W: "Cellular and Molecular Biology of Normal and Abnormal Erythroid Membranes" (Palek J, Cohen C, red.) AR Liss, NY, str 201-210
18. Sahr KE, Tobe T, Scarpa A, Laughinghouse K, Marchesi SL, Agre P, Linnenbach AJ, Marchesi VT, Forget BG (1989) *J Clin Invest* 84; 1243-1252
19. Marchesi VT, Letsinger JT, Speicher DW, Marchesi VT, Agre P, Hyun B, Gulati G (1987) *J Clin Invest* 80; 191-198
20. Alloisio N, Morle L, Pothier B, Roux AF, Marechal J, Ducluzeau MT, Benhadji-Zohaoai Z, Delaunay J (1988) *Blood* 71; 1039-1047
21. Pothier B, Alloisio N, Marechal J, Morle L, Ducluzeau MT, Caldani C, Philippe N, Delaunay J, (1990) *Blood* 75; 2061-2069
22. Garbarz M, Lecomte M-C, Feo C, Devaux I, Picat C, Lefebvre C, Galibert F, Gautero H, Bournier O, Galand C, Forget BG, Boivin P, Dhermy D, (1990) *Blood* 75; 1691-1698
23. Lawler J, Coetzer TL, Manhad N, Moore RB, Prchal JT, Palek J (1988) *Blood* 72; 1412-1415
24. Lambert S, Zail S (1987) *Blood* 69; 473-478
25. Tse WT, Lecomte M-C, Costa FF, Garbarz M, Feo C, Boivin P, Dhermy D, Forget BG (1990) *J Clin Invest* 86; 909-916
26. Lecomte M-C, Feo C, Gautero H, Bournier O, Galand C, Garbarz M, Boivin P, Dhermy D (1990) *Brit J Haematol* 74; 497-507
27. Pothier B, Alloisio N, Morle L, Marechal J, Barthelemy H, Ducluzeau MT, Dorier A, Delaunay J (1990) *Hum Genet* 83; 373-376
28. Tse WT, Gallagher PC, Pothier B, Costa FF, Scarpa A, Delaunay J, Forget BG (1991) *Blood* 78; 517-523
29. Garbarz M, Tse WT, Gallagher PC, Picat C, Lecomte M-C, Galibert F, Dhermy D, Forget BG (1991) *J Clin Invest* 88; 76-81
30. Yoon SH, Yu H, Eber S, Prchal JT (1991) *J Biol Chem* 266; 8490-8494
31. Kwiatkowska J (1989) *Post Biochem* 35; 575-584
32. Baron MD, Davison MD, Jones P, Critchley DR (1987) *J Biol Chem* 262; 17623-17629
33. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) *Cell* 53; 219-228
34. Koenig H, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) *Cell* 50; 509-517
35. Fukushima Y, Byers MC, Watkins PC, Winkelman JC, Forget BG, Shown TB (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53; 232-233
36. Youssofian H, McAfee M, Kwiatkowski BJ (1990) *Am J Human Genet* 47; 62-71
37. Xu Y, Prabhakaran M, Johnson ME, Fung L W-M (1990) *J Biomol Struct Dynamics* 8; 055-061
38. Koenig M, Kunkel LM (1990) *J Biol Chem* 265; 4560-4566
39. Cross RA, Steward M, Kendrick-Jones J (1990) *FEBS Lett* 262; 87-92
40. Winograd E, Hume D, Branton D (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88; 10788-10791
41. Kennedy SP, Warren GL, Forget BG, Morrow JS (1991) *J Cell Biol* 115; 267-277
42. Ma Y, Zimmer WE, Zagon IS, Goodman SR (1991) — wysłane do druku
- 42a. Hu R-J, Watanabe M, Bennett V (1992) *J Biol Chem* 267; 18715-18722
43. Ohanian V, Wolfe LC, John KM, Pinder JC, Lux SE, Gratzer WB (1984) *Biochemistry* 23; 4416-4420
44. Wagner GM, Chiu DT, Qju JH, Heath RH, Lublin BH (1987) *Blood* 69; 1777-1781
45. Karinch AM, Zimmer WE, Goodman SR (1990) *J Biol Chem* 265; 11833-11840
46. Imamura M, Endo T, Kuroda M, Tanaka T, Masaki J (1988) *J Biol Chem* 263; 7800-7805
47. Davison MD, Critchley DR (1988) *Cell* 52; 159-160
48. Noegel AJA, Rapp S, Lottspech F, Schleicher M, Stewart M (1989) *J Cell Biol* 109; 607-618
49. Matsudaira P (1991) *TIBS* 16; 87-92
50. Bresnick AR, Warren V, Condeelis J (1990) *J Biol Chem* 265; 9236-9240
51. Becker PS, Schwartz MA, Morrow JS, Lux SE (1990) *Europ J Biochem* 193; 827-836
52. Dubreil RR, Byers TJ, Sillman AL, Bar-Zvi D, Goldstein LSB, Branton D (1989) *J Cell Biol* 109; 2197-2205
53. Wallis CJ, Wenegieme EF, Babitch JA (1992) *J Biol Chem* 267; 4333-4337
54. Goodman SR, Zagon IS, Kulikowski RR (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78; 7570-7574
55. Fishkind DJ, Bonder EM, Begg DA (1987) *Cell Motil Cytoskeleton* 7; 304-314
56. Pollard T (1984) *J Cell Biol* 99; 1970-1980
57. Kwiatkowska K, Sobota A (1990) *Histochemistry* 94; 287-296
58. Bennett V, Condeelis J, (1988) *Cell Motil Cytoskeleton* 11; 303-317
- 58a. Kwiatkowska K, Sobota A (1992) *Cell Motil Cytoskeleton* 23, 111-123
59. Alcina A, Hargreaves AJ, Avila J, Hesketh JE, Fresno M (1988) *Cell Biol Int Rep* 12; 979-985
60. Sikorski AF, Swat W, Wróblewski Z (1988) III Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki, Łódź str 27
- 60a. Sikorski AF, Hanus B, Lorenz M, Bisikirska B, Strzałka K (1992) W: "Biophysics of Membrane Transport" (11th School Proceedings, Kuczera J, Przystański S, red.) Pt. II, str. 320, Wrocław
61. Dubreil RR, Byers TJ, Stewart CT, Kiehart DP (1990) *J Cell Biol* 111; 1049-1058
62. Moon RT, McMahon AP (1990) *J Biol Chem* 265; 4427-4433
63. Byers T, Husain A, Dubreil R, Branton D, Goldstein L, (1989) *J Cell Biol* 109; 1633-1641
64. Winkelman JC, Costa FF, Linzie BL, Forget BG (1990) *J Biol Chem* 265; 20449-20454
65. Dubreil RR, Brandin E, Reisberg JHS, Goldstein LSB, Branton D (1991) *J Biol Chem* 266; 7189-7193
66. Riederer BM, Zagon IS, Goodman SR (1986) *J Cell Biol* 102; 2088-2097
67. Zagon IS, Riederer BM, Goodman SR (1987) *Brain Res Bull* 18; 799-807
68. Goodman SR, Lopresti LL, Riederer BM, Sikorski A, Zagon IS (1989) *Brain Res Bull* 23; 311-316
69. Bloch KJ, Morrow JS (1989) *J Cell Biol* 108; 481-493
70. Coleman TR, Harris AS, Mische SM, Mosserker MS, Morrow JS (1989) *J Cell Biol* 104; 519-526
- 70a. Fujimoto T, Ogawa K (1992) *Acta Histochem Cytochem* 25; 211-216
71. Lee JK, Black JD, Repasky EA, Kubo RT, Bankret RB (1988) *Cell* 55; 807-816
72. Steiner JP, Bennett V (1988) *J Biol Chem* 263; 14417-14425
73. Pollerberg GE, Burridge K, Krebs KE, Goodman SR, Schachner M (1987) *Cell Tiss Res* 250; 227-236
74. Steiner JP, Walke H, Bennett V (1989) *J Biol Chem* 264; 2783-2791
75. Frappier T, Regnouf F (1987) *Eur J Biochem* 169; 651-657
76. Riederer BM, Goodman SR (1990) *FEBS Lett* 277; 49-52
77. Davis J, Bennett V (1984) *J Biol Chem* 259; 13550-13559
78. Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB (1984) *J Cell Biol* 98; 1523-1536
79. Kwiatkowska K, Kriebtukova IA, Gudkova DA, Pinaev GP, Sobota A (1991) *Expl Cell Res* 196; 255-263
80. Carlin RK, Bartelt DC, Siekievitz P (1983) *J Cell Biol* 96, 443-448

81. Nelson WJ, Hammerton RW (1989) *J Cell Biol* **108**; 893-902
82. Damjanov I, Damjanov A, Lehto VP, Virtanen I (1986) *Dev Biol* **114**; 132-140
83. Nelson WJ, Veshnock PJ (1987) *J Cell Biol* **104**; 1527-1537
84. Kaiser HW, O'Keefe WE, Bennett V, (1989) *J Cell Biol* **109**; 557-569
85. Perrin D, Aunis D (1985) *Nature (Lond)* **315**; 589-592
86. Perrin D, Langley K, Aunis D (1987) *J Cell Biol* **102**; 636-646
87. Harris AS, Croall D, Morrow JS (1989) *J Biol Chem* **264**; 17401-17408
88. Sikorski AF, Terlecki G, Zagon IS, Goodman SR (1991) *J Cell Biol* **114**; 313-318
89. Sikorski AF, Goodman SR (1990) W: "Biophysics of Membrane Transport" 10 th School Proceedings Pt II, (Kucze-
ra J, Przestalski S, red) Wrocław, str 129-137
90. Sikorski AF, Goodman SR (1991) *Brain Res Bull* **27**; 195-198
91. Landis DMD, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS, (1988) *Neuron* **1**; 201-205
92. Seubert P, Ivy G, Larson J, Lee J, Shahi K, Baudry M, Lynch G (1988) *Brain Res.* **459**; 226-232
93. Ivy G, Seubert P, Lynch G, Baudry M (1988) *Brain Res.* **459**; 233-240

Fitochelaty — roślinne peptydy wiążące metale ciężkie

Phytochelatin — the heavy metal-binding peptides of plants

ANNA TUKENDORF*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Funkcje fitocheletyn
- II-1. Fitocheletyn w transporcie metali ciężkich do wakuoli
- II-2. Fitocheletyn w gospodarce mikroelementami
- II-3. Fitocheletyn w metabolizmie siarki
- II-4. Fitocheletyn w tolerancji roślin na metale ciężkie
- III. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Function of phytochelatin
- II-1. Phytochelatin in the transport of heavy metals to the vacuole
- II-2. Phytochelatin in turnover of microelements
- II-3. Phytochelatin in sulfur metabolism
- II-4. Phytochelatin in the tolerance of heavy metal in plants
- III. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: GSH — glutation (γ -Glu-Cys-Gly), h-GSH — homo-glutation (γ -Glu-Cys- β -Ala), h-PC — homo-fitocheletyn, MT — metalotioneina, PC — fitocheletyn

Wykaz nazw łacińskich i polskich wymienionych w artykule gatunków roślin:

Acer pseudoplatanus L. — jawor zwyczajny
Agrostis tenuis Sibth. — mietlica pospolita

Agrostis gigantea Roth. — mietlica biaława
Anthoxanthum odoratum L. — tomka wonna
Beta vulgaris L. — burak zwyczajny
Datura innoxia Mill. — bieleń indiański
Deschampsia caespitosa L. — śmiełek darniowy
Equisetum giganteum L. — skrzyp wielki
Glycine max L. — soja owłosiona
Lemna minor L. — rzęsa drobna
Lupinus vulgaris L. — łubin zwyczajny
Mimulus guttatus DC. — kroplik żółty
Nicotiana rustica L. — tytoń bakun
Nicotiana tabacum L. — tytoń szlachetny
Phaseolus vulgaris L. — fasola zwykła
Podophyllum peltatum L. — stopkowiec
Raphanus sativus L. — rzodkiew zwyczajna
Rauwolfia serpentina Benth. — rauwolfia żmijowa
Rosa canina L. — róża dzika
Silene cucubalus L. — lepnica
Triticum aestivum L. — pszenica zwyczajna
Zea mays L. — kukurydza zwyczajna

Azolla filiculoides — paproć wodna
Becium homblei Rośliny wyższe, amerykańskie i azjatyckie, dla których nie znalazłam nazw polskich
Dichapetalum gelanoides
Escholtzia californica
Leptospermum scoparium

Chlorella
Dunaliella bioculata } Glony

Candida glabrata
Neurospora crassa
Saccharomyces cerevisiae
Schizosaccharomyces pombe } Grzyby

* dr hab., Zakład Fizjologii Roślin UMCS, 20-033 Lublin, Akademicka 19

I. Wprowadzenie

W 1989 roku ukazał się w *Postęпах Biochemii* artykuł pt.: „Białka i peptydy wiążące metale ciężkie” [1]. Omawiał on rolę białek w detoksykacji metali ciężkich w organizmach zwierząt i roślin, chociaż większą uwagę zwracał na nowo odkryte metalopeptydowe kompleksy roślinne zwane fitochelatynami.

Od tego czasu przybyło wiele nowych informacji, pojawiło się też szereg kontrowersji i przypuszczeń dotyczących funkcji i powszechności występowania fitochelatyn w roślinach. Omówieniu tych zagadnień poświęcony jest obecny artykuł, który stara się uzupełnić wiedzę zainteresowanych osób o nowe problemy, jakie wyłoniły się z badań prowadzonych w tej dziedzinie w ciągu ostatnich kilku lat.

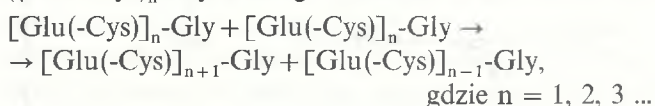
Od 1985 roku [2] wiadomo, że mechanizm detoksykacji jonów metali ciężkich u roślin wyższych, polegający na ich wiązaniu w nietoksyczne kompleksy z białkami, jest odmienny od funkcjonującego u zwierząt i niektórych grzybów. Nie polega on na syntezie *de novo* indukcyjnych białek o charakterystycznych właściwościach, które u zwierząt nazwano metalotioncinami (MT). Odpowiedzią roślin na wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia metali ciężkich jest wytwarzanie, różniących się zarówno sposobem powstawania jak i budową, peptydów o strukturze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, których grupy -SH cysteiny uczestniczą w wiązaniu metalu. Nazywa się je fitochelatynami, poli(γ -glutamylcysteinylo)-glicynami, peptydami wiążącymi kadm (Cd-BP), γ -glutamylpeptydami wiążącymi metale, III klasą metalotionein, a u niektórych grzybów — kadystynami [3-5].

Fitochelatyny strukturą zbliżone są do glutationu ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$), co od dawna nasuwało przypuszczenia o udziale tego konstytucyjnego tripeptydu jako substratu w ich syntezie. Liczne badania, prowadzone na roślinach różnych gatunków wykazały, że akumulacja fitochelatyn jest ściśle skorelowana z zużyciem komórkowego glutationu [6-15]. Stosując inhibitory syntezy glutationu [6, 13, 16, 17], badając mutanty pozbawione enzymów jego syntezy [13, 18] oraz znakując GSH radioaktywną ^{35}S [19] wykazano, że tripeptyd ten jest prekursorem fitochelatyn.

