

POSTĘPY BIOCHEMII

Advances in Biochemistry

TOM 42, NR 2, 1996

Cykliny fazy G1	99
Cykl komórkowy i apoptoza	108
Antyzym a degradacja dekarboksylazy ornitynowej	113
Współdziałanie AP-1 i NFAT	120
Metabolizm folianów w grzybach	129
Syntaza tymidylanowa a chemio- terapia	133
Fosfolipidy i sygnały	140
Oscylacje i fale wapniowe w komórce	146
Grupy -SH/-SS w komórce	154
Transport wody przez błony	161
Osmolity i osmoregulacja w komór- kach nerkowych	167
Homeostaza Mg^{2+} w komórkach	178
Generacja ruchu przez aktomiozynę	185
Regulacja skurczu mięśni	195
Kompleks dystrofiny z glikoproteinami	204
Kalcyklina	213
Nauczycielom pisanania	217
Do Czytelników	219

HONOROWE PROMOCJE

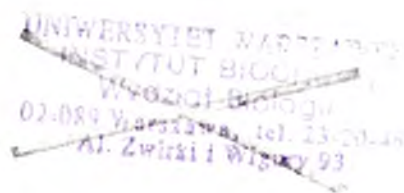
Z radością informujemy o uroczystościach nadania tytułu doktora Honoris Causa dwum zasłużonym członkom naszego Towarzystwa.

Profesor Jerzy Pawelkiewicz — twórca i kierownik pierwszej katedry biochemii w akademickiej uczelni rolniczej w kraju, profesor Akademii Rolniczej w Poznaniu, członek rzeczywisty PAN i członek grona założycieli Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — otrzymał doktorat honorowy swej macierzystej uczelni, a uroczysta promocja odbyła się dnia 20 października 1995 roku.

Profesor Mariusz Żydowo, biochemik, uczeń i następca profesora Włodzimierza Mozołowskiego — od 1945 roku już obecny w Akademii Lekarskiej w Gdańsku: jako student, absolwent z indeksem o numerze 1, lekarz i doktor medycyny dyplomowany summa cum laudae, docent habilitowany i profesor w Zakładzie Biochemii, inicjator budowy i projektodawca gmachu Biochemii, Zakładów Teoretycznych Akademii, pierwszy w kraju rektor uczelni akademickich z wyboru, zasłużony członek rzeczywisty i honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — otrzymał doktorat honorowy swej macierzystej uczelni dnia 7 grudnia 1995 roku.

W imieniu Zarządu Głównego Towarzystwa i Redakcji składam obydwu Honorowym Doktorom serdeczne Gratulacje i Życzenia.

Zofia Zielińska



Numer „Postępów Biochemii”, który oddajemy do rąk czytelników, opracowany został wyjątkowo bez udziału Redaktora Naczelnego, Pani Profesor Zofii Zielińskiej. Przyczyna jest prosta. Numer zawiera artykuły dedykowane Pani Profesor z okazji 80. rocznicy urodzin. My wszyscy, na co dzień współpracujący z Panią Profesor w redagowaniu i przygotowaniu do druku Postępów, pozwalamy sobie złożyć Jej w tym miejscu nasze serdeczne gratulacje. Pragniemy jednocześnie szczególnie podziękować Pani Profesor Barbarze Grzelakowskiej-Sztabert za wielki wkład w organizację i przygotowanie do druku niniejszego numeru.

Redakcja

W ubiegłym roku minęła 80-ta rocznica urodzin **Pani Profesor Zofii Zielińskiej** — pełniącej nieprzerwanie od 23 lat funkcję redaktora naczelnego kwartalnika „Postępy Biochemii”.

Rocznicę urodzin **Pani Profesor** obchodziliśmy uroczyście w dniu otwarcia XXXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie 6 września 1995 r. Po wieczornym koncercie muzyki dawnej w Galerii Carroll-Porczyńskich, w uroczystej scenerii, niezwykle serdecznej atmosferze i przy akompaniamencie oklasków kilkuset biochemików biorących udział w tej uroczystości, miałam zaszczyt wręczyć Pani Profesor bukiet róż (na zdjęciu) wraz z gratulacjami i najlepszymi życzeniami od nas wszystkich — kilku pokoleń biochemików — czytelników „Postępów Biochemii” jak również od tych, którzy pod wymagającym, ale życzliwym okiem Pani Profesor stawiali pierwsze kroki jako autorzy lub doskonalili swoje umiejętności korzystając z Jej wiedzy i doświadczenia.

Dziś, w ślad za kwiatami i życzeniami, mam przyjemność przekazać Pani Profesor i wszystkim Czytelnikom specjalny numer „Postępów Biochemii”, dedykowany Szanownej Jubilatce, zawierający artykuły napisane przez Jej uczniów i kolegów z Zakładów Biochemii Komórki i Biochemii Mięśni Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego. Niech będzie on trwalszym od kwiatów dowodem naszej wdzięczności, uznania i podziwu dla dokonań, aktywności i ujmującej osobowości Pani Profesor Zofii Zielińskiej.

Liliana Konarska
Prezes
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego



WYDAWCA

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

Drukarnia Naukowo-Techniczna
Mińska 65
03-828 Warszawa

REDAKCJA

Editorial Board
REDAKTOR NACZELNY
Editor in chief
ZOFIA ZIELIŃSKA
tel. 31-24-03
REDAKTORZY
Editors
GRAŻYNA PALAMARCZYK
tel. 658-47-02
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
tel. 659-70-72 w. 3234
ANNA SZAKIEL
tel. 23-20-46
JOLANTA GRZYBOWSKA
tel. 13-05-15
BARBARA ZARZYCKA
tel. 659-85-71 w. 332

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
EWA BARTNIK
(Warszawa)
GRZEGORZ BARTOSZ
(Łódź)
BARBARA GRZELAKOWSKA-
-SZTABERT
(Warszawa)
CELINA JANION
(Warszawa)
ANDRZEJ JERZMANOWSKI
(Warszawa)
ANNA KURLANDZKA
(Warszawa)
IRENA NIEBRÓJ-DOBOSZ
(Warszawa)
GRAŻYNA PALAMARCZYK
(Warszawa)
LESZEK PĄCZEK
(Warszawa)
STANISŁAW PRZESTALSKI
(Wrocław)
IRENA J. SZUMIEL
(Warszawa)
JERZY VETULANI
(Kraków)

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

- Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu**
Cyclins G1, their cellular functions and participation in oncogenesis
BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT 99
- Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki**
Cell cycle and apoptosis: death of senescent cell
EWA SIKORA 108
- Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitynowym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy?**
Is ornithine decarboxylase a unique non-ubiquitinated protein degraded by the 26 S proteasome?
MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA 113
- Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów**
Cross-talk between transcription factors AP-1 and NFAT in the regulation of gene expression
BOŻENA KAMIŃSKA, GRAŻYNA MOSIENIAK, MARTA WIŚNIEWSKA. 120
- Regulacja metabolizmu folianowego u grzybów: *Aspergillus nidulans* jako model badawczy**
Regulation of folate metabolism in fungi: *Aspergillus nidulans* as a experimental model
ANDRZEJ PASZEWSKI, MAŁGORZATA BALIŃSKA 129
- Inhibicja syntazy tymidylanowej w chemioterapii**
Thymidylate synthase inhibition in chemotherapy
WOJCIECH RODE 133
- Przekazywanie informacji w komórce. Fosfolipidy jako cząsteczki sygnałowe**
Signal transduction in the cell. Phospholipids as messenger molecules
JOLANTA BARAŃSKA, RAFAŁ CZAJKOWSKI, MAŁGORZATA CZARNY, PAWEŁ SABAŁA, MAGDALENA WIKTOREK 140
- Oscylacje i fale wapniowe w komórce**
Calcium oscillations and waves in a cell
AGNIESZKA MAKOWSKA, JERZY DUSZYŃSKI 146
- Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych**
Regulation of thiol group redox state in animal cells
EWA LENARTOWICZ, JOLANTA WUDARCZYK, GRAŻYNA DĘBSKA 154
- Transport wody przez błony biologiczne**
Transport of water through biological membranes
KATARZYNA A. NAŁĘCZ 161