W obecności metali ciężkich w środowisku, w roślinach 20 gatunków rzędu *Fabales* tworzą się oprócz fitochelatyn — pochodnych glutationu — także tzw. homo-fitochelatyny, których strukturę opisuje wzór — $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$. Są one pochodnymi występującego w ich komórkach tripeptydu zwanego homo-glutationem ($\gamma\text{-Glu-Cys-}\beta\text{-Ala}$) [20].

Fitochelatyny oraz homo-fitochelatyny są liniowymi polimerami glutationu i homo-glutationu z powtarzającymi się (2-11 razy w PC i 2-7 razy w h-PC) fragmentami diaminokwasowymi $\gamma\text{-Glu-Cys}$ [21, 22]. Sposób dobudowywania reszt $\gamma\text{-Glu-Cys}$ do tripeptydów pozostawał długo nie wyjaśniony. W 1987 roku R e n n e n b e r g [23] zaproponował kilka możliwych

sposobów biosyntezy peptydowej części fitochelatyn, zakładając udział enzymu o właściwościach transpeptydazy. Jednak dopiero w 1989 roku [24, 25] z ekstraktów komórkowych *Silene cucubalus* wyizolowano enzym uczestniczący w wytwarzaniu metalopeptydowych kompleksów u roślin i opisano jego właściwości. Jest to konstytucyjne, cytoplazmatyczne, oligomeryczne białko aktywne w formie tetrameru i dimeru, złożone z podjednostek o masie cząsteczkowej 25 kD każda. Aktywatorami enzymu są wolne jony metali ciężkich (szczególnie Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Au^+), a substratem glutation lub fitochelatyny o różnej długości łańcucha peptydowego. Funkcja enzymu polega na przenoszeniu diaminokwasowego fragmentu $\gamma\text{-Glu-Cys}$ z donorowej cząsteczki glutationu na akceptorową cząsteczkę glutationu lub fitochelatyny tworząc polimery o strukturze $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ według schematu:



Enzym nazwany został transpeptydazą dipeptydu γ -glutamylcysteiny, ale powszechnie używa się nazwy syntetaza fitochelatynowa.

Obecność enzymu autorzy wykazali jeszcze u roślin kolejnych czterech gatunków: (*Podophyllum peltatum*, *Escholtzia californica*, *Beta vulgaris*, *Equisetum giganteum*) w każdym przypadku potwierdzając jego konstytucyjny charakter. Było to zgodne z wcześniejszymi przypuszczeniami, ponieważ fitochelatyny wykrywano w doświadczeniach *in vivo* u roślin już po kilku minutach od momentu wprowadzenia metalu do pożywki [8, 26].

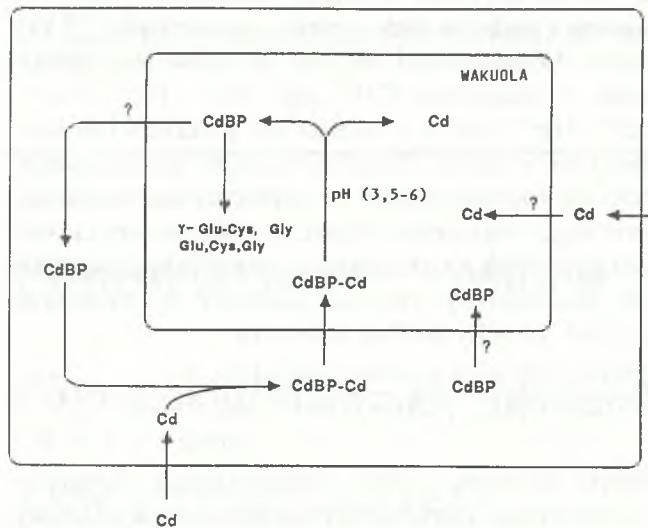
II. Funkcje fitochelatyn

II-1. Fitochelatyny w transporcie metali ciężkich do wakuoli

Za występowaniem fitochelatyn w cytoplazmie przemawia fakt, że glutation — ich prekursor, oraz enzymy szlaku biosyntezy tego prekursora (syntetaza γ -glutamylcysteinowa i syntetaza glutationowa) występują właśnie w cytoplazmie. Również tutaj stwierdzono obecność syntetazy fitochelatynowej, wymagającej dla optymalnej aktywności pH powyżej 7. Ponadto wartość pH cytoplazmy sprzyja wiązaniu wolnych jonów metali w kompleksy z peptydowymi fragmentami fitochelatyn.

Czy jednak samo związanie metalu jest podstawą detoksykacji, a pozostawanie utworzonego kompleksu w cytoplazmie, ostatecznym miejscem i etapem unieruchamiania i przechowywania wolnych jonów w komórce? Częściową odpowiedź na to pytanie dały badania rozmieszczenia metalu i fitochelatyn w protoplastach izolowanych z liści siewek *Nicotiana rustica* poddanych działaniu kadmu [27, 28]. Wynika z nich, że cały pobrany przez protoplasty kadm, oraz wy-

tworzone w odpowiedzi na jego obecność fitochelatyny, były zlokalizowane w wakuolach. Skoro jednak kompleksy metal — fitochelatyna tworzą się w cytoplazmie, do wakuoli musiały zostać przetransportowane. Rycina 1 przedstawia schemat, w którym fitochelatyny pełnią funkcję czynnika transportującego metal do wnętrza wodniczki.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający funkcjonowanie fitochelatyn jako nośników transportujących metal do wakuoli [wg 28].

Obecność wolnych jonów w cytoplazmie aktywuje syntezę fitochelatynową, czego efektem jest tworzenie fitochelatyn (Cd-BP) i chelatowanie metalu. Następnie kompleksy Cd-BP-Cd są transportowane przez tonoplast do wakuoli, gdzie niskie pH (3,5-6) sprzyja ich dysocjacji. Uwolniony metal łatwo tworzy trwałe kompleksy z innymi ligandami (kwasy organiczne, aminokwasy) obecnymi w wakuoli [29], a część peptydowa może być degradowana przez wakuolarną hydrolazę na fragmenty lub wolne aminokwasy, może też powracać do cytoplazmy. Taki mechanizm, chociaż wymagający potwierdzenia, wydaje się najbardziej prawdopodobny, gdyż nie znaleziono dowodów aby metal i fitochelatyny były oddzielnie transportowane do wakuoli i tam ulegały asocjacji.

Zaprezentowane badania wskazują, że detoksykacja kadmu w siewkach tytoniu nie polega wyłącznie na prostym chelatowaniu metalu przez fitochelatyny. Wydaje się, że w tym przypadku detoksykacja jest procesem przeniesienia metalu z cytoplazmy do nieaktywnych metabolicznie miejsc komórki i trwałym unieruchomieniu go przez związanie z efektywniejszymi niż fitochelatyny ligandami.

Nie były to pierwsze doniesienia opisujące występowanie kadmu w wakuolach. Wcześniej stwierdzono, że morski glon *Dunaliella bioculata*, hodowany w obecności wysokich stężeń kadmu, akumuluje pobrany metal wyłącznie w wodniczkiach komórek [30]. Kadm w wakuolach znajdowano również w komórkach roślin *Agrostis gigantea* i kukurydzy uprawianych w obecności CdSO_4 [31]. Wydaje się też, że lokalizacja metali ciężkich w wakuolach nie dotyczy

wyłącznie jonów kadmu, ponieważ w komórkach *Datura innoxia*, rosnących w obecności nadmiaru cynku i kadmu, duże ilości obu metali wykrywano w wakuolach [29].

II-2. Fitochelatyny w gospodarce mikroelementami

Roślinne fitochelatyny, chociaż odmienne sposobem powstawania i budową od zwierzęcych metalotionein, są ich funkcjonalnymi analogami. Analogia ta wyraża się udziałem obu rodzajów kompleksów w detoksykacji nadmiaru wolnych jonów metali ciężkich przy wzroście ich wewnątrzkomórkowych stężeń.

Metalotioneinom oraz fitochelatynom przypisuje się również udział w gospodarce mikroelementów. Dotyczy to zwłaszcza tych jonów metali ciężkich, których organizmy żywe wymagają do prawidłowego rozwoju (Cu, Zn, Ni) [32]. Jony niezbędnych komórce metali, związane w formę Cu-, Zn- czy Ni-fitochelatin, mogą być, po degradacji tych „krótko żyjących” kompleksów, uwalniane i wykorzystywane do wytwarzania metaloenzymów. Taką funkcję fitochelatyn wykazano w doświadczeniach, w których komórki *Rauwolfia serpentina* hodowano w pożywce zawierającej miedź (0,1 μM) i cynk (37 μM) w ilościach fizjologicznych czyli koniecznych do prawidłowego wzrostu komórek. Po 30 minutach, od chwili umieszczenia hodowli w pożywce, komórki pobrały z niej 40% Zn i 70% Cu akumulując je w formie Cu- i Zn-fitochelatin, aż do czasu całkowitego wyczerpania wolnych jonów metali ze środowiska. Podobne obserwacje przeprowadzono w hodowlach komórkowych roślin innych gatunków (*Agrostis tenuis*, *Beta vulgaris*, *Lupinus vulgaris*, *Rosa canina*, *Silene cucubalus*) wykazując tym samym, że nie jest to zjawisko sporadyczne, ograniczone tylko do jednego gatunku [32]. Związane metale są w ten sposób przechowywane, a wyeliminowanie wolnych jonów zabezpiecza wrażliwe na metale funkcyjne grupy enzymów i białek strukturalnych. Przy wzroście zapotrzebowania komórek na metale, są one uwalniane z fitochelatyn i przenoszone na apoformy metalobiałek.

Funkcję fitochelatyn jako donorów metali potwierdzono ostatnio w badaniach metaloenzymów pozbawionych metali [33]. Apoforna oksydazy diaminowej, otrzymana z siewek grochu i pozbawiona miedzi, wykazywała tylko 2% aktywności holoenzymu. Inkubowano ją z siarczanem miedziowym, uznanym wcześniej za najefektywniejszy donor jonów Cu^{2+} dla apoformy tego enzymu, oraz Cu-fitochelatinami o różnej długości łańcucha peptydowego ($n = 2-5$) izolowanymi z komórek roślinnych. Przy użyciu CuSO_4 odzyskiwano 80% aktywności enzymu, tak samo efektywne w reaktywacji były fitochelatyny o krótkich łańcuchach peptydowych ($n = 2$ i 3), a miedź związana w kompleksach o dłuższych łańcuchach była słabiej z nich uwalniana ($n = 4-71\%$, $n = 5-65\%$ aktywności).

Badano również funkcję Zn-fitochelatin, jako donatorów cynku dla apoforny anhidrazy węglanowej pozbawionej metalu. Jako źródła jonów Zn^{2+} stosowano $ZnSO_4$ (100% reaktywacji), $Zn-PC_{n=2}$ (94%) i $Zn-PC_{n=7}$ (70%).

Przy zastosowaniu długołańcuchowych Zn- i Cu-fitochelatin jako donatorów jonów Cu^{2+} i Zn^{2+} , obserwowano słabszą reaktywację obu enzymów. Spowodowane to jest trwalszym wiązaniem (wyższe stałe wiązania) metali przez fitochelatyny o dłuższych łańcuchach peptydowych.

II-3. Fitochelatyny w metabolizmie siarki

Niektóre fitochelatyny, zwłaszcza te, których nagromadzenie się w komórkach indukowane jest przez kadm obecny w środowisku, zawierają, oprócz budujących ich cząsteczki trzech reszt aminokwasowych, również luźno związane jony siarczkowe. Jony te uwalniają się często w postaci H_2S po zakwaszeniu kompleksów. Po raz pierwszy obecność takiego składnika kompleksów stwierdzono w Cd-fitochelatinach roślin pomidora, gdy podczas ekstrakcji korzeni w warunkach kwaśnego pH, obserwowano wydzielanie H_2S (*acid-labile sulfide*) [34]. Towarzyszyła temu zmiana właściwości absorpcyjnych kompleksów metalopeptydowych. Charakterystyczna dla Cd-fitochelatin absorpcja przy 254 nm, wcześniej przypisywana obecności wiązań merkaptidowych metalu poprzez grupy -SH cysteiny, zanikała, gdy obniżono pH do wartości 1,5. Alkaliczacja kompleksu i podwyższenie pH do 9,0, tylko częściowo przywracało A_{254} . Wśród możliwych interpretacji tego zjawiska, najczęściej jako główny powód nieodwracalnej zmiany właściwości absorpcyjnych, wymienia się utratę siarki z kompleksów metalopeptydowych [35].

Siarka uwalniana w postaci jonu siarczkowego z kompleksów Cd-fitochelatinowych, w odniesieniu do całkowitej ilości zawartej w nich siarki, wynosi: 1% u *Rauwolfia serpentina*, 12% u *Chlorella*, 30% u *Glycine max* [36] oraz 21% u *Zea mays* [8, 37]. Składnikiem Cd-peptydowych kompleksów roślin wyższych są często, oprócz jonów siarczkowych, jony siarczynowe, również luźno związane i uwalniane w kwaśnym środowisku (*acid-labile-sulfite*) [3, 38, 39].

Również w produkowanych Cd-(γ -Glu-Cys)_n-Gly kompleksach przez komórki grzybów *Schizosaccharomyces pombe* i *Candida glabrata* obecne są jony siarczkowe, uwalniane w postaci H_2S po zakwaszeniu [40]. Nie obserwowano tej właściwości w Cu-(γ -Glu-Cys)_n-Gly kompleksach *S. pombe* i w Cu-metalotioneinie produkowanej przez *C. glabrata* [41].

W komórkach grzybów *S. pombe* i *C. glabrata*, hodowanych w obecności 1 mM $CdSO_4$, wykryto agregaty, złożone z kryształów CdS opłaszczonych peptydami (γ -Glu-Cys)_n-Gly [42]. Kompleksy te, o właściwościach krystalicznych półprzewodników, miały 20 Å średnicy a rdzeń, otoczony około 30

peptydami, stanowiło 80-85 cząsteczek CdS. Podobne struktury wykrywano również w roślinach pomidora uprawianego przez 3 tygodnie na pożywce zawierającej 100 μ M $CdSO_4$ [43].

Powstawanie krystalicznych agregatów CdS opłaszczonych peptydami wydaje się jednak wątpliwe u roślin rosnących w naturalnych siedliskach zanieczyszczonych kadmem, gdyż nawet przy największych skażeniach gleb, stężenia Cd są jednak znacznie niższe od stosowanych w opisanych powyżej doświadczeniach.

Jaka jest rola jonów siarczkowych i siarczynowych w Cd-(γ -Glu-Cys)_n-Gly kompleksach? Jest nią przede wszystkim wzrost trwałości kompleksu, zwiększenie jego termodynamicznej stabilności i odporności na degradację czyli oddysocjowywanie związanego z nim metalu, co w dużym stopniu zależy od pH. Przy niskich wartościach pH, metal jest łatwo usuwany z połączeń S-Me i wypierany przez protony. Kompleksy nie zawierające jonów siarczkowych i siarczynowych, są w 50% pozbawione metalu w pH 5, a obecność S^{2-} lub SO_3^{2-} sprawia, że taki sam stopień degradacji ma miejsce dopiero przy wartościach pH poniżej 4. Poza tym, obecność siarczków czy siarczynów daje możliwość zwiększenia ilości wiązanego metalu, co podnosi efektywność kompleksów w unieruchamianiu wolnych, toksycznych jonów [39].

Obecność jonów S^{2-} i SO_3^{2-} w Cd-fitochelatinach może wskazywać na inną funkcję kompleksów metalopeptydowych, poza unieruchamianiem metali ciężkich, mianowicie na ich udział w metabolizmie siarki u roślin [34, 39, 44].

Bakterie, grzyby i rośliny wyższe pobierają siarkę w postaci anionu SO_4^{2-} z którego, po redukcji do grupy -SH, siarka jest wbudowywana do aminokwasów, białek, koenzymów, sulfolipidów. Proces ten, polegający na przekształceniu pobranych siarczanów do użytecznej dla roślin grupy sulfhidrylowej, nosi nazwę asymilacyjnej redukcji siarczanów [45]. Zaktwowany, przez wiązanie w formę nukleotydu APS, jon SO_4^{2-} jest przenoszony przy udziale sulfotransferazy APS na nośnik tiolowy, czego wynikiem jest utworzenie sulfotiolu ($R-S-SO_3H$). Enzym charakteryzuje małą specyficzność w stosunku do tioli pełniących rolę nośników. Najlepszymi substratami enzymu są dwutirole, a spośród monotiolei, z podobną dwutiolom wydajnością, wykorzystywany jest glutation. W komórkach *Chlorella* właśnie GSH jest fizjologicznym nośnikiem tiolowym w asymilacyjnej redukcji siarczanów [46]. W następnych etapach procesu, sulfotiol redukowany jest do formy $R-S^-$, a kolejnym akceptorem jonu siarczkowego jest o-acetyloseryna przekształcana do cysteiny.

Podstawą do przypuszczeń o udziale Cd-fitochelatin w szlaku redukcji siarczanów są znane, wielokrotnie potwierdzone i logicznie wiążące się następujące fakty:

1) Kadm, efektywniej niż inne metale ciężkie, stymuluje akumulację fitochelatin [24], do których wytwarzania

niezbędna jest cysteina,

2) Kadm wpływa stymulująco na aktywność kluczowych enzymów wytwarzania cysteiny w szlaku redukcji siarczanów, tzn. sulfurylaze ATP i sulfotransferaze APS [47],

3) Roślinne kompleksy Cd-peptydowe zawierają luźno związane z nimi jony SO_3^{2-} i S^{2-} . Tym samym wykazują strukturalne podobieństwo do tiolowych nośników szlaku redukcji siarczanów, również przejściowo wiążących jony siarczynowe i siarczkowe i mających postać R-S-SO_3^- oraz R-S^- [39, 48],

4) W środowisku kwaśnym z kompleksów Cd-peptydowych uwalniana jest siarka. Podobnie siarka, przyłączana do grupy -SH nośników tiolowych szlaku redukcji siarczanów, może być wymieniona i wydzielana się po zakwaszeniu (*acid-labile sulfur*) [39, 49].

Na podstawie tych faktów przypuszcza się, że Cd-fitochelatyny mogą funkcjonować jako nośniki tiolowe w asymilacyjnej redukcji siarczanów u roślin. Dla wyjaśnienia tych przypuszczeń niezbędne jest wykazanie, czy luźno związane z Cd-fitochelatinami jony SO_3^{2-} i S^{2-} są rzeczywiście wykorzystywane do produkcji cysteiny, czy służą tylko stabilizacji wiązane-go przez te kompleksy kadmu.

II-4. Fitochelatyny w tolerancji roślin na metale ciężkie

Fitochelatyny, dzięki właściwości wiązania wolnych (= toksycznych) jonów metali ciężkich i powszechności występowania w organizmach roślinnych, grają istotną rolę w detoksykacji i tolerancji roślin na ten czynnik stresowy. Fitochelatyny syntetyzowane są przez rośliny tolerancyjne, adaptujące się do wzrostu w obecności metali ciężkich w środowisku. Syntetyzują je również, co wcześniej kwestionowano, rośliny wrażliwe, niezdolne do wzrostu w warunkach zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi [50]. Niesłuszny okazał się też pogląd, że rośliny wrażliwe syntetyzują fitochelatyny w ilościach niewystarczających dla wiązania wolnych jonów metali ciężkich pobieranych przez ich komórki. Rosnący na złożach rud cynkowych Zn-wrażliwy *Acer pseudoplatanus* zawiera w korzeniach 15 razy więcej Zn-PC (0,9 $\mu\text{moli/g}$ s.m.) niż tolerancyjna *Silene cucubalus* (0,06 $\mu\text{moli/g}$ s.m.) [51].

Istotną różnicą między roślinami tolerancyjnymi i wrażliwymi jest natomiast szybkość z jaką syntetyzowane są fitochelatyny w odpowiedzi na wzrost wewnątrzkomórkowych stężeń wolnych jonów metali ciężkich. Cd-tolerancyjne komórki *Datura innoxia* intensywnie produkowały peptyd wiążący Cd w czasie od 4 do 24 godzin do momentu podania kadmu, wiążąc w tym czasie 95% wnikałego do ich komórek metalu. W komórkach Cd-wrażliwych jeszcze po 8 godzinach nie wykrywano obecności Cd-fitochelatin, a dopiero po 24 godzinach 70% pobranego Cd związane było w formie Cd-fitochelatin [52].

Podobne wyniki uzyskano w badaniach Cu-toleran-

cyjnego klonu *Agrostis gigantea*, w którego korzeniach wykrywano obecność Cu-białka w ciągu pierwszego dnia od czasu podania miedzi do pożywki. Korzenie klonu wrażliwego charakteryzowało zahamowanie elongacji, a produkcję Cu-białka, nawet w większych niż u klonu tolerancyjnego ilościach, obserwowano dopiero po upływie 3 dni [3].

Wyniki tych badań pozwoliły uściślić definicję tolerancji. Jest to zdolność do wczesnego i szybkiego uruchomienia syntezy wystarczającej ilości fitochelatin wiążących wolne, toksyczne jony metali ciężkich w nietoksyczne kompleksy.

Fitochelatyny, mimo powszechności występowania i funkcji jaką pełnią w tolerancji roślin na metale ciężkie, nie są jedyną formą wiązania wolnych jonów w nietoksyczne kompleksy. Jony pewnych metali ciężkich nie są ani induktorami syntezy fitochelatin, ani aktywatorami syntetazy fitochelatynowej. Mimo to, rośliny niektórych gatunków adaptują się do wzrostu w warunkach wysokich stężeń tych metali w środowisku. Po drugie, nawet jeśli metal indukuje syntezę fitochelatin w roślinach pewnych gatunków, to w innych przypadkach jego nadmiar detoksykowany jest w całkiem odmienny sposób. Dlatego też, należy skłaniać się ku pogładowi, że mechanizmy wytwarzania tolerancji roślin na metale ciężkie są bardzo różne, zależne zarówno od rodzaju metalu jak i gatunku rośliny.

Przykładów popierających ten pogląd dostarcza zamieszczona niżej tabela (Tabl. 1).

III. Uwagi końcowe

Wielu autorów badających problem detoksykacji metali ciężkich, kwestionuje występowanie metalotionein typu zwierzęcego w roślinach. Znane są jednak roślinne białka wiążące jony metali ciężkich które, ze względu na sposób powstawania i właściwości, zaliczane są do metalotionein. Spotyka się je najczęściej u grzybów, a są nimi: Cu-MT *Neurospora crassa* [68], Cu-MT *Saccharomyces cerevisiae* [69] oraz Cu-MT I i Cu-MT II *Candida glabrata* [70]. U roślin wyższych, w Cd-tolerancyjnych komórkach *Datura innoxia*, część pobieranego przez komórki kadmu jest wiązana z białkiem o składzie i sekwencji aminokwasów jak w metalotioneinach zwierzęcych [60]. Z korzeni zaś Cu-tolerancyjnego klonu *Mimulus guttatus* wyizolowano cDNA, kodujący 72-aminokwasowe białko z powtarzającymi się sekwencjami Cys-X-Cys charakterystycznymi dla metalotionein zwierzęcych [71].

Tkanka zarodkowa nasion pszenicy zawiera bogatą w cysteinę Zn-metalotioneinę, nazywaną białkiem E_c (*early cysteine labeled*) [72]. Być może służy ono przechowywaniu cynku w nasionach, uwalniając metal po degradacji w czasie kiełkowania. Interesujące jest, że fitochelatyny wykrywano dotąd tylko w organach wegetatywnych roślin wyższych (korzenie, liście). Spostrzeżenia te stwarzają perspektywy rozwoju badań

Tabela 1.

Najczęściej spotykane mechanizmy unieruchamiania metali ciężkich w roślinach.

Metal	Forma wiązania i lokalizacja w komórce	Gatunek	Piśm.
Chrom	Cr $\left\{ \begin{array}{l} \text{szczawian} \\ \text{jabłczan} \end{array} \right.$ cytoplazma, wakuola	<i>Leptospermum scoparium</i>	[53]
Cynk	Zn $\left\{ \begin{array}{l} \text{jabłczan} \\ \text{cytrynian} \end{array} \right.$ cytoplazma	<i>Silene cucubalus</i>	[54]
	Zn-szczawian wakuola	<i>Deschampsia caespitosa</i>	[55]
	Zn-kwas fitynowy ściana komórkowa	<i>Silene cucubalus</i>	[54]
	Zn-fitochelatyny cytoplazma	<i>Deschampsia caespitosa</i>	[56]
		<i>Lemna minor</i> <i>Rauwolfia serpentina</i>	[57] [6]
Glin	Al-cytrynian wakuola	<i>Triticum aestivum</i>	[58]
Kadm	wolne jony Cd ²⁺ w ścianie komórkowej	<i>Azolla filiculoides</i>	[59]
	agregaty metalu cytoplazma, jądro, wakuola	<i>Zea mays</i> <i>Agrostis gigantea</i>	[31]
	Cd-metalotioneina cytoplazma	<i>Datura innoxia</i>	[60]
	Cd-fitochelatyny cytoplazma	<i>Zea mays</i>	[8]
	Cd-homofitochelatyny cytoplazma	<i>Phaseolus vulgaris</i>	[20]
	Cd-fitochelatyny wakuola	<i>Nicotiana rustica</i>	[28]
	Cd-kwasy organiczne wakuola	<i>Nicotiana rustica</i>	[28]
	Cd-aminokwasy wakuola	<i>Nicotiana tabacum</i>	[29]
Cd-białka szoku termicznego (Hsp) jądro, mitochondria, chloroplasty	<i>Glycine max</i>	[61]	
Miedź	Cu-DNA, Cu-RNA jądro	<i>Beta vulgaris</i>	[62]
	Cu-aminokwasy cytoplazma	<i>Becium homblei</i>	[63]
	Cu-glutation cytoplazma	<i>Silene cucubalus</i>	[12]
	Cu-metalotioneina cytoplazma	<i>Mimulus guttatus</i>	[64]
	Cu-fitochelatyna cytoplazma	<i>Rauwolfia serpentina</i>	[6]
Nikiel	Ni $\left\{ \begin{array}{l} \text{cytrynian} \\ \text{jabłczan} \end{array} \right.$ wakuola	<i>Dichapetalum gelanoides</i>	[65]
	Ni-fitochelatyny cytoplazma	<i>Rauwolfia serpentina</i>	[6]
Ołów	wolne jony Pb ²⁺ ściana komórkowa	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	[66]
	Pb-pektyniany ściana komórkowa	<i>Raphanus sativus</i>	[67]
	Pb-fitochelatyny cytoplazma	<i>Rauwolfia serpentina</i>	[6]

mogących wyjaśnić rolę metalotionein w roślinach. Być może, w odpowiedzi na wzrost stężenia metali ciężkich, części wegetatywne roślin tworzą fitochelatyny, a tkanki embrionalne, również roślin innych gatunków, wytwarzają białka podobne do E_c nasion pszenicy. Częściowym rozwiązaniem tego problemu byłoby zbadanie, czy genomy roślin zawierają geny syntezy białek typu E_c oraz jak kontrolowana jest ich ekspresja w różnych stadiach rozwojowych roślin.

Perspektywy rozwoju badań nad detoksykacją metali ciężkich w roślinach stwarza też odkrycie, że w wiązaniu toksycznych jonów Cd²⁺ i AsO₄³⁻ mogą uczestniczyć, obok fitochelatyn, również białka szoku termicznego (Hsp) [61]. Ekspresja genów kodujących Hsp w roślinach ulega indukcji zarówno w podwyższonej temperaturze jak i w obecności jonów kadmu i arsenu, a powstałe Hsp uczestniczą w termotolerancji oraz detoksykacji jonów. Nie stwierdzono natomiast, aby działanie wysokiej temperatury indukowało syntezę fitochelatyn, przypisując tę właściwość tylko wolnym jonom metali ciężkich aktywującym syntetazę fitochelatynową. Tym bardziej interesujące jest ostatnie doniesienie [73], że w komórkach grzyba *Schizosaccharomyces pombe*, syntezę kadystyny indukuje uszkodzenie ściany komórkowej oraz inkubacja komórek z chitozanem.

Artykuł otrzymano 9 października 1992 r.
Zaakceptowano do druku 29 grudnia 1992 r.