Osmolity i osmoregulacja w komórkach nerek Osmolytes and osmoregulation in renal cells MARIUSZ R. WIĘCKOWSKI, KRZYSZTOF ZABŁOCKI	167
Homeostaza jonów magnezu w komórkach zwierzęcych Magnesium ions homeostasis in animal cells KRYSTYNA BOGUCA	178
Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu) przez ak- tomiozynę Molecular mechanism of force (motion) generation by actomyo- sin HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA	185
Molekularne mechanizmy zależnej od Ca²⁺ regulacji skur- czu różnych typów mięśni Molecular mechanism for the Ca ²⁺ -dependent regulation of various muscle types RENATA DĄBROWSKA	195
Kompleks dystrofiny z glikoproteinami błony komórko- wej w mięśniu szkieletowym Dystrophin-Glycoprotein complex of skeletal muscle sarcolemma ANNA JAKUBIEC-PUKA, URSZULA WIECZOREK	204
Kalcyklina — białko wiążące wapń z rodziny S-100 Calcyclin — calcium binding protein of the S-100 family ANNA FILIPEK, URSZULA WOJDA, WIESŁAWA LEŚNIAK, JACEK KUŹNICKI	213
Nauczycielom pisania JACEK KUŹNICKI	217
Do Czytelników ZOFIA ZIELIŃSKA	219

UWAGA

Zawiadamiamy o zmianie numeru konta prenumeraty **Postępów Biochemii**.
Nowy numer konta: PBK XIII O/Warszawa 370044-1225-2720-3-69

UNIWERSYTET WARSZAWSKI
 INSTYTUT BIOLOGII
 DOŚWIADCZALNEJ
 im. M. Nenckiego
 PASTEURA 3, 02-093
 WARSZAWA

Profesor Zofii Zielińskiej,
 mojej „od zawsze” Szefowej z najlepszymi życzeniami.

Cykliny fazy G1 cyklu komórkowego, ich funkcje i udział w nowotworzeniu

Cyclins G1, their cellular functions and participation in oncogenesis

BARBARA GRZELAKOWSKA-SZTABERT*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cykliny fazy G1
- III. Nadekspresja cyklin fazy G1 w komórkach nowotworowych
- IV. Transkrypcja genów kodujących cykliny D, białka cyklin
- V. Regulacja ekspresji genów cyklin D
 - V-1. Czynniki wzrostowe, hormony i czynniki antyproliferacyjne
 - V-2. Białka kodowane przez protoonkogeny
 - V-3. Białka kodowane przez geny supresorowe — Rb i p53
- VI. Inne czynniki regulujące wewnątrzkomórkowy poziom cykliny D1 i E
- VII. Czy cykliny D działają jako onkogeny?
- VIII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: PCNA — jądrowy antygen proliferujących komórek; kinazy cdk — kinazy cyklinozależne; kinazy MAP — kinazy aktywowane działaniem mitogenów; CSF-1 — czynnik stymulujący wzrost kolonii-1; EGF — czynnik wzrostu naskórka; bFGF — zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; IGF-1 — czynnik wzrostu insulinopodobny-1; PDGF — czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi; TGF- β — transformujący czynnik wzrostowy β ; pRb — białko supresorowe Rb; RCE — regulatorowe sekwencje DNA (*retinoblastoma controlling elements*) warunkujące odpowiedź na pRb; CRE — (*cAMP responsive elements*), regulatorowe sekwencje DNA warunkujące odpowiedź na cAMP; CRBP — (*cellular retinoblastoma binding proteins*), białka komórkowe wiążące pRb; D1 — cyklina D1; E2F, Sp1, ATF, MyoD, Elf-1, TF-X — czynniki transkrypcyjne; c-myc, c-fos, c-jun, c-ras — protoonkogeny.

Contents:

- I. Introduction
- II. G1 cyclins
- III. Overexpression of G1 cyclins in tumour cells
- IV. Transcription of genes coding cyclins D, cyclin proteins
- V. Regulation of expression of cyclin D genes
 - V-1. Growth factors, hormones and antiproliferative agents
 - V-2. Proteins coded by protooncogenes
 - V-3. Proteins coded by tumour suppressor genes — Rb and p53
- VI. Other factors influencing intracellular level of cyclins D1 and E
- VII. Do cyclins G1 act as oncogenes?
- VIII. Concluding remarks

I. Wstęp

W ostatnich latach poznano podstawowe mechanizmy kontrolujące przebieg cyklu komórkowego. Zidentyfikowano liczne cyklinozależne kinazy serynowo-treoninowe (kinazy cdk), oraz ich podjednostki regulatorowe — cykliny. Wykryto też endogenne białkowe inhibitory kinaz cdk warunkujące między innymi, działanie określonych kinaz w zdefiniowanych fazach cyklu oraz fosforylowanie przez nie specyficznych substratów [1-7]. Zagadnienia te przedstawiono już na łamach polskich czasopism [8-12], jednakże postęp badań jest na tyle szybki i istotny, że usprawiedliwia dalsze zajmowanie się tym tematem.

Poznane dotąd mechanizmy decydujące o aktywności kinaz cdk przedstawiono w tabeli 1, a przykłady białek komórkowych fosforylowanych przez kinazy cdk w różnych fazach cyklu komórkowego zebrano w tabeli 2. Podlegająca precyzyjnej regulacji aktyw-

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

Tabela 1.

Mechanizmy regulujące aktywność kinaz cdk.

Aktywacja	Hamowanie
Dolączenie cykliny	Degradacja cyklin
Defosforylacja Thr14 i Tyr15 przez fosfatazę cdc25	Fosforylacja Thr14 i Tyr15 przez kinazy weel/mik1
Fosforylacja Thr160 przez kinazę cdk7-cyklina H	Defosforylacja Thr160
Odlączenie jednego z endogennych białkowych inhibitorów	Utworzenie kompleksu z jednym z endogennych białkowych inhibitorów

ność kinaz cdk kontroluje stopień ufosforylowania białek pełniących bardzo różne i istotne funkcje komórkowe. Substratami kinaz cdk są bowiem białka zaangażowane w regulację transkrypcji genów, białka strukturalne, a także enzymy, zwłaszcza fosfatazy i kinazy aktywowane przez mitogeny.

Nie dziwi więc, że coraz więcej danych wskazuje na powiązania różnych regulatorów cyklu komórkowego z transformacją nowotworową komórek. Sądzi się wręcz, że zaburzenia kontroli cyklu komórkowego są kluczowe dla procesu nowotworzenia. Szczególnie istotną rolę w tym procesie przypisuje się zmianom efektywności działania kinaz cdk powodowanym przez brak lub upośledzenie syntezy ich endogennych białkowych inhibitorów [przeгляд. 11-13], a także zaburzeniach syntezy podjednostek regulatorowych kinaz cdk — cyklin, zwłaszcza tych, które występują

Tabela 2.

Przykłady białkowych substratów kinaz cdk, fosforylowanych w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (dane z [4, 6]).

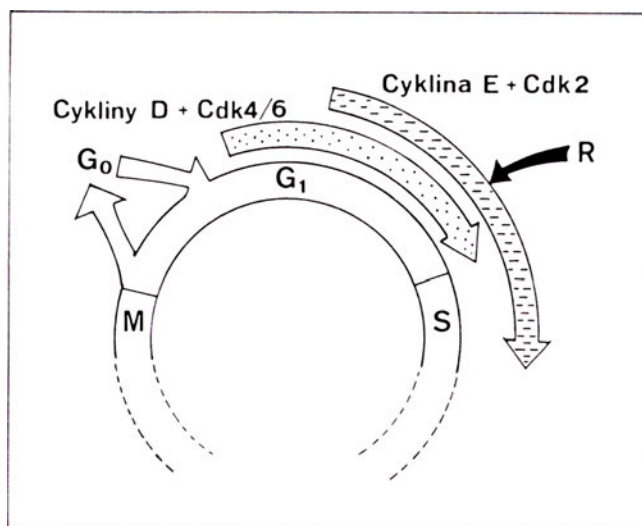
Faza cyklu	Substrat
G1	czynniki transkrypcyjne: E2F, Sic1, Far1, SWi5, MBF, PHO4 produkty genów supresorowych: p53, p105Rb, p107 enzymy: fosfataza cdc25A, polimeraza RNAII
S	czynniki transkrypcyjne: E2F-1, SWi5 białko wiążące się z pojedynczą nicią DNA: RPA duży antygen T wirusa SV40
G2	czynnik transkrypcyjny — SWi5 enzym — fosfataza cdc25c
M	białka cytoplazmatyczne i jądrowe: lekki łańcuch miozyny (MLC), kaldesmon, wimentyna, laminy, histon H1, nukleolina czynniki transkrypcyjne: TFIIIB, c-myc, EF-1 enzymy: fosfataza PP1, kinazy tyrozynowe c-ab1, c-src, kinazy MAP4/MAP1B białka pęcherzyków endocytarnych

w komórkach będących w fazie G1 cyklu [14-19]. Gen jednej z tych cyklin (cykliny D1), traktowany jest nawet jako protoonkogen [20, 21], a obecność podwyższonego poziomu cykliny E jako prognostyczny marker raka piersi [22-24]. Jako protoonkogen traktuje się też ostatnio gen kodujący fosfatazę cdc25, uczestniczącą w aktywacji kinazy cdk1. Aktywność tej kinazy decyduje o rozpoczęciu przez komórki podziału mitotycznego [25].