Piśmiennictwo

- Tukendorf A (1989) *Post Biochem* 35: 141-153
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985) *Science* 230: 674-676
- Rauser WE (1990) *Annu Rev Biochem* 59: 61-86
- Mutoh N, Hayashi Y (1991) W: Riordan JF, Vallee BL (red) *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry*, t. 205. Academic Press, Inc, str 341-347
- Hayashi Y, Isobe M, Mutoh N, Nakagawa CW, Kawabata M (1991) W: Riordan JF, Vallee BL (red) *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry*, t. 205. Academic Press, Inc, str 348-359
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 439-443
- Delhaize E, Jackson PJ, Lujan LD, Robinson NJ (1989) *Plant Physiol* 89: 700-706
- Tukendorf A, Rauser WE (1990) *Plant Sci* 70: 155-166
- Mendum ML, Gupta SC, Goldsbrough PB (1990) *Plant Physiol* 93: 484-488
- Meuwly P, Rauser WE (1992) *Plant Physiol* 99: 8-15
- Howe G, Merchant S (1992) *Plant Physiol* 98: 127-136
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H (1992) *Plant Physiol* 98: 853-858
- Rüegsegger A, Brunold C (1992) *Plant Physiol* 99: 428-433
- Reddy GN, Prasad MNV (1992) *J Plant Physiol* 140: 156-162
- Smith JK, Polle A, Rennenberg H (1990) W: Alscher RG, Cumming JR (red) *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Wiley-Liss, Inc, str 201-215
- Mendum ML, Gupta SC, Goldsbrough PB (1989) *Plant Physiol* 89: 120
- Davies KL, Davies MS, Francis D (1991) *New Phytol* 118: 565-570
- Glaeser H, Coblentz A, Kruczek R, Rüttke I, Ebert-Jung A, Wolf K (1991) *Curr Genet* 19: 207-213
- Berger JM, Jackson PJ, Robinson NJ, Lujan LD, Delhaize E (1989) *Plant Cell Rep* 7: 632-635
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989) *Z Naturforsch* 44c: 361-369
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1991) W: Riordan JF, Vallee BL (red) *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry*, t. 205. Academic Press, Inc, str 333-341
- Zeng W, Hemmasi B (1992) *Liebigs Ann Chem* 1: 311-315
- Rennenberg H (1987) *Plant Mol Biol* 140: 279-292
- Grill E, Löffler S, Winnacker EL, Zenk MH (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6838-6842
- Löffler S, Hochberger A, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1989) *FEBS Lett* 258: 42-46
- Robinson NJ, Ratliff RL, Anderson PJ, Delhaize E, Berger JM (1988) *Plant Sci* 56: 197-204
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1989) *Plant Physiol* 89: 178
- Vögeli-Lange R, Wagner GJ (1990) *Plant Physiol* 92: 1086-1093
- Krotz RM, Evangelou BP, Wagner GJ (1989) *Plant Physiol* 91: 780-787
- Heuillet E, Moreau A, Halpern S, Jeanne N, Puiseux-Dao S (1986) *Biol Cell* 58: 79-86
- Rauser WE, Ackerley CA (1987) *Can J Bot* 65: 643-646
- Grill E, Thumann J, Winnacker EL, Zenk MH (1988) *Plant Cell Reports* 7: 375-378
- Thumann J, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1991) *FEBS Lett* 284: 66-69
- Steffens JC, Hunt DF, Williams BG (1986) *J Biol Chem* 261: 13879-13882
- Reddy GN, Prasad MNV (1990) *Environ Exp Bot* 30: 251-264
- Gekeler W, Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988) *Arch Microbiol* 150: 197-202
- Rauser WE (1991) W: Riordan JF, Vallee BL (red) *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry*, t. 205. Academic Press, Inc, str 319-333
- Eannetta NT, Steffens JC (1989) *Plant Physiol* 89: 76
- Steffens JC (1990) *Annu Rev Plant Physiol* 41: 553-575
- Plocke DJ (1991) W: Riordan JF, Vallee BL (red) *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry*, t. 205. Academic Press, Inc, str 603-610
- Reese RN, Mehra RK, Tarbet EB, Winge DR (1988) *J Biol Chem* 263: 4186-4192
- Dameron CT, Reese RN, Mehra RK, Kortan AR, Carroll PJ, Steigerwald ML, Brus LE, Winge DR (1989) *Nature (Lond)* 338: 596-598
- Reese RN, White CA, Winge DR (1992) *Plant Physiol* 98: 225-229
- Robinson NJ (1989) *J Appl Phycol* 1: 5-18
- Schmidt A, Jager K (1992) *Annu Rev Plant Physiol* 43: 325-349
- Lik-Shing Tsang M, Schiff JA (1978) *Plant Sci Lett* 11: 177-183
- Nussbaum S, Schmutz D, Brunold C (1988) *Plant Physiol* 88: 1407-1410
- Steffens JC (1990) W: Alscher RG, Cumming JR (red) *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, Wiley-Liss, Inc, str 377-394
- Speiser DM, Abrahamson SL, Banuelos G, Owd W (1992) *Plant Physiol* 99: 817-821
- Schat H, Kalff M MA (1992) *Plant Physiol* 99: 1475-1480
- Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1988) *Experientia* 44: 539-540
- Delhaize E, Jackson PJ, Lujan LD, Robinson NJ (1989) *Plant Physiol* 89: 700-706
- Lyon GL, Peterson PJ, Brooks RR (1969) *Planta* 88: 282-287
- Mathys W (1977) *Physiol Plant* 40: 130-136
- Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA, Marschner H (1984) *J Plant Physiol* 116: 59-69
- Van Steveninck RFM, Van Steveninck ME, Ferrnando DR, Godbold DL, Horst WJ, Marschner H (1987) *J Plant Nutr* 10: 1239-1246
- Van Steveninck RFM, Van Steveninck ME,

- Wells AJ, Fernando DR (1990) *J Plant Physiol* **137**: 140-146
58. Ownby JD, Popham HR (1989) *J Plant Physiol* **135**: 588-591
59. Sela M, Fritz E, Huttermann A, Tel-Or E (1990) *Physiol Plant* **79**: 547-553
60. Robinson NJ, Jackson PJ (1986) *Physiol Plant* **67**: 499-506
61. Woźny A, Stroiński A, Gwóźdź E (1990) *Plant Cell Responses to Cadmium*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
62. Silverberg BA, Stokes PM, Ferstenberg LB (1976) *J Cell Biol* **69**: 210-214
63. Reilly C (1972) *Z Pflanzenphysiol* **66**: 294-296
64. Robinson NJ, Thurman DA (1985) W: Lekkas TD (red) *Heavy Metals in the Environment*, t. 2. CEP Consultants Ltd, Edinburg, str 47-50
65. Homer FA, Reeves RD, Brooks RR, Baker AJM (1991) *Phytochemistry* **30**: 2141-2145
66. Poulter A, Collin HA, Thurman DA, Hardwick K (1985) *Plant Sci* **42**: 61-66
67. Lane SD, Martin ES, Garrod JF (1978) *Planta* **144**: 79-84
68. Mürger K, Germann UA, Lerch K (1987) *J Biol Chem* **262**: 7363-7367
69. Butt TR, Ecker DJ (1987) *Microbiol Rev* **51**: 351-364
70. Mehra RK, Tarbet EB, Gray WR, Winge DR (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8815-8819
71. Tomsett AB, Salt DE, De-Miranda J, Thurman DA (1989) *Aspects Appl Biol* **22**: 365-372
72. Lane BL, Kajioka R, Kennedy T (1987) *Biochem Cell Biol* **65**: 1001-1005
73. Hayashi Y, Morikawa SI, Kawabata M, Hotta Y (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **188**: 388-394

Sprawozdania, protokół, komunikaty

Konferencja nt. "Second Messengers & Phosphoproteins" (The Biology & Medicine of Signal Transduction) Glasgow

W dniach 3-8 sierpnia 1992 r. odbyła się w Glasgow, w Szkocji, 8-ma Międzynarodowa Konferencja dotycząca Wtórnych Przekazników i Fosfoprotein. Konferencje tego typu odbywają się co trzy lata i stanowią przegląd najnowszych osiągnięć z różnych dziedzin wiedzy związanych z powyższą tematyką. Spotkanie zorganizowane zostało przez grupę naukowców z Uniwersytetu w Sheffield, a w skład Komitetu Organizacyjnego weszli tacy badacze jak M. J. Berridge, R. H. Mitchell, P. Cohen, R. F. Irvine i S. R. Nahorski. O rozmiarze Konferencji świadczy ilość uczestników wynosząca około dwóch tysięcy osób, a także fakt przedstawienia na kolejnych sesjach plakatowych ponad 600 posterów. Zajęcia plenarne i sympozjalne odbywały się od godziny 8.45 do 19.00; o godzinie 20.00 rozpoczynały się warsztaty (workshops) trwające do godziny 23.00. Każdego dnia odbywały się ponadto sesje plakatowe. Z Polski w Konferencji uczestniczyły cztery osoby.

Konferencja rozpoczęła się wykładem inauguracyjnym prof. P. Greengarda (New York, USA) pt. „Transdukcja sygnałów w mózgu: rola fosforylacji”. Ponadto wygłoszono sześć wykładów plenarnych oraz liczne wykłady sympozjalne. Wykłady plenarne dotyczyły:

1. Sygnałów wywoływanych przez kinazę tyrozynową — A. Ulrich (Martinsreid, Germany),
2. Białek G i regulacji cykazy adenylanowej — A. G. Gilman (Dallas, USA),
3. Syntazy tlenku azotu (NO) i roli tego związku w przekazywaniu informacji oraz procesach immunologicznych — S. Moncada (Beckenham, UK),
4. Roli kinazy białkowej w przekazywaniu sygnałów komórkowych jako ogniwa łączącego fosfolipazę C i fosfolipazę A2 — Y. Nishizuka (Kobe, Japan),
5. Przestrzennych i czasowych sygnałów wapniowych badanych z zastosowaniem techniki patch-clamp — E. Neher (Gottingen, Niemcy),
6. Insuliny i transkrypcji genów — D. Granner (Nashville, USA).

Na ośmiu sympozjach tematycznych wygłoszono 31 wykładów. Poniżej podajemy tytuły sympozjów, nazwiska osób wygłaszających wykłady oraz, ze względu na obfitość materiału, tytuły tylko niektórych wykładów, przybliżających problematykę Sympozjów.

Sympozjum I: Rodziny receptorów (M. Parmentier, S. Dower, R. Lefkowitz, D. Garbers).
Wykłady: „Receptory adrenergiczne” (Lefkowitz); „Rodzina receptorów cykazy guanylanowej” (Garbers).

Sympozjum II: Wiązanie receptorowych kinaz tyrozynowych z efektorami (J. Schlessinger, E. Van Obberghen, N. K. Tonks, G. Carpenter, S. A. Courtneidge). Wykład: „Regulacja fosfolipazy C poprzez receptor EGF” (Carpenter).

Sympozjum III: Regulacja fosfolipaz poprzez receptory (M. Wakelam, R. M. Kramer, S. G. Ree, J.

Ext on). „Regulacja izomerycznych form fosfolipazy C” (Rhee); „Rola białka w aktywacji fosfolipazy C hydrolizującej fosfolipidy inozytolowe” (Ext on).

Symposium IV: Oddziaływanie NO na cykliczny GMP (E. Böhme, B. Mayer, T. Lincoln, F. Murad, J. Garthwaite). Wykład: „Przekazywanie informacji pomiędzy komórkami z udziałem układu: NO/cykliczny GMP” (Murad).

Symposium V: Rodzina trójpodjednostkowych białek G (M. Simon, W. Rosenthal, A. Spiegel).

Symposium VI: Przestrzenno/czasowe aspekty sygnałów wapniowych (W. Schlegel, P. Cobbold, D. Clapham, R. Tsien).

Symposium VII: Kontrola ekspresji genów (M. Karin, J. Woedgett, T. Curran, S. Jackson).

Symposium VIII: Fosforylacja białek i kontrola wzrostu (T. W. Sturgill, J. Pouyssegur, P. Cohen, E. Krebs). Wykład: „Regulacja serynowo-treoninowych kinaz białkowych przez kinazy tyrozynowe” (Krebs).

Uczestnicy wieczornych warsztatów dyskutowali następujące problemy: „Inozytole fosforylowane w pozycji 3 pierścienia”; „Nowe kinazy białkowe”; „Współzależności pomiędzy układami przetwarzania informacji (crosstalk)”; „Białkowe fosfatazy”; „Kinaza białkowa C”; „Nowe fosfolipidy inozytolowe”; „Cyklaza adenylanowa”; „Wewnątrzkomórkowe kanały wapniowe”; „Przekazywanie informacji a cytoszkielet”; „Fosfodiesterazy”; „Białka G o małym ciężarze cząsteczkowym”; „Przekazywanie sygnałów w limfocytach T i B”. Warsztaty były prowadzone podobnie jak i wykłady przez wybitnych znawców przedmiotu, jak np. H. J. Berridge a i R. F. Irvina.

Obszerna tematyka konferencji nie pozwalała na dokładne omówienie wszystkich prezentowanych zagadnień. Dlatego przedstawiamy jedynie niektóre z nich. Przekazywanie informacji w komórce poprzez fosforylację i defosforylację białek było tematem wykładu prof. P. Greengarda oraz tegorocznego laureata nagrody Nobla — prof. Edwina Krebsa. Prof. P. Greengard omawiał ten problem na przykładzie działania synapsyny i białka DARPP32. Synapsyna jest białkiem wiążącym się z pęcherzykiem synaptycznym, przez co unieruchamia go wiążąc do cytoszkieletu. Fosforylacja synapsyny powoduje odłączenie się białka od pęcherzyka, który dzięki temu uzyskuje możliwość przesuwania się w kierunku szczeliny synaptycznej i uwalniania do niej ze swego wnętrza neurotransmiterów. Fosforylacja synapsyny następuje poprzez zależną od wapnia i kalmoduliny kinazę białkową II. Ostatnio wykazano, że enzym ten stanowi integralną część błony pęcherzyka synaptycznego i do jego regulatorowego regionu wiąże się właśnie synapsyna. Pobudzenie komórki powoduje mobilizację wapnia, który aktywując kinazę powoduje fosforylację synapsyny i natychmiastową odpowiedź komórki w postaci uwolnienia neurotransmitera. Z kolei ufosforylowanie cytosolowego białka DARPP32 zmienia je w inhibitor białkowej fosfatazy I. Zahamowanie fosfatazy powoduje zwiększenie puli ufosforylowanych substratów białkowych w komórce (np. Na/K ATPazy, która w ufosforalowanej formie jest nieaktywna) i określoną fizjologiczną odpowiedź komórki. Natomiast prof. Edwin Krebs zajmował się białkiem rybosomalnym S6, fosforylowanym wyłącznie w resztach serynowych. Białko to jest silnie fosforylowane przez czynniki wzrostu, mające w swoich receptorach kinazę tyrozynową. Prof. E. Krebs wykazał, że między kinazą tyrozynową receptora a białkiem S6 występuje kilka kinaz serynowo-treoninowych tworząc kaskadę fosforylacji w komórce, i tak np. kinaza kinazy białka S6 działa na kinazę białka S6, a ta dopiero fosforyluje białko S6, które tylko w tej formie uczestniczy w procesie translacji. Z kolei, prof. A. G. Gilman przedstawił różnorodność trójpodjednostkowych białek G. Okazało się, że nie tylko podjednostka α ma zdolność wiązania i aktywacji określonego efektora, lecz także kompleks podjednostek β - γ . Zarówno podjednostka α , jak i β - γ aktywują fosfolipazę C typu β (wykład prof. Ext on a). Natomiast fosfolipaza C typu γ (wykład prof. Rhee) jest aktywowana przez kinazę tyrozynową. Z kolei prof. Y. Nishizuka omawiał współzależności szlaków przekazywania informacji występujących w komórce w wyniku rozpadu fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforanu (PtdIns(4,5)P₂) i fosfatydylocholino (PC) powodowanych przez fosfolipazę C działającą na PtdIns(4,5)P₂, jak i fosfolipazy D i A2 działające na PC. Kinaza białkowa C wydaje się być ogniwem spinającym te dwa układy przetwarzania informacji w komórce. Wiele miejsca poświęcono także powstawaniu i działaniu tlenku azotu uważanego obecnie za nowo odkryty przekaźnik informacji w komórce. Utworzony w komórce nerwowej z L-argininy przez syntazę tlenku azotu, NO łatwo dyfunduje do następnej komórki, gdzie łączy się i aktywuje cyklazę guanylanową tworząc cykliczny GMP — inny wtórny przekaźnik informacji (wykład prof. S. Monaco d o).

Niestety, streszczenia wykładów plenarnych czy sympozjalnych nie były drukowane w postaci dostępnych materiałów Konferencji. Organizatorzy przygotowali jedynie streszczenia komunikatów prezentowanych na sesjach plakatowych. Nasza grupa prezentowała poster na temat wpływu związków modulujących poziom wewnątrzkomórkowego wapnia na syntezę fosfatydyloseryny w komórkach glejaka C6, zatytułowany: „The effect of neurotransmitters, thapsigargin and ionophore A23187 on the phosphatidylserine synthesis in glioma C6 cells” (M. Czarny, P. Sabała, L. Kaczmarek and J. Barańska), zakwalifikowany do sesji posterów związanych tematycznie z wewnątrzkomórkowymi magazynami wapnia.