W artykule omawiane są funkcje komórkowe cyklin znajdujących w komórkach będących w fazie G1 cyklu, regulacja ekspresji kodujących je genów przez czynniki wzrostowe i niektóre protoonkogeny a także interakcja cyklin, zwłaszcza z grupy D, z produktem białkowym genu supresorowego Rb.

II. Cykliny fazy G1

Cykliny fazy G1 wykryto po raz pierwszy u drożdży, następnie zaś ich obecność wykazano także w komórkach ssaków. W komórkach ssaków do cyklin fazy G1 zalicza się trzy cykliny z klasy D—D1, D2 i D3 oraz cyklinę E. Tworzą one kompleksy z odpowiednimi kinazami cdk: cykliny D przede wszystkim z kinazami cdk4 i cdk6 [26-28], cyklina E tylko z kinazą cdk2 [29, 30]. Kinazy, których podjednostkami regulatorowymi są cykliny D działają na początku fazy G1 cyklu [31]. Aktywność kinazy cdk2 skompleksowanej z cykliną E pojawia się później osiągając maksimum w komórkach będących na granicy faz G1 i S (Ryc. 1). W komórkach w fazie G1 występują również w znacznych ilościach kompleksy zawierające oprócz cyklin i kinaz cdk także ich różne białkowe inhibitory oraz PCNA. Wewnątrzkomórkowy poziom inhibitorów zależy od różnorodnych czynników. Wydaje się więc, że stanowią one bardzo istotny czynnik regulujący. Udział tych inhibitorów w regulacji cyklu komórkowego jest przedmiotem licznych artykułów [13, 32-35], omawiano je także w „*Postęпах Biochemii*” [12].



Ryc. 1. Zróżnicowane czasowo działanie kinaz cdk4/6 i cdk2 podczas fazy G1 (w oparciu o [32]). G₀, G₁, M, S — fazy cyklu komórkowego, R — punkt restrykcyjny

Zastosowanie specyficznych przeciwciał w stosunku do cyklin D [26-38] i cykliny E [39-40] lub anty-sensownych sekwencji nukleotydowych hamujących ekspresję genów tych cyklin [37, 41, 42], pozwoliło na wykazanie znaczącego i „różnicowanego czasowo” udziału cyklin D w przebiegu fazy G1 i rozpoczęcia przez komórki syntezy DNA. I tak nadekspresja cyklin D, umożliwia komórkom włączenie się do cyklu podziałowego [43] i skraca czas trwania fazy G1 [36, 38, 44-47]. Spadek wewnątrzkomórkowego poziomu cykliny D1 powoduje natomiast zahamowanie komórek w fazie G1 cyklu. W przypadku nowotworów (np. rak przełyku [42]) następuje wówczas utrata typowych cech dla komórek nowotworowych, jak zmieniona charakterystyka wzrostu i zdolność wywoływania nowotworów *in vivo*. Rozwijające się zarodki myszy pozbawione genu cykliny D1 wykazują też liczne zaburzenia rozwojowe, zwłaszcza siatkówki i gruczołów mlecznych. Wskazuje to na istotne różnice we wrażliwości różnych tkanek na brak cykliny D1 [48, 49]. Podobnie jak nadekspresja cykliny D1 również nadekspresja cykliny E [41, 50, 51], a w niektórych komórkach cykliny D2 [np. 52] skraca fazę G1 i przyspiesza rozpoczęcie przez komórki syntezy DNA.

Coraz więcej danych wskazuje, że wysoki poziom cykliny D1 może niekiedy zatrzymać komórki w fazie G1 cyklu. Na przykład nadekspresja cykliny D1 w ludzkich fibroblastach może uniemożliwiać im rozpoczęcie syntezy DNA [53], a także reperację DNA zachodzącą z udziałem PCNA [54]. Nadmiar cykliny D1 hamuje także wzrost ludzkich komórek leukemicznych linii Dami [55] oraz niektórych prawidłowych i nowotworowych komórek nabłonkowych [56]. Co więcej, podwyższony poziom cykliny D1 cechuje starzejące się komórki, zawierające nieaktywne kinazy cdk [57, 58]. W hamowaniu wzrostu komórek przez cyklinę D1 postuluje się udział białka supresorowego p53 i indukowanego przez nie białka p21, inhibitora kinaz cdk [59]. Ta ostatnia hipoteza zostanie omówiona w rozdziale V-3.

Z przedstawionych danych wynika, że cyklina D1 może uczestniczyć zarówno w indukcji jak i inhibicji cyklu komórkowego. Jak dotąd, mniej wiadomo o działaniu pozostałych cyklin D: cykliny D2 i cykliny D3. Ich oddziaływanie z kinazami cdk4 i cdk2 świadczy, że uczestniczą one w regulacji cyklu komórkowego, zwłaszcza w różnicowaniu komórek układu krwiotwórczego [60, 61] i mioblastów [62].

III. Nadekspresja cyklin fazy G1 w komórkach nowotworowych

W tabeli 3 zestawiono ludzkie i mysie nowotwory, w których stwierdzono nadekspresję cyklin fazy G1. Podwyższonej ekspresji ulega przede wszystkim cyklina D1, znacznie rzadziej zaś cykliny D2 i E. Nadekspresja może być wynikiem zwielokrotnienia genu, insercji wirusowych w obszar genu cykliny, a także

przemieszczeń fragmentów chromosomów [20]. W przeważającej części przebadanych nowotworów układu pokarmowego i przytarczyc, gen kodujący cyklinę D1 ulega zwielokrotnieniu, co powoduje znaczne podwyższenie jej syntezy. Często towarzyszy temu także amplifikacja innych położonych blisko genów, takich jak HST1 i INT2, kodujących różne czynniki wzrostowe [88]. Natomiast w nowotworach limfocytów B (chłoniaki) za zwiększoną syntezę cykliny D1 odpowiedzialne są przemieszczenia międzychromosomowe, w efekcie których gen cykliny D1 (chromosom 11) dostaje się pod kontrolę regulatorowego elementu genu immunoglobuliny IGH, który występuje w chromosomie 14. Przemieszczenie genu kodującego cyklinę D1 w pobliże regulatorowych elementów genu kodującego hormon przytarczyc (paratyroidyna) stwierdza się też często w gruczolakach przytarczyc [84]. Wzmoczoną aktywację genu cykliny D1 w mysich chłoniakach limfocytów T wywołuje natomiast wbudowanie mysiego wirusa MuLV powyżej sekwencji promotora genu cykliny D1.

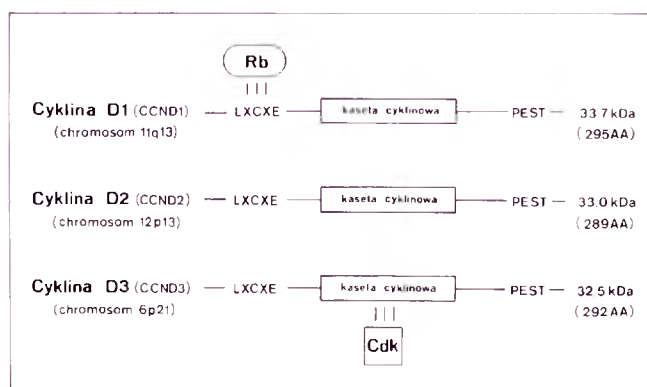
IV. Transkrypcja genów kodujących cykliny D, białka cyklin

Geny kodujące cykliny D1, D2 i D3 (*CCND1*, *CCND2* i *CCND3*) występują w komórkach ludzkich w 3 chromosomach — 11, 12 i 6 [20, 89-91] (Ryc. 2). W komórkach mysich gen kodujący cyklinę D1 znajduje się w chromosomie 7 [87]. Gen *CCND1* nosił początkowo nazwę *PRAD1* i znajdowano go w nieprawidłowym fragmencie chromosomu 11 typowym dla ludzkich komórek gruczolaka przytarczyc. Później dopiero okazało się, że gen *PRAD1* koduje cyklinę D1. Nie koduje natomiast cykliny D1 gen *bcl-1* występujący również w locus 12p13 komórek nowotworowych limfocytów B [19]. W kilku laboratoriach sklonowano

Tabela 3.