Konferencja omawiana w powyższym Sprawozdaniu przytłaczała swoją wielkością, ilością osób biorących w niej udział, przedstawianych posterów, oraz zakresem podawanych informacji. Była jednak świetnie zorganizowana. Toteż w opinii wielu naukowców, z którymi mieliśmy okazję rozmawiać, została uznana za jedną z najlepszych i najciekawszych Konferencji 1992 roku.

Jolanta Barańska, Małgorzata Czarny, Paweł Sabala

21 Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych w Dublinie (FEBS'92)

Tegoroczne spotkanie Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych miało miejsce w stolicy Irlandii, Dublinie w dniach od 9 do 14 sierpnia. Organizatorem było Irlandzkie Towarzystwo Biochemiczne, a miejscem spotkania Trinity College, obchodzący 400-lecie istnienia.

W starych murach tej uczelni spotkało się około 1000 biochemików z Europy, a także ze Stanów Zjednoczonych, Kanady, Japonii, Tajwanu, Izraela, Australii, Nowej Zelandii, a nawet Nigerii i Madagaskaru. Czynnie uczestniczyło w Zjeździe, wygłaszając referaty lub przedstawiając swoje prace w sesji plakatowej, 683 osoby, w tym 3 z Polski.

Jak zazwyczaj, obrady toczyły się w kilku sekcjach równolegle. Najwięcej uczestników było zainteresowanych referatami sekcji dotyczącej zwijania i stabilności białek i mechanizmu działania enzymów. Wiele osób uczestniczyło w sekcji omawiającej najnowsze osiągnięcia w badaniach nad genomem człowieka i chorobami genetycznymi, a także mechanizmem odpowiedzi immunologicznej i przenoszeniem sygnałów w systemie immunologicznym. Na uwagę zasługiwały sekcje immunotechnologii i inżynierii białek, a także specjalistyczna sekcja dotycząca biotechnologii piwa i mleka.

W programie Zjazdu był również: rozwój i różnicowanie komórek, w tym molekularna regulacja dzielenia się komórek oraz biochemia zaprogramowanej śmierci komórki, regulacja ekspresji genu, lipoproteiny i rodniki a naczyniowe choroby u ludzi, indukowane przez światło uszkodzenia i naprawy DNA, aspekty biochemiczne stresu niskich temperatur, biochemia mięśni i cytoszkieletu komórki, bioenergetyka, neurochemia, molekularna patologia białek w chorobie Alzheimera, toksyny białkowe, mechanizm ich działania i zastosowania, hemiceluloza i hemicelulazy i wreszcie biosensory (biologiczne czujniki) a biotechnologia komórki.

Ceremonia otwarcia FEBS-u odbyła się w sali teatralnej Trinity College i dokonała jej dr Norma Ryan, przewodnicząca Irlandzkiej Sekcji Towarzystwa Biochemicznego. Zebranych powitał dr M. J. Carroll, dziekan Wydziału Nauk Trinity College i dr T. M a n t l e, przewodniczący Komitetu Organizacyjnego Zjazdu.

Referat inauguracyjny, nagrodzony medalem Sir Hansa K re b s a wygłosił dr R. H u b e r na temat: „Krystalografia białek — dziedzina *przecinających się* nauk: chemii, fizyki i biologii”. Autor referatu omówił na przykładach kilku białek ostatnie osiągnięcia w tej dziedzinie. Uwagę swą skoncentrował na białkach związanych z błonami, do krystalizacji których użyto detergenty, a także na kompleksach białko-inhibitor i dimerach. Szczegółowo omówił wiązanie się inhibitorów proteolitycznych z białkami, co stanowi przedmiot badań jego zespołu.

Ceremonię otwarcia Zjazdu zakończyło spotkanie towarzyskie przy winie, które odbyło się w pięknej Sali Egzaminacyjnej.

Referatom ogólnym i doniesieniom sekcyjnym towarzyszyła sesja plakatowa, umiejscowiona w osobnym budynku, co zmuszało uczestników do kilkuminutowego, codziennego spaceru aleją parkową przez tereny rekreacyjne Trinity College. Sprzyjała tym spacerom ciepła, sierpniowa aura, urozmaicona kiku ulewnymi deszczami.

Dużym zainteresowaniem cieszyła się też sesja edukacyjna, której przesłaniem było budowanie więzi w Europie. Tematem doniesień były formy kursów dla studentów i osób z ukończonymi studiami, wymiana studentów w programie „Erazmus” między europejskimi uniwersytetami, współpraca ośrodków akademickich z przemysłem w różnych krajach Europy, praktyki studenckie w zakresie biotechnologii w przemyśle.

Zjazdowi towarzyszyły wystawy aparatury i odczynników bardziej i mniej znanych firm takich jak: Merck, Pharmacia Biosystems, Boehringer Mannheim, Calbiochem, a także Biosym Technologies, Novabiochem, Biostructure S.A. Zielone torby dla wszystkich uczestników Zjazdu ufundowała firma Boehringer Mannheim.

Można było również obejrzeć wystawy firm wydawniczych: Elsevier Science, Pergamonn Press, Oxford University Press, Academic Press i Springer Verlage.

Firma Applied Biosystems zorganizowała wykład i pokaz aparatury do sekwencjonowania białek i nukleotydów.

Zjazd miał również bogaty program pozanaukowy dla uczestników Zjazdu i osób towarzyszących. Wstęp na spotkanie przy winie w dniu otwarcia Zjazdu i uroczysta kolacja w drugim dniu Zjazdu były wolne od opłat. Pozostałe imprezy, takie jak Irlandzki Wieczór w Trinity College i wszystkie wycieczki w okolice Dublina: do doliny Glendalough, na Malachitowe Wybrzeże i do Ogrodów Góry Usher były bardzo kosztowne. Większość uczestników Zjazdu i osób towarzyszących obejrzała 12 sierpnia wyścigi konne w Leopardstown, przedmieściu Dublina, bowiem bilet na tę imprezę wliczono w koszty ogólne Zjazdu.

Atmosfera Zjazdu była bardzo miła, szczególnie serdecznie organizatorzy Zjazdu odnosili się do uczestników z państw postkomunistycznych Europy: Litwy, Ukrainy, Rosji, Bułgarii i dawnej Jugosławii, dla których ufundowano stypendia.

Uczestnicy Zjazdu zakwaterowani byli albo w ośrodku akademickim na południowym przedmieściu Dublina, albo w Trinity College (głównie zaproszeni przez organizatorów lektorzy), a także w nowym ośrodku uniwersyteckim, położonym na północnym przedmieściu Dublina, skąd dojeżdżali na całodzienne obrady zielonymi, piętrowymi autobusami, charakterystycznymi dla Irlandii.

W organizacji Zjazdu były pewne niedociągnięcia, czego dowodem są aż trzy uzupełnienia streszczeń zjazdowych, wydawane na bieżąco. Dr Tim Mantle, najbardziej zapracowana osoba spośród organizatorów Zjazdu był w stałym kontakcie z uczestnikami Zjazdu i robił co mógł, aby wszelkie błędy organizacyjne naprawić. Dr Norma Ryan, Przewodnicząca Towarzystwa Biochemicznego Irlandii i Irlandii Północnej, Prezydent FEBS'92 znajdowała czas na osobistą rozmowę z uczestnikami Zjazdu.

Ceremonia zamknięcia Zjazdu odbyła się 14 sierpnia po południu. Referat z cyklu "Datta Lecture" wygłosił Prof. Daniel E. Koshland, Jr. z Uniwersytetu Berkeley w Kalifornii. Tematem prelekcji były: „Receptory, enzymy i konformacyjne zmiany”.

Następnie wręczono nagrody tegorocznego FEBS-u dla przedstawiających swoje prace prelegentów, którzy nie przekroczyli 40-go roku życia. Pierwszą nagrodę otrzymał dr S. A. Benner z Zurichu, który wygłosił referat na temat „Zwijanie RNazy a molekularna ewolucja”. Autor zajmuje się stereochemią enzymów i zastosowaniem metod komputerowych do porównywania sekwencji białek i przewidywania ich struktury. Druga nagroda przypadła dr A. S. Whitehead'owi z Dublina, który zajmuje się genetyką molekularną i ekspresją białek rodziny A w komórce.

Na następny FEBS'93 zebranych uczestników zaprosił dr Stefan Nordlund do Sztokholmu. Zjazd zamknęła dr Norma Ryan, dziękując wszystkim za uczestnictwo.

Uczestnicy tegorocznego FEBS-u zapamiętają miłą, kameralną atmosferę Zjazdu, życzliwość ich organizatorów, interesujący program naukowy i pozanaukowy, urok starych murów Trinity College i kolorowego Dublina. Wszystko to sprzyjało bowiem nawiązaniu i odnowieniu naukowych przyjaźni i stymulowało dyskusje przenoszone poza ściany sal konferencyjnych.

Maria Agnieszka Siwecka

V Sympozjum Fluorowe Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie

Dnia 25 września 1992 roku odbyło się w Szczecinie V Sympozjum Fluorowe n.t.: „Biologiczne zagrożenia związkami fluoru”, zorganizowane przez Oddział Szczeciński Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Udział w Sympozjum zgłosiło ponad 60 osób z kraju i 3 gości zagranicznych. Pochodzili oni z 15 ośrodków naukowych (Cieplice, Gdańsk, Giessen, Göttingen, Katowice, Köln, Kórnik, Kraków, Łódź, Poznań, Puławy, Sosnowiec, Szczecin, Wrocław, Zabrze). W czasie trwania Sympozjum przedstawiono 20 komunikatów w postaci plakatowej i wygłoszono 8 następujących referatów:

1. Biologiczne zagrożenia zwierzęcy płowej związkami fluoru na terenach przyszłego Parku Nadodrzańskiego (Z. Machoy, Szczecin);

2. Pathological tooth alterations in roe deer (*Capreolus capreolus*) caused by chronic fluoride intoxication (U. Kierdorf, Göttingen, H. Kierdorf, Köln, Niemcy);

3. Wpływ fluorków na mineralizację w jamie ustnej (M. Borysewicz-Lewicka, Poznań);

4. Komputerowa analiza obrazu radiologicznego w ocenie mineralizacji kośćca u dzieci z fluorozą zębów (D. Chlebna-Sokół, Łódź, E. Czerwinski, Kraków);

5. Effect of calcium intake on the bone mineral content and incidence of osteoporosis (E. Renner, G. Knie, H. Stracke, Giessen, Niemcy);

6. Z problematyki analitycznej oznaczania śladowych ilości połączeń fluoru (J. Markiewicz, Kraków);
7. Włosy jako wskaźnik narażenia na fluorki (J. Krechniak, Gdańsk);
8. Znaczenie łożyskowego transportu fluorków (D. Chlubek, Szczecin).

Sesja plakatowa i dyskusje przy plakatach odbyły się w przerwie obrad od godziny 12 do 14 i stanowiły ważną część Sympozjum. Była to sposobność dla omówienia uzyskanych wyników, wysłuchania objaśnień, zadawania pytań i wypowiedzenia własnych opinii o założeniach pracy, stosowanych metodach badawczych i celowości podjętych badań. Dało to także satysfakcję autorom plakatów, bowiem każdy z nich miał możliwość przedstawienia swoich naukowych osiągnięć z zakresu tematyki fluorowej. W prezentowanej tematyce można wyróżnić pewne wspólne obszary zainteresowań: fluorki w płynach ustrojowych, udział ich w procesach mineralizacji kości i zębów, intoksykacje zwierząt doświadczalnych, interakcje fluorków z enzymami. Komisja oceniająca plakaty w składzie: prof. J. Markiewicz, doc. E. Czerwiński, (obaj z Krakowa) oraz dr T. Wesołowska, przewodnicząca Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego ufundowała 4 wyróżnienia (nagrody książkowe). Otrzymali je: dr A. Konarska z Kliniki Otolaryngologii w Szczecinie (za warsztat pracy), dr M. Chmielnik i współ. z Poznania (za formę przedstawienia wyników) oraz dr T. Ogóński i współ. i dr G. Gałka i współ. ze Szczecina (za wartość naukową plakatu). Komisja oceniająca plakaty zwróciła także uwagę na pewne nowatorskie prace związane z metabolizmem fluoru. Należały do nich badania wykazujące udział fenoli w reakcjach obronnych przed toksycznymi gazami — w tym związkami fluoru u drzew szpilkowych. Ciekawą pracą było doniesienie o wpływie jonów fluorkowych na cytolizę i degranulację króliczych granulocytów obojętnochłonnych w porównaniu do granulocytów ludzkich. Zdaniem mikrobiologów podwyższenie zawartości związków fluoru w organiźmie wskazuje na możliwość wystąpienia pewnych zaburzeń odpornościowych. W doniesieniach i referatach wskazano także, że fluor wpływa niekorzystnie na ogólny rozwój i stan zdrowia dzieci, co obserwowano w miejscowościach o ponadoptimalnym stężeniu fluorków w wodach pitnych (Malbork, Błaszczki, Nysa). Okazało się także, że wyciągi z pyłków kwiatowych (preparat Cernityna) łagodzi niekorzystne zmiany biochemiczne w wątrobie wywołane przewlekłym narażeniem na pary fluorku amonowego. Podobnie jak na poprzednich sympoziach ciągle powraca sprawa kontrowersyjnego zachowania się fosfatazy alkalicznej, której aktywność bądź wzrasta bądź obniża się pod wpływem jonu fluorkowego. W poszukiwaniu dalszych wskaźników skażenia środowiska fluorem przydatne okazały się skorupy ptasich jaj, które ze względu na częstość występowania w okresie lęgowym mogą stanowić łatwo dostępny materiał badawczy.

Referatem adresowanym do wszystkich uczestników Sympozjum, głównie do analityków zajmujących się związkami fluoru, był wykład prof. J. Markiewicza. Zwrócił on ponownie uwagę na niedoskonałość metod analitycznych stosowanych w różnych laboratoriach w Polsce i dlatego analityka oznaczania związków tego pierwiastka w różnym materiale biologicznym jest niezadawalająca.

W podsumowaniu Sympozjum stwierdzono, że w Polsce fluor stanowi nadal znaczący czynnik zanieczyszczający środowisko naturalne. W Hamburgu ostatnią z hut aluminium zamknięto 15 lat temu. Obserwowana ostatnio poprawa niektórych parametrów środowiskowych w Polsce jest raczej wynikiem zmniejszonej produkcji przemysłowej niż planową działalnością odpowiednich Władz i instytucji zajmujących się ochroną środowiska naturalnego — w tym wpływu fluoru na organizmy żywe.

V Sympozjum Fluorowe trwało jeden dzień ze względu na koszty ponoszone przez uczestników, chociaż część gości pozostała w naszym mieście dłużej w celach turystycznych. Prace prezentowane podczas V Sympozjum zostały wydane przez Oddział Szczeciński PTBioch. i Szczecińskie Towarzystwo Naukowe. Materiały opublikowano w postaci recenzowanych, częściowo skróconych, opracowań z tytułem i streszczeniem w języku angielskim (129 stron). Ich książkowe wydanie było możliwe dzięki pomocy finansowej Wydziału Gospodarki Wodnej i Ochrony Środowiska Urzędu Wojewódzkiego w Szczecinie. Przedmowę do tego wydania napisał prof. Gene Miller (USA), sekretarz generalny Międzynarodowego Towarzystwa Badania Fluorków (ISFR).