Nadekspresja cyklin G1 w różnych nowotworach u ludzi i u myszy.

Nowotwory	Nadekspresja cykliny	Piśm.
Ludzkie:		
rak piersi	D1; E	[63-66; 22]
rak wątroby (HCC)	D1	[67, 68]
rak jelita grubego	D1; D2 + E	[66; 69-70]
rak płuc	D1	[71]
rak żołądka	E	[72]
rak macicy	D1	[66]
rak przełyku	D1	[73, 74]
rak krtani	D1	[75]
rak głowy i karku	D1; D1 + D2	[66; 76, 77]
czerniaki	D1	[66]
chłoniak limfocytów B	D1; D1 + D2	[78-81]
białaczki	A	[82]
gruczolaki przytarczyc	D1	[83-85]
Mysie:		
rak sutka	D1; E + A	[86; 24]
rak skóry	D1	[87]



Ryc. 2. Cykliny D: ogólny schemat budowy i lokalizacja genów w chromosomach (z danych [20, 89-91])

gen kodujący cyklinę D1 [83, 84, 92] i przeprowadzono analizę jego sekwencji kodujących i promotorowych [92]. W promotorze genu cykliny D1 wykazano obecność licznych elementów regulatorowych, w tym miejsc związanych z indukcją jego ekspresji przez surowicę i białka c-Jun oraz p53 [59, 92]. W genach cykliny D1 wyizolowanych z 30 próbek raka piersi i 25 próbek gruczolaka przytarczyc nie znaleziono specyficznych mutacji [93]. Wielkość transkryptu genów kodujących cykliny D jest różna dla cyklin D1, D2 i D3 i wynosi odpowiednio 4,5, ~7 i 2,2 kb. Niemniej jednak wszystkie cykliny D zbudowane są z 289-295 aminokwasów.

Cykliny D1, D2 i D3 są w 60% homologiczne [20, 89, 90, 94] i zawierają identyczne domeny funkcjonalne. Są nimi: domena kasety cyklinowej, uczestnicząca w wiązaniu cyklin z odpowiednimi kinazami cdk, sekwencja aminokwasowa PEST, najprawdopodobniej niezbędna do degradacji cyklin G1 w fazie S [95, 96] oraz sekwencja aminokwasowa LXCXE biorąca udział w oddziaływaniu cyklin fazy G1 z białkiem supresorowym pRb, produktem genu supresorowego Rb (Ryc. 2).

V. Regulacja ekspresji genów cyklin D

Regulacja transkrypcji genów kodujących cykliny D jest bardzo złożona. Zarówno w komórkach prawidłowych jak i nowotworowych uczestniczą w niej liczne czynniki wzrostowe, hormony, białka kodowane przez kilka protoonkogenów i geny supresorowe *Rb* i *p53*, a także różne czynniki o działaniu antyproliferacyjnym. Decyduje to o specyficznej dla różnych komórek kolejności pojawiania się poszczególnych cyklin D, jak również o ich zmiennym stężeniu w trakcie fazy G1.

V-1. Czynniki wzrostowe, hormony i czynniki antyproliferacyjne

Większość danych o regulacji ekspresji dotyczy genu cykliny D1. Podwyższony poziom cykliny D1 charakteryzuje wiele komórek będących w fazie G1 [38, 97-100], jednakże nie występuje wyraźnie w komórkach transformowanych przez onkogenne wirusy

DNA [84, 101]. Problem ten zostanie omówiony w rozdziale V-3.

Praktycznie we wszystkich badanych komórkach (przede wszystkim fibroblastach i limfocytach mysich i ludzkich) ekspresja genów kodujących cykliny D wzrasta po podaniu surowicy [99, 102-104] oraz czynników wzrostowych takich jak PDGF [99, 103-105], EGF i bFGF [99], IGF-1 [99] bądź CSF-1 (makrofagi) [101]. W zależności od rodzaju komórek szczyt aktywności transkrypcyjnej przypada 6-8 godzin po podaniu surowicy lub mitogenu [99]. Wewnątrzkomórkowy poziom transkryptu może wzrosnąć nawet 30-krotnie. Indukcja ta zachodzi przy zahamowanej, za pomocą cykloheksimidu, syntezie białek [99, 104], co przemawia za niezależną od syntezy białek aktywacją transkrypcji tych genów.

Ester forbolu (TPA) będący aktywatorem kinazy C stymuluje ekspresję genów cyklin D w stopniu zbliżonym do aktywacji przez mitogeny [99, 100, 102, 106]. Co więcej, pod wpływem TPA w komórkach z nieaktywną kinazą C nie wzrasta ekspresja genu cykliny D1, a stymulujący efekt PDGF bywa w znacznym stopniu obniżony (o 75%) [104]. Wskazuje to na znaczący udział kinazy białkowej C w przekazywaniu sygnałów prowadzących do indukcji ekspresji genów cyklin fazy G1, zwłaszcza cykliny D1.

Czynnikiem stymulującym ekspresję cyklin D1 są również niektóre hormony sterydowe — estrogeny i progestyny, działające zwłaszcza na prawidłowe i nowotworowe komórki epitelialne gruczolę mlecznego [98, 107, 108].

Ekspresja genów cyklin D podlega również „negatywnej” regulacji przez fizjologiczne czynniki hamujące proliferację komórek. Należą do nich przede wszystkim: czynnik nekrozy nowotworów α , interferon γ i lipopolisacharyd bakteryjny (LPS) [109]. Również aktywatory kinazy adenylanowej jak dbcAMP, forskolina i prostaglandyna E2, hamują ekspresję cyklin D [99, 105, 109]. Należy zaznaczyć, że niektóre z tych związków (np. interferon γ , LPS) hamują zarazem indukowaną przez czynniki wzrostowe ekspresję protoonkogeny *c-myc* [109], który prawdopodobnie wpływa na ekspresję genów cyklin (patrz rozdział V-2). Ekspresję genu cykliny D1 (lecz nie D2 i D3) w komórkach nabłonkowych jelita hamuje także TGF- β [110, 111], a w komórkach endotelialnych naczyń krwionośnych inhibitor angiogenezy (AGM-1470) [192]. Hamujące działanie na ekspresję genu cyklin D1 i D2 w szczurzych komórkach gruczolaka przytarczyc wywiera także podwyższenie poziomu jonów Ca, być może wpływające pośrednio na mitogeny szlak przekazywania sygnałów [113]. Ekspresję genu cykliny D3 w limfocytach T hamują natomiast hormony glukokortykoidowe [114].

V-2. Białka kodowane przez protoonkogeny

Odkrycie działania cyklin fazy G1 w komórkach we

wczesnych etapach cyklu komórkowego nasuwało przypuszczenie, że cykliny te mogą być elementami szlaku przekazywania sygnałów regulowanego przez produkty protoonkogenów *myc*, *ras* i *jun*.

Aktywatorami transkrypcji genu cykliny D1 są, jak się wydaje, przede wszystkim białka kodowane przez protoonkogeny *c-ras* [15] i *c-jun* [92]. W komórkach epithelialnych transformowanych protoonkogenem *c-ras* zablokowanie syntezy cykliny D1, znacznie spowalnia proliferację, co wskazuje na znaczenie cykliny D1 jako pośrednika w transformacji przez *c-ras* [115]. Dodatkowym potwierdzeniem udziału białka Ras w regulacji jego ekspresji jest omówione wyżej hamowanie ekspresji genu cykliny D1 przez cAMP (rozdział V-1). Jak wiadomo cAMP blokuje szlak przekazywania sygnałów indukowany przez białko Ras. Co więcej, cyklina D1 i białko Ras współdziałają w transformowaniu szczyrczych fibroblastów i indukcji przez te ostatnie nowotworów po wszczepieniu do „nagich” myszy [116, 117] (rozdział VII). Również białko kodowane przez *c-jun* aktywuje ekspresję genu cykliny D1, jednak nie działa w ten sposób białko kodowane przez *c-fos*. Indukcja zachodzi tylko przy nienaruszonej sekwencji CRE w promotorze genu cykliny D1. Mutacje w obrębie CRE znoszą działanie białka c-Jun [92].

Dane dotyczące regulacji ekspresji genów cyklin fazy G1, zwłaszcza cykliny D1 przez białko Myc są sprzeczne. Liczne dane wskazują bowiem, że transfekcja komórek (mysie i szczyrcze fibroblasty) genem *c-myc* nie zmienia intensywności ekspresji genu cykliny D1 w komórkach spoczynkowych, hamuje zaś ją w komórkach proliferujących [46, 105, 117-119]. Natomiast w komórkach tych ulega indukcji ekspresja genów cyklin E i A. Hamowanie ekspresji genu cykliny D1 przez białko Myc wydaje się polegać na bezpośrednim jego oddziaływaniu z promotorem genu cykliny D1 [105]. Jedyne jak dotąd doniesienie o kilkukrotnej aktywacji przez Myc ekspresji genu cykliny D1 w szczyrczych komórkach RAT-1 [120] jest obecnie przedmiotem krytyki [121]. Tak więc cyklina D1 nie znajduje się prawdopodobnie w szlaku proliferacyjnym indukowanym przez *c-myc*.

Niemniej wykazano współdziałanie białka Myc i cykliny D1. Białka te współdziałają w wywoływaniu nowotworów w „nagich” myszach [117, 122] (rozdział VII). Nadekspresja zaś w komórkach cykliny D1 silnie indukuje w nich ekspresję genu *c-myc* (a także genu *c-jun*). W aktywacji promotora genu *c-myc* uczestniczy w tych komórkach czynnik transkrypcyjny E2F [46, 123].

Co więcej indukcja białka Myc w szczyrczych fibroblastach wywołuje wyraźną aktywację kinaz cdk zależnych od cyklin D1 i E, nie zmieniając liczby składników tych kompleksów [124]. W przypadku kompleksu kinazy cdk-cyklina E aktywacja taka wynika z uwolnienia aktywnego enzymu z wieloskładnikowego, nieaktywnego kompleksu zawierającego białkowy inhibitor p27. Nie wiadomo jak dotąd jaki jest mechanizm tego zjawiska w przypadku kinazy cdk4-cyklina D1. Są

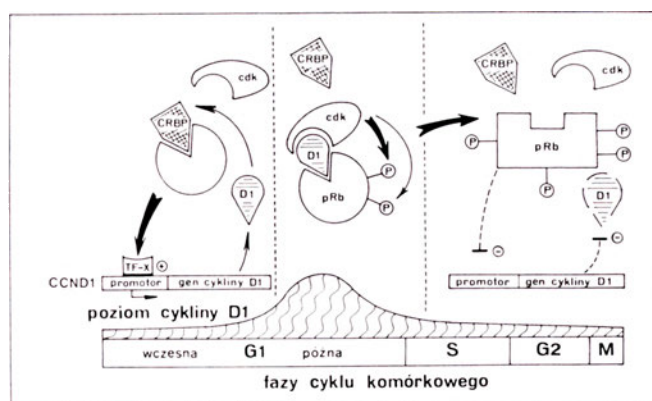
też doniesienia o indukcji przez białko Myc (razem z białkiem Ras) aktywności kinazy cdk1-cyklina B działającej w późniejszych niż G1 fazach cyklu [125].

V-3. Białka kodowane przez geny supresorowe — *Rb* i *p53*

Bardzo niski poziom cykliny D1 i nieobecność jej kompleksów z kinazami cdk4 i cdk6 charakteryzują komórki, w których brak jest białka supresorowego Rb lub w których jest ono z różnych powodów nieczynne [74, 126-130, 65]. Nieczynność białka Rb bywa wynikiem mutacji genu, która prowadzi do syntezy nieaktywnego białka Rb. Może też wynikać ze skompleksowania prawidłowego białka Rb nie tylko z cyklina D1 [21, 131-133] lecz także z różnymi białkami komórkowymi, w tym przede wszystkim z białkami kodowanymi przez onkogenne wirusy DNA (przegląd [11]).

Bezpośrednie dowody na udział białka Rb w regulacji ekspresji genów kodujących cykliny D uzyskano transfekując jego genem niezawierające go prawidłowe lub transformowane komórki [127, 128, 130]. Po transfekcji genem *Rb* następował w komórkach (wskutek bezpośredniej aktywacji promotora genu cykliny D1 przez białko Rb [128], kilkukrotny wzrost ekspresji genu cykliny D1 bez wzrostu ekspresji genów cyklin A i E. W promotorze genu kodującego cyklina D1 obecne są liczne sekwencje regulatorowe. Nie wykryto w nim, jak dotąd, sekwencji regulatorowej RCE (*retinoblastoma controlling elements*) [92]. Należy jednak pamiętać, że sekwencje RCE występują w promotorach wielu genów uczestniczących w kontroli wzrostu komórek (*c-fos*, *c-myc*, TFG- β 1) [134], a produkty niektórych z nich (patrz rozdział V-2) wpływają również na intensywność ekspresji genu cykliny D1.

Niewątpliwe powiązania funkcjonalne cykliny D1 i białka supresorowego Rb są przedmiotem licznych spekulacji oraz hipotez [135-137]. Ostatnio zaproponowany schemat przebiegu autoregulacji syntezy cykliny D1 i białka Rb uwzględnia indukcję ekspresji genu cykliny D1 przez białko Rb i unieczynnijający wpływ



Ryc. 3. Schemat oddziaływań między pRB i cyklina D1 podczas fazy i przejścia G1/S (wg [130] zmodyf.). Gruba czarna strzałka i znak + oznacza aktywację, linia przerywana i znak - hamowanie procesu

nadekspresji cykliny D1 na funkcjonowanie białka Rb (Ryc. 3) [130]. W bardzo dużym uproszczeniu proces ten przedstawia się następująco. Na początku fazy G1 występuje w komórkach nieufosforylowane białko Rb skompleksowane z różnymi białkami wiążącymi (CRBP). Poprzez oddziaływanie z hipotetycznym białkiem TF-X (być może czynnikiem transkrypcyjnym) białko Rb wpływa na poziom ekspresji genu cykliny D1. Cyklina D1, której ilość wzrasta w fazie G1, współzawodniczy z innymi białkami CRBP o wiązanie z białkiem Rb, ponadto tworzy aktywne enzymatycznie kompleksy z kinazami cdk4 i cdk6. Kinazy te fosforylują białko Rb w następstwie czego zmienia ono swoją konformację i z kompleksu z nim zostają uwolnione różne białka CRBP oraz cykliny. Uwolnione białka CRBP, w tym czynnik transkrypcyjny E2F, stymulują między innymi transkrypcję genów związanych z replikacją DNA. Z kolei ufosforylowane białko Rb hamuje aktywność promotora genu cykliny D1 co sprawia, że zawartość tego białka obniża się do poziomu z początku fazy G1. Spadek ilości cykliny D1, jak również pojawienie się w komórkach będących na granicy faz G1/S zwiększonych ilości białka p16, specyficznego inhibitora kinaz cdk4/cdk6 [138, 139], powodują ustanie fosforylującej aktywności tych enzymów.

Występująca w licznych komórkach nowotworowych nadekspresja cykliny D1 zaburza opisane powyżej zależności. Dzięki podwyższonej aktywności kinaz cdk4 i cdk6 następuje intensywniejsza fosforylacja (a więc inaktywacja) białka Rb, powodująca szybsze uwalnianie z kompleksu białek CRBP, co prowadzi w efekcie do wcześniejszego rozpoczęcia przez komórki syntezy DNA. Zwiększenie ilości cykliny D1 może również aktywować kinazy cdk dzięki wypieraniu skompleksowanego z nimi inhibitora p16. Związki białka Rb, kinaz cdk4/cdk6 i cykliny D1 z inhibitorem p16 opisano już w *Postęпах Biochemii* [12].

Zmutowane białko Rb, jak również białko Rb skompleksowane z białkami wirusów onkogennych nie jest zdolne do stymulacji ekspresji genu cykliny D1. Nie tworzy też ono kompleksów z cykliną D1 i kinazami cdk, nie stając się w ten sposób substratem tych enzymów. Co więcej, wyeliminowanie cykliny D1 (poprzez wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych) w komórkach stransformowanych wirusami onkogennymi nie zaburza w nich przebiegu fazy G1. Przemawia to za tym, że w komórkach stransformowanych wirusami onkogennymi funkcjonowanie cykliny D1 nie jest niezbędne [130].