Zygmunt Machoy

Sprawozdanie z XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Łódź 16-18.09.1992 r.

W dniach 16-18 września 1992 r. obradował w Łodzi XXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Obrady Zjazdu odbywały się na terenie Uniwersytetu Łódzkiego, w salach Gmachu Fizyki.

W Zjeździe uczestniczyło około 410 członków i sympatyków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z kraju oraz około 20 gości z zagranicy (Bułgaria, Czechosłowacja, Holandia, Francja, Niemcy, Rosja, Szwecja,

Szwajcaria, Wielka Brytania, Włochy, Polskie Towarzystwo Naukowe z Białorusi).

Uroczyste Otwarcie Zjazdu miało miejsce 16-go września o godz. 10¹⁵ w Auli Gmachu Fizyki UŁ. Zaproszonych gości — Przedstawiciele Władz Miasta, Rektorów Łódzkich Uczelni, Członków Honorowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego oraz wszystkich zebranych powitał Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego dr hab. Stanisław Bielecki. Następnie głos zabrali Goście Zjazdu i o godzinie 11³⁰ rozpoczęły się obrady Sesji Plenarnej I, podczas której referaty wygłosili: prof. dr hab. Adam Jaworski z Uniwersytetu Łódzkiego nt. „Rola białek histonopodobnych oraz zmian konformacji przestrzennej DNA w regulacji ekspresji genów u bakterii” oraz prof. Johannes Tramper z Wageningen Agricultural University (Holandia) pt. „Tailoring the medium and bioreactor for biocatalysis”.

W ramach Sesji Plenarnych II-ej i III-ej, które odbyły się 16-go i 17-go września po południu wygłoszone zostały referaty prof. dr hab. Kazimierza L. Wierchowskiego pt. „Inicjacja transkrypcji u prokaryota” oraz prof. Manlio Palumbo z Włoch pt. „Potential anticancer agents exhibiting specific binding to DNA”.

Obrady XXVIII Zjazdu PTBioch. toczyły się w siedmiu następujących grupach tematycznych:

- Symposium I Ekspresja genów w systemach heterologicznych.
- Symposium II Białka aparatu genetycznego.
- Symposium III Oddziaływanie ligandów z DNA.
- Symposium IV Wpływ mutagenów środowiskowych na genom.
- Symposium V Metabolizm i funkcja peptydów biologicznie czynnych.
- Symposium VI Biotechnologia
 - Biotechnologia mikrobiologiczna
 - Biotechnologia środowiskowa i rolno-spożywcza
- Symposium VII Doniesienia różne
 - Patobiochemia
 - Enzymy, inhibitory
 - Błony biologiczne, biochemia farmakologiczna i toksykologiczna
 - Inne

Łącznie do programu Zjazdu zgłoszono 376 referatów i doniesień.

W ramach Symposium I-go, którego organizatorem był prof. dr hab. Andrzej Płucienniczak z Laboratorium Inżynierii Genetycznej w Sieradzu wygłoszono dwa referaty oraz 21 doniesień podczas dwóch sesji. Każdą z nich otwierał przeglądowy referat; pierwszego dnia — „Bariery w ekspresji genów heterobiologicznych u bakterii Gram-dodatnich” (dr Piotr Ceglowski), drugiego dnia — „Klonowanie heterologicznych genów w drożdżach” (prof. dr hab. Magdalena Fikus). Tematyka doniesień była zróżnicowana, większość z nich dotyczyła jednak badań genomów roślinnych (szczególnie pszenicy) oraz ekspresji heterologicznych genów kodujących białka bakteryjne, roślinne oraz człowieka w *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae*. Zarówno zakres badań jak i stosowana do ich wykonania metodyka wskazują na znaczny postęp osiągnięty w polskich laboratoriach biologii molekularnej. Referaty oraz doniesienia były bardzo dobrze przygotowane pod względem merytorycznym i przedstawiane ze staranną ilustracją. Częstokroć kwadrans przeznaczony na prezentację doniesienia i dyskusję okazywał się zbyt krótki.

Organizatorkami Symposium I-go były prof. dr hab. Zofia Kiliańska i prof. dr hab. Anna Lipińska z Katedry Cytobiochemii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UŁ. Symposium odbyło się w dwóch sesjach. Wygłoszono 10 referatów, w tym dwa przez naukowców z liczących się w świecie ośrodków zagranicznych: Dr Ulrich Pfeiffer z Instytutu Badań nad Rakim w Genui oraz prof. Aleksandra van der Decken z Uniwersytetu w Sztokholmie. Wiodącym tematem symposium była struktura aktywnej transkrypcyjnie chromatyny.

Symposium III (organizator, prof. dr hab. Marek Gniazdowski z Instytutu Fizjologii i Biochemii AM w Łodzi) poświęcone było oddziaływaniu ligandów z DNA a jego tematyka była komplementarna w stosunku do symposium IV. Z problematyką tego symposium związane były referaty plenarne nt. inicjacji transkrypcji u prokaryota (prof. dr hab. K.L. Wierchowski, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) i nt. potencjalnych związków przeciwnowotworowych tworzących specyficzne wiązanie z DNA, w których z jednej strony wielopierścieniowy układ aromatyczny wykazuje powinowactwo do struktury DNA natomiast dołączony do tego układu peptyd swoiście rozpoznaje sekwencję w DNA (M. Palumbo, Uniwersytet w Padwie). Chemiczna modyfikacja DNA i jej konsekwencje biologiczne były przedmiotem referatów symposiumalnych. Zagadnienie uszkodzeń makromolekuł, przede wszystkim DNA było tematem referatu prof. dr hab. R. Olińskiego (Akademia Medyczna w Bydgoszczy). Referat J.T. Kuśmierka i M.M. Mroczkowskiej (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa) poświęcony był zmianom właściwości kodujących produktów reakcji zasad z chlorkiem winylu. Charakterystykę wiązania policyklicznych pierścieniowych węglowodorów

aromatycznych, przede wszystkim benzo(a)pirenu, z DNA przedstawiła dr W. Baer-Dubowska (Akademia Medyczna w Poznaniu). Referat R. P. P. Fuchsa (Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire, CNRS, Strasbourg) poświęcony był molekularnym mechanizmom mutagenyzy wywołanej przez inny klasyczny kancerogen-acetyloaminofluoren. Dr M. Z. Zdzenicka (Uniwersytet w Leiden) omówiła znaczenie biologiczne różnych typów uszkodzeń powstających w DNA komórki eukariotycznej pod wpływem naświetlania promieniowaniem ultrafioletowym, a prof. dr M. Gniazdowski (Akademia Medyczna w Łodzi) przedstawił aktualne dane dotyczące wpływu różnych typów adduktów na poszczególne etapy syntezy RNA. Podczas sympozjum przedstawiono także dziewięć komunikatów, głównie w formie posterów.

W ramach Sympozjum IV-go na temat „Wpływ mutagenów środowiskowych na genom” zorganizowanego przez prof. dr hab. Zofię Walter z Katedry Genetyki Molekularnej UŁ odbyły się dwie sesje referatowe, na których zostało wygłoszonych 10 referatów, w tym 3 referaty gości zagranicznych: „Kinetic aspects of interaction of platinum compounds with nucleic acids” — V. Kleinwachter (Brno, Czechosłowacja), „Effect of C-6 compounds upon the biosynthesis of SNA, RNA and albumin and the influence of grippe virus upon them” — P. Petkov (Sofia, Bułgaria), „Transcribed and nontranscribed sequences of C-MYC” — L. Diondjurov (Sofia, Bułgaria).

W sesji plakatowej Sympozjum IV-go w dniu 17.09. przedstawiono 22 prace. Wszystkie prace prezentowane na tym Sympozjum dotyczyły wpływu różnego typu mutagenów środowiskowych, zarówno chemicznych jak i promieniowania jonizującego, głównie na genom eukariotów.

Na Sympozjum nr V nt. „Metabolizm i funkcja peptydów biologicznie czynnych” organizowane przez prof. dr hab. Lillę Lachowicz z Instytutu Fizjologii i Biochemii AM w Łodzi, składało się siedemnaście 10-cio minutowych komunikatów oraz 3 referaty sympozjalne, o których wygłoszenie zostali poproszeni: dr J-M Matter z Uniwersytetu w Genewie — „Identification of cis-acting regulatory elements that control neuronal nACHR gene expression during morphogenesis of the CNS”, prof. W. Z. Traczyk z Instytutu Fizjologii i Biochemii AM w Łodzi: — „Mikroperfuzja i mikroanaliza jako metody badania roli przekaźników chemicznych i ich metabolitów w strukturach mózgowych” oraz doc. J. Z. Nowak z Zakładu Amin Biogennych PAN w Łodzi — „Regulacja biosyntezy melatoniny w siatkówce kręgowców”.

W sympozjum dominowała tematyka dotycząca struktury, syntezy i działania różnych peptydów biologicznie czynnych na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, degradacji oraz otrzymywania specyficznych przeciwciał antypeptydowych.

Należy podkreślić ciekawe omówienie interesujących metod w badaniach roli przekaźników chemicznych, co zwróciło uwagę osób zajmujących się zagadnieniem peptydów biologicznie czynnych, stwarzając możliwość zastosowania tych metod w ocenie działania peptydów.

Dużą grupę prac (łącznie 6 referatów) stanowiły zagadnienia związane z peptydami w ośrodkowym układzie nerwowym, co podkreśla szczególną rolę tych związków w regulacji procesów neuronalnych, a co jest niewątpliwie jednym z kluczowych zagadnień badawczych na świecie. Inne referaty omawiały działanie peptydów na różne układy enzymatyczne bądź metabolizm płytek, limfocytów kory nadnercza czy osocza. Wszystkie referaty przedstawione były w sposób nowoczesny i ciekawy, wywołując ożywioną dyskusję.

W trakcie dwudniowych obrad Sympozjum VI — „Biotechnologia”, którego organizatorem był prof. dr hab. Edward Galas z Instytutu Biochemii Technicznej PŁ wygłoszono 5 referatów. Prof. S. D. Warfołomiejew z Uniwersytetu Moskiewskiego przedstawił główne kierunki biosyntezy rozmaitych substancji za pomocą immobilizowanych komórek mikrobiologicznych. Duże zainteresowanie zebranych wywołały nowe informacje dotyczące biosyntezy aminokwasu L-lizyny przez immobilizowane komórki *Brevibacterium*, a także część wykładu omawiająca krioimmobilizację drobnoustrojów. Prof. A. Polanowski z Uniwersytetu Wrocławskiego w bardzo ciekawym wykładzie zaprezentował najnowsze osiągnięcia dotyczące struktury, funkcji oraz możliwości aplikacji w biotechnologii i medycynie niektórych proteinaz aspartyowych. Prof. dr hab. T. Twardowski z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, w znakomitym wystąpieniu przedstawił stan stosunków prawnych w kraju, w odniesieniu do możliwości ochrony patentowej wyników prac biotechnologicznych i poczynił liczne porównania z sytuacją w innych krajach. W ramach sympozjum dyskutowano również zagadnienia mikrobiologicznych metod oczyszczania powietrza i wód odpadowych (ścieki). Pierwszy z problemów omówił prof. A. M. Bezborodov wykazując na podstawie badań własnych, że immobilizowane formy pewnych bakterii posiadają zdolność niemal całkowitego rozkładu wielu lotnych substancji chemicznych, zatrujących powietrze w zakładach chemicznych i ich otoczeniu. Prof. Chmielowski w bardzo interesującym wykładzie omówił możliwości drobnoustrojowej, beztlenowej biodegradacji wielu trucizn obecnych w rozmaitych odpadach, zwłaszcza wodach koksowniczych.

Na dwu sesjach plakatowych sympozjum VI zaprezentowano 71 doniesień. Pierwsza sesja plakatowa „Biotechnologia mikrobiologiczna” obejmowała 37 doniesień, poświęconych głównie biosyntezie i charakterystyce enzymów ważnych dla gospodarki, biokatalizie w środowisku niewodnym, immobilizowanym formom enzymów oraz biosyntezie niektórych naturalnych polimerów (celuloza mikrobiologiczna, pululan,

polihydroksymaślan). W drugiej sesji „Biotechnologia środowiskowa i rolno-spożywcza” przedstawiono 24 doniesienia. Obie sesje plakatowe zostały zakończone wspólnymi dyskusjami.

W ramach Sympozjum VII-go, organizowanego przez prof. dr hab. Ryszarda Wierzbickiego z Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy AM w Łodzi, wydzielono trzy niżej wymienione sesje tematyczne, na których przedstawiono komunikaty naukowe zarówno w formie doniesień ustnych jak i plakatowych:

1. Patobiochemia — 8 doniesień ustnych, 37 plakatów — przewodniczący: prof. Edward Bańkowski
2. Enzymy, inhibitory — 8 doniesień ustnych, 29 plakatów — przewodniczący: prof. Janusz Greger
3. Błony biologiczne, biochemia farmakologiczna i toksykologiczna — 8 doniesień ustnych, 34 plakaty — przewodniczący: prof. Halina Karoń. Pozostałe komunikaty (35) przedstawiono w formie doniesień plakatowych w sesji: Inne.

Wśród zgłoszonych doniesień stosunkowo dużo dotyczyło biochemii patologicznej. Sesja poświęcona tej tematyce była najbardziej zwarta i cieszyła się znacznym zainteresowaniem. Być może na kolejnych zjazdach PTBioch należy systematycznie organizować sympozja z zakresu patobiochemii. Może należałoby rozważyć celowość utworzenia w ramach Towarzystwa odrębnej sekcji: patobiochemia.

W trakcie obrad Zjazdu odbyły się dwie cieszące się ogromnym zainteresowaniem dyskusje. Pierwsza z nich dotyczyła „Nauczania Biochemii i Biotechnologii w różnych typach szkół wyższych”, tematem drugiej była „Biotechnologia — teoria i praktyka”.

Referat wprowadzający do pierwszej z wymienionych dyskusji wygłosiła organizatorka spotkania — prof. dr hab. Zofia Walter — przedstawiając w swym wystąpieniu podstawowe problemy nauczania biochemii w szkołach wyższych sugerując tematy do dyskusji. Następnie prof. dr hab. Zdzisław Żak z Instytutu Biologii Molekularnej UJ zaprezentował nowy program studiów biologii molekularnej realizowany na Uniwersytecie Jagiellońskim. Zadanie stojące przed Polskim Towarzystwem Biochemicznym w zakresie nauczania biochemii określiła prof. dr hab. Zofia Poremska wskazując na potrzebę organizowania konkursów, wykładów, wydawnictw dydaktycznych oraz pomocy naukowych. W ożywionej dyskusji wzięło udział kilkunastu wybitnych wykładowców biochemii i biotechnologii.