Drugim białkiem supresorowym uczestniczącym w regulacji ekspresji genu cykliny D1 jest produkt genu supresorowego p53. Stymulację ekspresji genu cykliny D1 w ludzkich i mysich komórkach wywołuje zarówno samo prawidłowe białko p53 jak też białko p21, uniwersalny inhibitor wszystkich kinaz cdk, którego syntezę indukuje białko p53 [59]. Mechanizm tego zjawiska jest bardzo złożony. Postuluje się możliwość

bezpośredniego oddziaływania białka p53 z odpowiednimi sekwencjami regulatorowymi w promotorze genu cykliny D1. Przypuszcza się także, że indukcja ekspresji genu cykliny D1 przez inhibitor p21 może być związana z pojawianiem się w komórce nieufosforylowanego białka supresorowego Rb, aktywatora ekspresji genu kodującego cyklinę D1. Wyniki te wskazują, że cyklina D1 może być też jednym z mediatorów hamowania wzrostu komórek przez białko supresorowe p53.

VI. Inne czynniki regulujące wewnątrzkomórkowy poziom cyklin D1 i E

Do czynników wpływających na wewnątrzkomórkowy poziom cykliny D1 należy czynnik 4E (eiF. 4E), białko uczestniczące w translacji i wiążące się z mRNA (*mRNA cap binding protein*) [140, 141]. Nadekspresja tego czynnika translacyjnego w mysich fibroblastach powoduje bowiem nie tylko pewien wzrost transkrypcji genu cykliny D1, lecz także istotne zwiększenie ilości mRNA cykliny D1 związanego z polisomami. Przypuszcza się, że czynnik 4E wpływa na przemieszczanie utworzonego w jądrze mRNA do polisomów w cytoplazmie [141].

Wewnątrzkomórkowy poziom cyklin zależy też od trwałości ich mRNA. Na poziom mRNA cykliny E wywiera wpływ białko Δ FosB, naturalnie występująca w komórkach forma białka FosB, która nie zawiera C-końcowego fragmentu łańcucha uczestniczącego w transaktywacji [51]. Wewnątrzkomórkowy poziom tego białka w szurzych komórkach RAT-1 regulowany jest przez surowicę. Uważa się, że białko Δ FosB może bezpośrednio lub pośrednio maskować występujące w mRNA cykliny E sekwencje nukleotydowe decydujące o stabilności mRNA. Nie wiadomo jednak, czy działa ono w podobny sposób na cykliny D.

VII. Czy cykliny D działają jako onkogeny?

W poprzednich rozdziałach omówiono udział cyklin D w regulacji początkowych etapów cyklu podziałowego. Przedstawiono zaburzenia syntezy tego białka w nowotworach oraz jego współdziałanie z produktami genów supresorowych, zwłaszcza genu Rb. Nasuwa się pytanie, czy cyklinę D1, której rolą jest przede wszystkim aktywacja kinaz cdk4/cdk6 fosforylujących białko supresorowe Rb, można uznać za produkt protoonkogenu. Niezbędne jest w tym celu eksperymentalne wykazanie jej transformujących właściwości, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Dotychczasowe dane są niejednoznaczne. Wydaje się, że komórki transfekowane jedynie genem cykliny D1 i charakteryzujące się podwyższonym poziomem tego białka, nie ulegają transformacji nowotworowej, a jedynie skraca się w nich znaczący sposób czas trwania fazy G1 [116]. Natomiast transformacja nowotworowa fibroblastów gryzoni następuje w efekcie jednoczesnej ich transfekcji

genem cykliny D1 i genami *Ha-ras* lub *c-myc* bądź też genem kodującym białko E1A adenowirusa [46, 21, 116, 117]. Komórki te wszczepione „nagim” myszom powodują pojawienie się w nich nowotworów [117]. O konieczności współdziałania cykliny D1 i białka Ras w transformowaniu komórek świadczy też fakt, że wyeliminowanie cykliny D1 spowalnia działanie Ras [116]. Podobnie transfekowanie komórek raka przeliku antysensownym cDNA wobec genu cykliny D1 powoduje utratę przez nie cech komórek nowotworowych i zdolności do wywoływania nowotworów w „nagich” myszach [42].

W nielicznych jeszcze badaniach *in vivo* wykazano, że nadekspresja cykliny D1 w myszach transgenicznych zaburza proliferację komórek w gruczołach mlecznych (hiperplazja) i po około roku prowadzi do pojawienia się nowotworu piersi (gruczolakoraka) [86]. W myszach transgenicznych z nadekspresją cykliny D1 może też dojść do powstania chłoniaka limfocytów B. Tempo pojawiania się tego nowotworu narasta w następnych pokoleniach myszy, stanowiących potomstwo z krzyżówki z myszami transgenicznymi w stosunku do onkogenu *ras* bądź *myc* [122].

Wydaje się zatem, że przynajmniej w rozwoju niektórych nowotworów cyklina D1 odgrywa znaczącą rolę i stanowi szczególny onkogen ze względu na możliwość współdziałania zarówno z onkogenem *myc* jak i *ras*.

VIII. Uwagi końcowe

W artykule przedstawiono dane o działaniu cyklin D w komórkach w fazie G1 cyklu podziałowego. Precyzyjne ustalenie roli aż sześciu aktywnych enzymatycznie kompleksów cyklin D1, D2 i D3 z kinazami cdk4 i cdk6 jest trudnym zadaniem. Przypuszcza się, że wszystkie te kinazy cdk są być może niezbędne do odbierania przez komórkę różnych sygnałów zewnętrznych i fosforylowania jednego tylko substratu. Jest również prawdopodobne, że każdy z sześciu kompleksów kinazowych zdolny jest do odebrania tylko jednego, określonego sygnału i fosforylowania jednego, specyficznego dla niego substratu [20].

Wykazano, że wywołane przez różne czynniki rozregulowanie syntezy cykliny D1 (a może i D2) prowadzi do zaburzeń przebiegu cyklu podziałowego i w efekcie pojawiania się nowotworów różnych typów. Na czym więc polega onkogenne działanie cykliny D1? Niewątpliwie wynika ono ze zintensyfikowania jej normalnej, fizjologicznej funkcji, czyli aktywacji kinaz cdk. Nadekspresja cykliny D1 powoduje bowiem powstanie większych ilości aktywnych kinaz cdk 4/6 oraz przyczynia się do maskowania działania ich wewnątrzkomórkowych białkowych inhibitorów, których z każdym rokiem poznajemy coraz więcej. W 1995 r. wykryto nieznane dotąd inhibitory hamujące działanie wyłącznie kinaz cdk4 i cdk6, białka p18 i p19 [142-144], oraz p57^{KIP2} [145-147]. Uzyskano też

informacje o mechanizmie działania wykrytych wcześniej inhibitorów p15/16, p21 i p27 [148-150]. Pojawiają się też doniesienia o jednoczesnym występowaniu w różnych komórkach nowotworowych delekcji genu kodującego inhibitor p16 (uważany za gen supresorowy nowotworów) i amplifikacji genu cykliny D1 [151], bądź kinazy cdk4 [152], co bardzo skutecznie zaburza przebieg fazy G1.

Biologiczną konsekwencją wzrostu aktywności kinaz cdk4/cdk6 i wewnątrzkomórkowego stężenia cykliny D1 jest szybsza i efektywniejsza fosforylacja ich podstawowego substratu, białka supresorowego Rb. Rozpoczęta przez kinazy cdk4/cdk6 i kontynuowana w późnej fazie G1 przez kompleks kinaza cdk2 — cyklina E fosforylacja Rb powoduje jego inaktywację i w efekcie uwolnienie szeregu skompleksowanych z białkiem Rb czynników transkrypcyjnych — E2F, Sp1, ATF, MyoD, Elf-1. Ulega wówczas uaktywnieniu ekspresja licznych genów, w regulacji której uczestniczą wymienione wyżej czynniki transkrypcyjne [134, 153, 154]. Ostatnio wykazano, że również poszczególne cykliny mogą stymulować lub hamować działanie czynników transkrypcyjnych współdziałających z białkiem supresorowym Rb [155]. Poznajemy więc coraz więcej mechanizmów, których zaburzenia prowadzą do deregulacji cyklu komórkowego i powstania nowotworów.