Równie dużym zainteresowaniem cieszyła się dyskusja „Biotechnologia — teoria i praktyka”, zapoczątkowana krótkim wprowadzeniem dr hab. Stanisława Bieleckiego z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej — organizatora spotkania, które zgromadziło zarówno pracowników uczelni i instytutów badawczych jak i przedstawicieli przemysłu i agencji samorządowych. Dr David Bennett z Cambridge Biomedical Consultant (konsultant EWG) przedstawił stan biotechnologii i kierunki jej rozwoju w Europie, podkreślając konieczność podjęcia wysiłków w różnych obszarach biotechnologii, w kształceniu odpowiednich kadr zarówno do celów produkcyjnych, jak i zarządzania firmami czy badaniami biotechnologicznymi w celu sprostania konkurencji jaką stanowią USA i Japonia. Omówił programy jakie EWG kontynuuje lub uruchamia w celu rozwoju biotechnologii. Wykazał konieczność właściwej prezentacji biotechnologii społeczeństwu i politykom w celu podejmowania przez nich właściwych decyzji. Za niezbędne uznał stworzenie odpowiednich regulacji prawnych w biotechnologii. Zagadnienie to poruszył również prof. dr hab. Tomasz Twardowski omawiając stan regulacji prawnych w dziedzinie biotechnologii w Polsce (raczej ich brak), przedstawił naukowe i racjonalne argumenty w formułowaniu prawa jak i zasady regulacji i ich poziomów. Wskazał na prawo do ryzyka w podejmowaniu badań. Niektóre aspekty biotechnologii w Polsce przedstawił prof. dr hab. Leon Sedlaczek z Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi, stwierdzając, że sytuacja w badaniach nie jest zła, natomiast są duże trudności z praktycznym wykorzystaniem osiągnięć badawczych. Dr K. Dzięgielewski, z-ca dyrektora d/s rozwoju Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa” przedstawił swój zakład oferując zarówno możliwość wykorzystania nowoczesnych urządzeń przez polskich naukowców (szczególnie do downstream processing), jak i gotowość zakładu do wspólnego kształcenia odpowiednich kadr dla biotechnologii. O konieczności współpracy, w zakresie kształcenia kadr dla biotechnologii, pomiędzy przemysłem i uniwersytetami mówiła również Dr Patricia Osseweijer z Kluyver Laboratory of Biotechnology, Uniwersytetu Technicznego w Delft, przedstawiając dwuletnie programy kształcenia podyplomowego. Problem ten poruszyła między innymi również prof. J. Jakubowska z Politechniki Łódzkiej, uważając, że kontakt ludzi z przemysłu z naukowcami musi być w Polsce znacznie intensywniejszy. Przedstawiciel Łódzkiej Agencji Rozwoju Regionalnego stwierdził, że biotechnologia jest jedną z priorytetowych dziedzin dla jego Agencji i oferował pomoc w tworzeniu małych przedsiębiorstw, wykorzystujących osiągnięcia polskich badaczy.

Obrady toczące się w ramach wszystkich sympozjów i dyskusji cieszyły się dużym zainteresowaniem zarówno ze strony uczestników Zjazdu jak i łódzkiego środowiska naukowego, w którym problematyka biochemiczna i biotechnologiczna realizowana jest w Uczelniach Łódzkich (UŁ, PŁ, AM, WAM) i kilku innych instytutach o charakterze badawczym (CBMiM PAN, CMiW PAN, IWCh).

Niekiedy, mimo obszernych sal, nie starczało miejsc dla wszystkich słuchaczy. Stosunkowo mniejszym zainteresowaniem cieszyły się sesje plakatowe. Większość plakatów została przygotowana bardzo starannie,

kilkanaście jednak oceniono negatywnie zarówno pod kątem formy jak i treści.

W przeprowadzonym podczas Zjazdu Konkursie o Nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego młodzi biochemicy, kandydaci do nagrody prezentowali swoje prace na wydzielonej sesji w formie referatowej. Przedstawiono 4 doniesienia. Przewodniczącym sześciuosobowej komisji konkursowej był prof. dr hab. Ryszard Wierzbicki. Komisja zaproponowała Nagrodę im. W. Mozołowskiego dla Urszuli Wojdy z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie za pracę pt. „Właściwości i występowanie kalcykliny — potencjalnego markera niektórych chorób” oraz wyróżniła pracę Małgorzaty Giel pt. „Właściwości rybonukleazowe syntetycznego polipeptydu o sekwencji odpowiadającej palcowi cynkowemu z czujnika transkrypcyjnego IIIA z *Xenopus laevis*.”

Obradom Zjazdu towarzyszyła wystawa sprzętu laboratoryjnego, aparatury i odczynników. Swoje wyroby prezentowało 20 firm. Firma Biotest przygotowała interesujący pokaz oferowanych przez siebie urządzeń do elektroforezy. Kilka firm skorzystało z naszej oferty dotyczącej umieszczenia reklam w Materiałach Zjazdowych.

Obok bogatego programu naukowego Zjazdu, organizatorzy starali się przygotować atrakcyjne propozycje imprez towarzyszących, z których skorzystała część uczestników Zjazdu. Uczestników Zjazdu zaproszono na wycieczkę do Łodzi, zaproponowano spektakl w Teatrze Wielkim oraz udział w spotkaniu towarzyskim. Prezydent miasta Pan mgr inż. Grzegorz Palka zaprosił samodzielnych pracowników nauki, uczestniczących w Zjeździe na koktajl wydany w Urzędzie Miasta.

Komitet Organizacyjny XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pragnie w tym miejscu podziękować za zrozumienie potrzeb i finansowe wsparcie Zjazdu następującym Firmom i Instytucjom: Łódzkim Zakładom Spirytusowym „Polmos”, Zakładom Piwowarskim „Browary Łódzkie”. Zakładom „Polfa” w Łodzi, Politechnice Łódzkiej, Uniwersytetowi Łódzkiemu, Urzędowi Miasta Łodzi, Urzędowi Wojewódzkiemu w Łodzi oraz Stowarzyszeniu „Wspólnota Polska”.

Za Komitet Organizacyjny
S. Bielecki.

Protokół z XIV Zwyczajnego Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — Łódź, dnia 18.09.1992 r.

Porządek Dzienny

1. Otwarcie Walnego Zebrania,
2. Wybór Przewodniczącego i Sekretarza Walnego Zebrania,
3. Powołanie Komisji Matki, Komisji Skrutacyjnej i Komisji Wniosków,
4. Przyjęcie protokołu z poprzedniego, XIII Walnego Zebrania,
5. Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego w XIII kadencji 1990-92 r,
6. Sprawozdanie Komisji Rewizyjnej,
7. Wniosek o udzielenie absolutorium dla ustępującego Zarządu,
8. Wybory nowych Władz Towarzystwa,
9. Nadanie godności Członków Honorowych Towarzystwa:
prof. dr hab. Janinie Kwiatkowskiej
prof. dr hab. Mariuszowi Żydowo
prof. dr hab. Tomaszowi Borkowskiemu
10. Propozycje na temat przyszłej działalności Towarzystwa,
11. Wolne wnioski.

Zebranie rozpoczęło się w drugim terminie o godz. 14,45 po zakończeniu obrad XVIII Zjazdu PTBioch. Zebranie protokółowały: dr Ewa Ciesielska, mgr Krystyna Wiatr.

ad 1.2. Zebranie otworzyła Prezes Towarzystwa prof. Zofia Porembska proponując na przewodniczącego zebrania prof. J. Gregera. Po przyjęciu kandydatury przez aklamację, przewodniczący zebrania powołał dr Leszka Szmigiero na sekretarza zebrania.

ad 3. Prof. J. Greger zaproponował powołanie:

- a) Komisji Matki w skład, której weszli: prof. Janina Kwiatkowska i prof. Wiesław Makarewicz;
- b) Komisji Skrutacyjnej, w skład której weszli: doc. Jacek Kuźnicki jako przewodniczący oraz prof. Maria Jeżewska, mgr Ewa Malinowska, dr Tadeusz Antczak oraz dr Piotr Palusz-

polihydroksymaślan). W drugiej sesji „Biotechnologia środowiskowa i rolno-spożywcza” przedstawiono 24 doniesienia. Obie sesje plakatowe zostały zakończone wspólnymi dyskusjami.

W ramach Sympozjum VII-go, organizowanego przez prof. dr hab. Ryszarda Wierzbickiego z Instytutu Badania Środowiska i Bioanalizy AM w Łodzi, wydzielono trzy niżej wymienione sesje tematyczne, na których przedstawiono komunikaty naukowe zarówno w formie doniesień ustnych jak i plakatowych:

1. Patobiochemia — 8 doniesień ustnych, 37 plakatów — przewodniczący: prof. Edward Bańkowski
2. Enzymy, inhibitory — 8 doniesień ustnych, 29 plakatów — przewodniczący: prof. Janusz Greger
3. Błony biologiczne, biochemia farmakologiczna i toksykologiczna — 8 doniesień ustnych, 34 plakaty — przewodniczący: prof. Halina Karoń. Pozostałe komunikaty (35) przedstawiono w formie doniesień plakatowych w sesji: Inne.

Wśród zgłoszonych doniesień stosunkowo dużo dotyczyło biochemii patologicznej. Sesja poświęcona tej tematyce była najbardziej zwarta i cieszyła się znacznym zainteresowaniem. Być może na kolejnych zjazdach PTBioch należy systematycznie organizować sympozja z zakresu patobiochemii. Może należałoby rozważyć celowość utworzenia w ramach Towarzystwa odrębnej sekcji: patobiochemia.

W trakcie obrad Zjazdu odbyły się dwie cieszące się ogromnym zainteresowaniem dyskusje. Pierwsza z nich dotyczyła „Nauczania Biochemii i Biotechnologii w różnych typach szkół wyższych”, tematem drugiej była „Biotechnologia — teoria i praktyka”.

Referat wprowadzający do pierwszej z wymienionych dyskusji wygłosiła organizatorka spotkania — prof. dr hab. Zofia Walter — przedstawiając w swym wystąpieniu podstawowe problemy nauczania biochemii w szkołach wyższych sugerując tematy do dyskusji. Następnie prof. dr hab. Zdzisław Żak z Instytutu Biologii Molekularnej UJ zaprezentował nowy program studiów biologii molekularnej realizowany na Uniwersytecie Jagiellońskim. Zadanie stojące przed Polskim Towarzystwem Biochemicznym w zakresie nauczania biochemii określiła prof. dr hab. Zofia Poremska wskazując na potrzebę organizowania konkursów, wykładów, wydawnictw dydaktycznych oraz pomocy naukowych. W ożywionej dyskusji wzięło udział kilkunastu wybitnych wykładowców biochemii i biotechnologii.

Równie dużym zainteresowaniem cieszyła się dyskusja „Biotechnologia — teoria i praktyka”, zapoczątkowana krótkim wprowadzeniem dr hab. Stanisława Bieleckiego z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej — organizatora spotkania, które zgromadziło zarówno pracowników uczelni i instytutów badawczych jak i przedstawicieli przemysłu i agencji samorządowych. Dr David Bennett z Cambridge Biomedical Consultant (konsultant EWG) przedstawił stan biotechnologii i kierunki jej rozwoju w Europie, podkreślając konieczność podjęcia wysiłków w różnych obszarach biotechnologii, w kształceniu odpowiednich kadr zarówno do celów produkcyjnych, jak i zarządzania firmami czy badaniami biotechnologicznymi w celu sprostania konkurencji jaką stanowią USA i Japonia. Omówił programy jakie EWG kontynuuje lub uruchamia w celu rozwoju biotechnologii. Wykazał konieczność właściwej prezentacji biotechnologii społeczeństwu i politykom w celu podejmowania przez nich właściwych decyzji. Za niezbędne uznał stworzenie odpowiednich regulacji prawnych w biotechnologii. Zagadnienie to poruszył również prof. dr hab. Tomasz Twardowski omawiając stan regulacji prawnych w dziedzinie biotechnologii w Polsce (raczej ich brak), przedstawił naukowe i racjonalne argumenty w formułowaniu prawa jak i zasady regulacji i ich poziomów. Wskazał na prawo do ryzyka w podejmowaniu badań. Niektóre aspekty biotechnologii w Polsce przedstawił prof. dr hab. Leon Sedlaczek z Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN w Łodzi, stwierdzając, że sytuacja w badaniach nie jest zła, natomiast są duże trudności z praktycznym wykorzystaniem osiągnięć badawczych. Dr K. Dziegielewski, z-ca dyrektora d/s rozwoju Tarchomińskich Zakładów Farmaceutycznych „Polfa” przedstawił swój zakład oferując zarówno możliwość wykorzystania nowoczesnych urządzeń przez polskich naukowców (szczególnie do downstream processing), jak i gotowość zakładu do wspólnego kształcenia odpowiednich kadr dla biotechnologii. O konieczności współpracy, w zakresie kształcenia kadr dla biotechnologii, pomiędzy przemysłem i uniwersytetami mówiła również Dr Patricia Osseweijer z Kluiver Laboratory of Biotechnology, Uniwersytetu Technicznego w Delft, przedstawiając dwuletnie programy kształcenia podyplomowego. Problem ten poruszyła między innymi również prof. J. Jakubowska z Politechniki Łódzkiej, uważając, że kontakt ludzi z przemysłu z naukowcami musi być w Polsce znacznie intensywniejszy. Przedstawiciel Łódzkiej Agencji Rozwoju Regionalnego stwierdził, że biotechnologia jest jedną z priorytetowych dziedzin dla jego Agencji i oferował pomoc w tworzeniu małych przedsiębiorstw, wykorzystujących osiągnięcia polskich badaczy.

Obrady toczące się w ramach wszystkich sympozjów i dyskusji cieszyły się dużym zainteresowaniem zarówno ze strony uczestników Zjazdu jak i łódzkiego środowiska naukowego, w którym problematyka biochemiczna i biotechnologiczna realizowana jest w Uczelniach Łódzkich (UŁ, PŁ, AM, WAM) i kilku innych instytutach o charakterze badawczym (CBMiM PAN, CMiW PAN, IWCh).

Niekiedy, mimo obszernych sal, nie starczało miejsc dla wszystkich słuchaczy. Stosunkowo mniejszym zainteresowaniem cieszyły się sesje plakatowe. Większość plakatów została przygotowana bardzo starannie,

kilkanaście jednak oceniono negatywnie zarówno pod kątem formy jak i treści.

W przeprowadzonym podczas Zjazdu Konkursie o Nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego młodzi biochemicy, kandydaci do nagrody prezentowali swoje prace na wydzielonej sesji w formie referatowej. Przedstawiono 4 doniesienia. Przewodniczącym sześciuosobowej komisji konkursowej był prof. dr hab. Ryszard Wierzbicki. Komisja zaproponowała Nagrodę im. W. Mozołowskiego dla Urszuli Wojdy z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego w Warszawie za pracę pt. „Właściwości i występowanie kalcykliny — potencjalnego markera niektórych chorób” oraz wyróżniła pracę Małgorzaty Giel pt. „Właściwości rybonukleazowe syntetycznego polipeptydu o sekwencji odpowiadającej palcowi cynkowemu z czujnika transkrypcyjnego IIIA z *Xenopus laevis*.”

Obradom Zjazdu towarzyszyła wystawa sprzętu laboratoryjnego, aparatury i odczynników. Swoje wyroby prezentowało 20 firm. Firma Biotest przygotowała interesujący pokaz oferowanych przez siebie urządzeń do elektroforezy. Kilka firm skorzystało z naszej oferty dotyczącej umieszczenia reklam w Materiałach Zjazdowych.

Obok bogatego programu naukowego Zjazdu, organizatorzy starali się przygotować atrakcyjne propozycje imprez towarzyszących, z których skorzystała część uczestników Zjazdu. Uczestników Zjazdu zaproszono na wycieczkę do Łodzi, zaproponowano spektakl w Teatrze Wielkim oraz udział w spotkaniu towarzyskim. Prezydent miasta Pan mgr inż. Grzegorz Palka zaprosił samodzielnych pracowników nauki, uczestniczących w Zjeździe na koktajl wydany w Urzędzie Miasta.

Komitet Organizacyjny XXVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego pragnie w tym miejscu podziękować za zrozumienie potrzeb i finansowe wsparcie Zjazdu następującym Firmom i Instytucjom: Łódzkim Zakładom Spirytusowym „Polmos”, Zakładom Piwowskim „Browary Łódzkie”. Zakładom „Polfa” w Łodzi, Politechnice Łódzkiej, Uniwersytetowi Łódzkiemu, Urzędowi Miasta Łodzi, Urzędowi Województwa w Łodzi oraz Stowarzyszeniu „Wspólnota Polska”.

Za Komitet Organizacyjny
S. Bielecki.

Protokół z XIV Zwyczajnego Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — Łódź, dnia 18.09.1992 r.

Porządek Dzienny

1. Otwarcie Walnego Zebrania,
2. Wybór Przewodniczącego i Sekretarza Walnego Zebrania,
3. Powołanie Komisji Matki, Komisji Skrutacyjnej i Komisji Wniosków,
4. Przyjęcie protokołu z poprzedniego, XIII Walnego Zebrania,
5. Sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego w XIII kadencji 1990-92 r,
6. Sprawozdanie Komisji Rewizyjnej,
7. Wniosek o udzielenie absolutorium dla ustępującego Zarządu,
8. Wybory nowych Władz Towarzystwa,
9. Nadanie godności Członków Honorowych Towarzystwa:
prof. dr hab. Janinie Kwiatkowskiej
prof. dr hab. Mariuszowi Żydowo
prof. dr hab. Tomaszowi Borkowskiemu
10. Propozycje na temat przyszłej działalności Towarzystwa,
11. Wolne wnioski.

Zebranie rozpoczęło się w drugim terminie o godz. 14,45 po zakończeniu obrad XVIII Zjazdu PTBioch. Zebranie protokółowały: dr Ewa Ciesielska, mgr Krystyna Wiatr.

ad 1.2. Zebranie otworzyła Prezes Towarzystwa prof. Zofia Porembaska proponując na przewodniczącego zebrania prof. J. Gregera. Po przyjęciu kandydatury przez aklamację, przewodniczący zebrania powołał dr Leszka Szmigiera na sekretarza zebrania.

ad 3. Prof. J. Greger zaproponował powołanie:

- a) Komisji Matki w skład, której weszli: prof. Janina Kwiatkowska i prof. Wiesław Makarewicz;
- b) Komisji Skrutacyjnej, w skład której weszli: doc. Jacek Kuźnicki jako przewodniczący oraz prof. Maria Jeżewska, mgr Ewa Malinowska, dr Tadeusz Antczak oraz dr Piotr Palusz-

kiewicz jako członkowie. Na wniosek przewodniczącego, zebrani wyrazili pogląd, iż nie należy powoływać Komisji Wniosków.

4. Protokół z poprzedniego XIII Walnego Zebrania Towarzystwa, odczytał dr L. Szmigieryo. Do protokołu uwag nie wniesiono.

ad. 5. Prof. Z. Porembska przedstawiła sprawozdanie działalności Zarządu Głównego XIII kadencji, obejmującej lata 1990-92.

ad. 6, 7. Prof. Bogdan Sieliwanowicz odczytał następnie sprawozdanie Komisji Rewizyjnej. Komisja podkreśliła w nim znaczącą i różnorodną statutową działalność Zarządu Głównego XIII kadencji. Wniosek Komisji o udzielenie absolutorium ustępującemu Zarządowi zebrani przyjęli przez aklamację.

ad. 8. W tajnym głosowaniu do Zarządu Głównego PTBioch na XIV kadencję zostali wybrani:

1. Prezes PTBioch — prof. Liliana Konarska — Warszawa
2. Wiceprezes PTBioch — prof. Zofia Porembska — Warszawa
3. dr Maria Kołaczowska — Wrocław
4. doc. Jolanta Barańska — Warszawa
5. doc. Maria Wojtaś-Wasilewska — Lublin
6. doc. Maria Stryjecka-Zimmer — Lublin
7. prof. Andrzej Guranowski — Poznań
8. dr Teresa Wesołowska — Szczecin
9. prof. Edward Bańkowski — Białystok
10. dr Ewa Turska — Łódź
11. doc. Marianna Turkiewicz — Łódź
12. prof. Antoni Polanowski — Wrocław
13. doc. Tomasz Twardowski — Poznań
14. dr Michał Komoszyński — Toruń
15. prof. Krzysztof Zwierz — Białystok
16. prof. Roman Tarnowski — Katowice

Do komisji Rewizyjnej wybrano:

1. doc. Anna Barańczyk - Kuźma — Warszawa
2. prof. Magdalena Fikus — Warszawa
3. doc. Marian Wolny — Wrocław

ad. 9. W uznaniu zasług dla rozwoju Biochemii Polskiej, Prezes Towarzystwa prof. Z. Porembska zgłosiła kandydaturę prof. Janiny Kwiatkowskiej, prof. Mariusza Żydowo oraz prof. Tomasza Borkowskiego na Członków Honorowych Towarzystwa. Kandydatury te, omówione następnie szczegółowo przez prof. Tadeusza Wilusza uzupełnił w przypadku prof. T. Borkowskiego prof. Kazimierz Zakrzewski. W tajnym głosowaniu wszyscy zgłoszeni kandydaci zostali wybrani

ad. 10. Na temat przyszłej działalności Towarzystwa zabrała głos dr Teresa Wesołowska, proponując przesunięcie terminu opłacania składek na styczeń następnego roku kalendarzowego, na który zebrani wyrazili zgodę. Prof. Marek Gniazdowski mówił o kłopotach związanych z docieraniem informacji o zjazdach i sympozjach zarówno krajowych jak i zagranicznych do członków Towarzystwa i apelował o zaproszenie na imprezy organizowane przez PTBioch Polaków zamieszkujących jeszcze tereny byłego ZSRR. Zebrani uznali zasadność takich kroków. Prof. W. Makarewicz przedstawił argumenty na rzecz kontynuowania działalności gospodarczej Towarzystwa przynoszącej dochody oraz wystąpił z propozycją założenia Fundacji Rozwoju Biochemii działającej przy PTBioch. Inicjatywę tą na równi z zebranymi poparł prof. M. Gniazdowski, wskazując na możliwość uzyskania pomocy z programu Tempus. Doc. Barbara Fastuszenko z Grodna (Białoruś) wyraziła Zjazdowi podziękowanie za zaproszenie na Zjazd oraz za zeszyty Postępów Biochemii, które polscy biochemicy działający na Białorusi otrzymują z kraju. Doc. B. Fastuszenko zaproponowała zorganizowanie w bliskiej przyszłości wspólnego polsko-białoruskiego sympozjum w Grodnie. Zebrani ze zrozumieniem i przychylnością przyjęli propozycję. Prof. J. Kwiatkowska wyraziła pogląd, że terminem Walnego Zebrania Towarzystwa winien być w przyszłości początkowy a nie ostatni dzień zjazdu, ponieważ znacznie zmniejsza to liczbę uczestniczących w obradach. Na temat zmian regulaminu konkursu im. Prof. Włodzimierza Mozłowskiego wypowiedzieli się prof. W. Makarewicz oraz prof. M. Fikus. Istota tych zmian winna według dyskutantów sprowadzać się do zwiększenia atrakcyjności i motywacji biochemików do uczestnictwa w konkursie, co spowoduje większą niż na obecnym zjeździe liczbę zgłoszeń. Inicjatywę tę poparł prof. M. Żydowo przypominając zarazem historię regulaminu konkursu. Doc. A. Barańczyk - Kuźma wystąpiła z propozycją opiniowania zgłoszonych na zjazdy PTBioch komunikatów, a także weryfikowania zgłaszanych doniesień w formie plakatowej. Nawiązując do

wypowiedzi powyższej prof. M. G n i a z d o w s k i wyraził pogląd, że materiały zjazdowe stanowią druk do użytku wewnętrznego, zaś za merytoryczną wartość zarówno streszczeń jak i plakatów odpowiadają ich autorzy. Z poglądem prof. M. G n i a z d o w s k i e g o utożsamiała się większość zebranych. Na zakończenie dyskusji głos zabrała prof. Liliana Konarska dziękując wyborcom za zaufanie a prof. M. Ż y d o w o w imieniu nowo wybranych Honorowych Członków Towarzystwa podziękował za zaszczytne wyróżnienie.

ad. 11. Wolnych wniosków zebrani nie zgłosili. Zamykając o godz. 17.30 XIV Zwyczajne Walne Zebranie PTBioch. prof. J. G r e g e r podziękował uczestnikom za udział.

*Przewodniczący Zebrania
Janusz Greger*

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego XIV Kadencji

Wybrany przez walne Zebranie członków Towarzystwa w dniu 18 września 1992 roku Zarząd Główny ukonstytuował się w dniu 9 listopada 1992 roku następująco:

Prezydium

Prezes	prof. dr	Liliana	Konarska	Warszawa
Viceprezes	prof. dr	Zofia	Porembaska	Warszawa
Sekretarz	dr	Ewa	Turska	Łódź
Skarbnik	doc. dr	Jolanta	Barańska	Warszawa
Członkowie Prezydium	prof. dr	Edward	Bańkowski	Białystok
	prof. dr	Marta	Stryjecka-Zimmer	Lublin
	dr hab.	Marianna	Turkiewicz	Łódź
	doc. dr	Tomasz	Twardowski	Poznań

Członkowie

	prof. dr	Andrzej	Guranowski	Poznań
	dr	Krystyna	Kołaczkowska	Wrocław
	dr	Michał	Komoszyński	Toruń
	prof. dr	Antoni	Polanowski	Wrocław
	dr	Teresa	Wesołowska	Szczecin
	prof. dr	Maria	Wojtaś-Wasilewska	Lublin
	prof. dr	Roman	Tarnowski	Katowice
	prof. dr	Krzysztof	Zwierz	Białystok

Komisja

Rewizyjna

dr hab.	Anna	Barańczyk-Kuźma	Warszawa
prof. dr	Magdalena	Fikus	Warszawa
prof. dr	Marian	Wolny	Wrocław

Dyżury Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przy ul. Freta 16, IIp

Biuro Zarządu Głównego pełni dyżur w każdy wtorek w godzinach 13-16, w tym czasie są obecni również przedstawiciele Prezydium, tel. 31 13 04 (tylko we wtorki).

NAGRODY Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa

K. Adrych-Rożek, W. T. Markiewicz, K. L. Wierzchowski z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie za publikację: "Effect of DNA binding in various regions of consensus-like Escherichia coli promotor on its strength *in vivo* and structure of the open complex *in vitro*", *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 2947-2953

Nagroda im. Bolesława Skarżyńskiego

Jerzy Bal z Instytutu Matki i Dziecka, Zakład Genetyki w Warszawie, ul. Kasprzaka 17 za artykuł „Molekularne podłoże mukowiscydozy” uznany za najlepszy z zamieszczonych w 37 tomie Postępów Biochemii z r. 1991, str. 153-158

Nagroda im. Włodzimierza Mozołowskiego

Urszula Wojda z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie za pracę prezentowaną na XVIII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: „Właściwości i występowanie kalcykliny — potencjalnego markera niektórych chorób”

Małgorzata Giel z Instytutu Chemii Biologicznej PAN w Poznaniu, wyróżnienie, za pracę „Właściwości rybonukleazowe polipeptydów o sekwencji odpowiadającej palcowi cynkowemu z czynnika transkrypcyjnego IIIa z *Xenopus laevis*”

The Oxford Glycobiology Institute, Oxford GlycoSystems and Department of Pharmaceutical Biochemistry of Białystok University Medical School, will organize a practical and lecture course on Glycobiology, including advanced approaches to the release and analysis of oligosaccharides from glycoproteins, for 15-20 participants on 22-28 August, 1993.

For information please write to:

**Prof. Krzysztof Zwierz,
Department of Pharmaceutical Biochemistry,
Białystok University Medical School,
ul. Adama Mickiewicza 2,
15-230 Białystok, Poland,
Fax: 48 85 24 907.**

Deadline: 1 Marz, 1993.

Wskazówki dla autorów

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

Prace przeznaczone do publikacji w „Postęпах Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu 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 składowi obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeżeli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenie zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standardowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm

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

Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1993 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:
340 000 zł.

Prenumerata krajowa indywidualna:
160 000 zł, (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

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

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 wydawca. 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, rycin, 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 „góradół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spoistość artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

Pokwitowanie dla wpłacającego

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

Odcinek dla poczty lub banku

zł.....

słownie.....

wpłacający.....

imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym

na rachunek

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

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

podpis przyjmującego

Polskie Towarzystwo Biochemiczne ogłasza konkurs na najlepszy wykład akademicki

Regulamin nagrody

1. Intencją nagrody jest popularyzacja biochemii i biologii molekularnej oraz pozyskanie materiałów dydaktycznych.
2. Warunkiem wzięcia udziału w Konkursie jest przygotowanie wykładu na wybrany temat uwzględniający najnowsze osiągnięcia w tej dziedzinie oraz ilustrujących go materiałów w postaci maszynopisu, rysunków i kompletu przezroczy. Termin nadsyłania materiałów mija 30.04.1993 r.
3. Przewidziana jest Nagroda Główna w wysokości **3 milionów złotych** (w 1993 r.) oraz dwa wyróżnienia. Środki finansowe na Nagrodę zapewnia Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
4. Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zorganizuje sesję, na której zostaną wygłoszone konkursowe wykłady. Maksymalny czas wystąpienia 2 × 45 minut.
5. Członkowie Zarządu Głównego tworzą Komisję Konkursową. Oceniają oni prezentację, wartość merytoryczną i dydaktyczną wykładów przyznając od 0 do 10 punktów. Komisja obraduje niejawnie, a protokół z obrad i inne materiały pozostają w dokumentacji Towarzystwa. Nagrodę uzyska osoba, która otrzyma największą liczbę punktów. Nazwisko zwycięzcy Konkursu zostanie podane do wiadomości Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w „Postępach Biochemii” oraz w „Listach”.
6. Materiały konkursowe: maszynopis wykładu, rysunki, przezrocza i programy komputerowe stają się własnością Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i będą rozpowszechniane w placówkach naukowych i dydaktycznych jako wykłady autorskie nagrodzonych osób, rekomendowane przez Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Wymagana jest pisemna zgoda na przekazanie materiałów na własność Towarzystwa. Towarzystwo zastrzega sobie prawo do zakupu materiałów nienagrodzonych.
7. Niniejsza wersja regulaminu została uchwalona przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 5 listopada 1990 roku i wchodzi w życie z dniem uchwalenia.

W 1993 roku sesja odbędzie się na początku czerwca. Nagroda Główna i wyróżnienia zostaną przyznane w dniu Konkursu.