Artykuł otrzymano 12 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Murray A W (1992) *Nature* (Lond) **359**: 599-604
2. Reed S I (1992) *Annu Rev Cell Biol* **8**: 529-561
3. Pines J (1993) *Trends Biochem Sci* **18**: 195-197
4. Pines J (1995) *Biochem J* **308**: 697-711
5. Nigg E A (1993) *Trends Cell Biol* **3**: 296-301
6. Nigg E A (1995) *BioEssays* **17**: 471-480
7. Morgan D O (1995) *Nature* (Lond) **374**: 131-134
8. Jakubowicz T (1991) *Post Biochem* **37**: 9-18
9. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* **38**: 98-107
10. Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* **39**: 16-24
11. Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Kosmos* **44**: 323-352
12. Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Post Biochem* **41**: 81-93
13. Kamb A (1995) *Trends in Genet* **11**: 136-140
14. Hunter T, Pines J (1991) *Cell* **66**: 1071-1074
15. Hunter T, Pines J (1994) *Cell* **79**: 573-582
16. Motokura T, Arnold A (1993) *Biochim Biophys Acta* **1155**: 63-78
17. Motokura T, Arnold A (1993) *Curr Op Genet Develop* **3**: 5-10
18. Sherr C J (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 187-190
19. Peters G (1994) *J Cell Sci* **18**: 89-96
20. Bates S, Peters G (1995) *Cancer Biol* **6**: 73-82
21. Hinds P W, Dowdy S F, Eaton E N, Arnold A, Weinberg R A (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 709-713
22. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert H J, Pardee A B (1994) *Cancer Res* **54**: 380-385
23. Dutta A, Chandra R, Leiter L M, Lester S (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5386-5390
24. Said T K, Medina D (1995) *Carcinogenesis* **16**: 823-830

25. Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, Beach D (1995) *Science* **269**: 1575-1577
26. Tam SW, Theodoras AM, Shay JW, Draetta GF, Pagano M (1994) *Oncogene* **9**: 2663-2674
27. Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G (1994) *Oncogene* **9**: 71-79
28. Myerson M, Harlow ED (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 2077-2086
29. Koff A, Giordano A, Desai D, Yamashita K, Harper JW, Elledge S, Nashimoto T, Morgan DO, Franza BR, Roberts JM (1992) *Science* **257**: 1689-1694
30. Koff A, Cross F, Fisher A, Schumacher J, Leguellec K, Philippe M, Roberts JM (1991) *Cell* **66**: 1217-1228
31. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 2066-2076
32. Reed SI, Bailey E, Dulic V, Hengst L, Resnitzky D, Slingerland J (1994) *J Cell Sci* **18**: 69-73
33. Draetta GF (1994) *Curr Op Cell Biol* **6**: 842-846
34. Peter M, Herskowitz I (1994) *Cell* **79**: 181-184
35. Gadbois DM, Peterson S, Bradbury EM, Lehnert BE (1995) *Exp Cell Res* **220**: 220-225
36. Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato J, Bar-Sagi D, Roussel MF, Sherr CJ (1993) *Gene & Develop* **7**: 1559-1571
37. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G (1993) *Gene & Develop* **7**: 812-821
38. Lukas J, Pagano M, Staskova Z, Draetta G, Bartek J (1994) *Oncogene* **9**: 707-718
39. Ohtsubo M, Roberts JM (1993) *Science* **259**: 1908-1912
40. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1995) *Cell Prolif* **28**: 337-346
41. Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2612-2624
42. Zhou P, Jiang W, Zhang Y, Kahn SM, Schieren I, Santella RM, Weinstein IB (1995) *Oncogene* **11**: 571-580
43. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 1669-1670
44. Resnitzky D, Reed SI (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3463-3469
45. Musgrove FA, Lee CSL, Buckley MF, Sutherland RL (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8022-8026
46. Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB (1993) *Oncogene* **8**: 3447-3457
47. Lukas J, Bartkova J, Welcker M, Petersen OW, Peters G, Strauss M, Bartek J (1995) *Oncogene* **10**: 2125-2134
48. Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C (1995) *Genes & Develop* **9**: 2364-2372
49. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA (1995) *Cell* **82**: 621-630
50. Wimmel A, Lucibello FC, Sewing A, Adolph S, Müller R (1994) *Oncogene* **9**: 995-997
51. Oda S, Nishida J, Nakabeppu Y, Sekiguchi M (1995) *Oncogene* **10**: 1343-1351
52. Kiyokawa H, Busquets X, Powell CT, Ngo L, Rifkind RA, Marks PA (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2444-2447
53. Atadja P, Wong H, Veillette C, Riabowol K (1995) *Exp Cell Res* **217**: 205-216
54. Pagano M, Theodoras AM, Tam SW, Draetta GF (1994) *Gene Develop* **8**: 1627-1639
55. Wilhide CC, Dang CV, Dipersio J, Kenedy AA, Bray PF (1995) *Blood* **86**: 294-304
56. Han EK, Sgambato A, Jiang W, Zhang YJ, Santella RM, Doki Y, Cacace AM, Schieren I, Weinstein IB (1995) *Oncogene* **10**: 953-961
57. Lucibello FC, Sewing A, Brüsselbach S, Bürger C, Müller R (1993) *J Cell Sci* **105**: 123-133
58. Dulic V, Drullinger LF, Lees E, Reed SI, Stein GH (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11034-11038
59. Chen X, Bargonetti J, Prives C (1995) *Cancer Res* **55**: 4257-4263
60. Kato J, Sherr CJ (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11513-11517
61. Kiyokawa H, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7195-7203
62. Kiess H, Gill NM, Hamel PA (1995) *Oncogene* **10**: 159-166
63. Schuurin E, Verhoeven E, van Tinteren H, Peterse JL, Nunnink B, Thunnissen FBJM, Devilee P, Cornelisse CJ, van de Vijver MJ, Mooi WJ, Michalides RJAM (1992) *Cancer Res* **52**: 5229-5234
64. Dickson C, Fantl V, Gillett C, Brookes S, Bartek J, Smith R, Fisher C, Barnes D, Peters G (1995) *Cancer Lett* **90**: 43-50
65. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Lützhof D, Strauss M, Bartek J (1994) *Int J Cancer* **57**: 353-361
66. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J (1995) *Oncogene* **10**: 775-778
67. Zhang YJ, Jiang W, Chen CJ, Lee CS, Kahn SM, Santella RM, Weinstein IB (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1010-1016
68. Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M, Ishizaki K (1994) *Cancer Res* **54**: 3107-3110
69. Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JKV, Markowitz S, Kinzler W, Vogelstein B (1993) *Cancer Res* **53**: 1986-1989
70. Kitahara K, Yasui W, Kuniyasu H, Yokozaki H, Akama Y, Younotani S, Hisatougu T, Tahara E (1995) *Int J Cancer* **62**: 25-28
71. Schauer IE, Siriwardana S, Langan TA, Sclafani RA (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7827-7831
72. Akama Y, Tahara W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E (1995) *Jpn J Cancer Res* **86**: 617-621
73. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang Y, Lu S-H, Weinstein IB (1992) *Cancer Res* **52**: 2980-2983
74. Jiang W, Zhang YJ, Kahn SM, Hollstein MC, Santella RM, Lu SH, Harris CC, Montesano R, Weinstein IB (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 9026-9030
75. Jares P, Fernandes PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traseria J, Cardesa A (1994) *Cancer Res* **54**: 4813-4817
76. Bartkova J, Lukas J, Müller H, Strauss M, Gusterson B, Bartek J (1995) *Cancer Res* **55**: 949-956
77. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A (1995) *Cancer Res* **55**: 975-978
78. Lukas J, Jadayel D, Bartkova J, Nacheva E, Dyer MJS, Strauss M, Bartek J (1994) *Oncogene* **9**: 2159-2167
79. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R (1995) *Blood* **85**: 2870-2876
80. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R (1995) *Br J Haematol* **89**: 798-804
81. Palermo I, Holder A, Sinclair AJ, Dickson C, Peters G (1993) *Oncogene* **8**: 1049-1054
82. Partellini P, Suberville AM, Zindy F, Melle J, Sonnier M, Marie JP, Dreyfus F, Brechot C (1993) *Cancer Res* **53**: 235-238
83. Arnold A, Kim HG, Gaz RD, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG, Shows TB, Kronenberg HM (1989) *J Clin Invest* **83**: 2034-2040
84. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A (1991) *Nature (Lond)* **350**: 512-515
85. Rosenberg CL, Kim HG, Shows TB, Kronenberg HM, Arnold A (1991) *Oncogene* **6**: 449-453
86. Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, Lees E, Arnold A, Schmidt EV (1994) *Nature (Lond)* **369**: 669-671
87. Bianchi AB, Fischer SM, Robles AI, Rinchik EM, Conti CJ (1993) *Oncogene* **8**: 1127-1133
88. Yoshida MC, Wada M, Satoh H, Yoshida T, Sakamoto H, Miyogama K, Yokota J, Koda T, Kakinuma M, Sugimura T, Terada M (1988)

- Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 4861-4864
89. Inaba T, Mutsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT (1992) *Genomics* **13**: 565-574
 90. Hanna Z, Jankowski M, Tremblay P, Jiang X, Milatovich A, Francke U, Jolicœur P (1993) **8**: 1661-1666
 91. Xiong Y, Menninger J, Beach D, Ward DC (1992) *Genomics* **13**: 575-584
 92. Herber B, Truss M, Beato M, Müller R (1994) *Oncogene* **9**: 1295-1304
 93. Hosokawa Y, Tu T, Tahara H, Smith AP, Arnold A (1995) *Cancer Lett* **93**: 165-170
 94. Motokura T, Keyomarsi K, Kronenberg HM, Arnold A (1992) *J Biol Chem* **267**: 20412-20415
 95. Reed SI (1991) *Trends in Genet* **7**: 95-99
 96. Salama SR, Hendricks KB, Thorner J (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 7953-7966
 97. Baldin V, Likas J, Marcote MJ, Pagano M, Bartek J, Draetta G (1993) *Genes Develop* **7**: 812-821
 98. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee CSL, Sweeney KJE, Watts CKW, Sutherland RL (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 3577-3587
 99. Sewing A, Bürger C, Brüsselbach S, Schalk C, Lucibello FC, Müller R (1993) *J Cell Sci* **104**: 545-554
 100. Won KA, Xiong Y, Beach D, Gilman MZ (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9910-9914
 101. Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, Sherr CJ (1991) *Cell* **65**: 701-713
 102. Ajchenbaum F, Ando K, DeCaprio JA, Griffin JD (1993) *J Biol Chem* **268**: 4113-4119
 103. Surmacz E, Reiss K, Sell C, Baserga R (1992) *Cancer Res* **52**: 4522-4525
 104. Winston JT, Pledger WJ (1993) *Mol Biol Cell* **4**: 1133-1144
 105. Philipp A, Schneider A, Väsrik I, Finke K, Xiong Y, Beach D, Alitalo K, Eilers M (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 4032-4043
 106. Coppock D, Buffolino P, Kopman C, Nathanson L (1995) *Exp Cell Res* **221**: 92-102
 107. Sutherland RL, Watts CKW, Musgrove EA (1993) *J Steroid Biochem Molec Biol* **47**: 1-6
 108. Watts CKW, Sweeney KJE, Warlters A, Musgrove EA, Sutherland RL (1994) *Breast Cancer Res Treat* **31**: 95-105
 109. Cocks BG, Vairo G, Bodrug SE, Hamilton JA (1992) *J Biol Chem* **267**: 12307-12310
 110. Geng Y, Weinberg RA (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10315-10319
 111. Ko TC, Sheng HM, Reisman D, Thompson EA, Beauchamp RD (1995) *Oncogene* **10**: 177-184
 112. Hori A, Ikeyama S, Sudo K (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 1067-1073
 113. Bianchi S, Fabiani S, Muratori M, Arnold A, Sakaguchi K, Miki T, Brandi ML (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **204**: 691-700
 114. Rhee K, Bresnahan W, Hirai A, Hirai M, Thompson EA (1995) *Cancer Res* **55**: 4188-4195
 115. Filmus J, Robles AI, Shi W, Wong MJ, Colombo LL, Conti CJ (1994) *Oncogene* **9**: 3627-3633
 116. Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, Ng SY, Yen J JY, Yang-Yen HF (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 3654-3663
 117. Lovec H, Sewing A, Lucibello FC, Müller R, Möröy T (1994) *Oncogene* **9**: 323-326
 118. Jansen-Dürr P, Meichle A, Steiner P, Pagano M, Finke K, Botz J, Wessbecher J, Draetta G, Eilers M (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3685-3689
 119. Hanson KD, Shichiri M, Follansbee MR, Seditvy JM (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 5748-5755
 120. Daksis JJ, Lu RY, Facchini LM, Marhin WM, Penn LJZ (1994) *Oncogene* **9**: 3635-3645
 121. Solomon D, Philipp A, Land H, Eiler M (1995) *Oncogene* **11**: 1893-1897
 122. Bodrug SE, Warner BJ, Bath ML, Lindeman GJ, Harris AW, Adams JM (1994) *EMBO J* **13**: 2124-2130
 123. Oswald F, Lovec H, Möröy T, Lipp M (1994) *Oncogene* **9**: 2029-2036
 124. Steiner P, Philipp A, Lukas J, Godden-Kent D, Pagano M, Mittnacht S, Bartek J, Eiler M (1995) *EMBO J* **14**: 4814-4826
 125. Born TL, Frost JA, Schönthal A, Prendergast GC, Feramisco JR (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 5710-5718
 126. Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G (1994) *Oncogene* **9**: 1633-1640
 127. Gjetting T, Lukas J, Bartek J, Strauss M (1995) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**: 441-446
 128. Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 2945-2949
 129. Lukas J, Bartkova J, Rhode M, Strauss M, Bartek J (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2600-2611
 130. Lukas J, Müller H, Bartkova J, Spitkovsky D, Kjerulff AA, Jansen-Dürr, Strauss M, Bartek J (1994) *J Cell Biol* **125**: 625-638
 131. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato JY, Livingston DM (1993) *Cell* **73**: 487-497
 132. Dowdy SF, Hinds PW, Luic K, Reed SI, Weinberg RA (1993) *Cell* **73**: 499-511
 133. Hall FL, Williams RT, Wu L, Wu F, Carbonaro-Hall DA, Harper JW, Warburton D (1993) *Oncogene* **8**: 1377-1384
 134. Udvadia AJ, Templeton DJ, Horowitz JM (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3953-3957
 135. Hunter T, Karin H (1992) *Cell* **70**: 375-387
 136. Weinberg RA (1995) *Cell* **81**: 323-330
 137. Horton LE, Qian Y, Templeton DJ (1995) *Cell Growth Differ* **6**: 395-407
 138. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y (1994) *Cancer Res* **54**: 6078-6082
 139. Tam SW, Shay JW, Pagano M (1994) *Cancer Res* **54**: 5816-5820
 140. Rosenwald IB, Lazaris-Karatzas A, Sonenberg N, Schmidt EV (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 7358-7363
 141. Rosenwald IB, Kaspar R, Rousseau D, Gehrke L, Leboulch P, Chen JJ, Schmidt EV, Sonenberg N, London IM (1995) *J Biol Chem* **270**: 21176-21180
 142. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y (1994) *Gene Develop* **8**: 2939-2952
 143. Chan FKM, Zhang J, Cheng L, Shapiro DN, Winoto A (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2682-2688
 144. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) *Mol Cell Biol* **15**: 2672-2681
 145. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995) *Gene Develop* **9**: 650-662
 146. Hatada I, Mukai T (1995) *Nature Genet* **11**: 204-206
 147. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995) *Gene Develop* **9**: 639-649
 148. Hall M, Bates S, Peters G (1995) *Oncogene* **11**: 1581-1588
 149. Aprelikova O, Xiong Y, Liu ET (1995) *J Biol Chem* **270**: 18195-18197
 150. Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ (1995) *Cancer Res* **55**: 6200-6209
 151. Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J (1995) *Cancer Res* **55**: 4818-4823
 152. He J, Olson JJ, James CD (1995) *Cancer Res* **55**: 4833-4836
 153. Weintraub SJ, Chow KNB, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC (1995) *Nature (Lond)* **375**: 812-815
 154. Johnson DG (1995) *Oncogene* **11**: 1685-1692
 155. Shao Z, Robbins PD (1995) *Oncogene* **10**: 221-228

Addendum

Zaczynają się też pojawiać dane, że cyklina D1 i jej katalityczni partnerzy, kinazy cdk4/6, mogą uczestniczyć nie tylko w onkogenezie lecz także w procesach prowadzących do śmierci komórek. Dotyczy to zwłaszcza nie dzielących się, końcowo zróżnicowanych neuronów, w których podwyższenie poziomu cykliny D1 i następująca aktywacja kinaz cdk wywołują apoptozę [1, 2].

*Drożej Pani Profesor,
wdzięczna za „szkolę” pisania artykułów przeglądowych
autorka.*

Cykl komórkowy i apoptoza: śmierć starej komórki

Cell cycle and apoptosis: death of senescent cell

EWA SIKORA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Cykl komórkowy i śmierć komórki
 - II-1. Morfologiczne i biochemiczne podobieństwo mitozy i apoptozy
 - II-1. Aktywność cyklino-zależnych kinaz w komórkach mitotycznych i apoptotycznych
 - II-3. Rola czynnika transkrypcyjnego AP-1 w proliferacji i apoptozie
- III. Znaczniki starzenia komórkowego
- IV. Śmierć starej komórki
- V. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: NK — natural killers; PCNA — proliferating cell nuclear antigen; cdk — cyclin-dependent kinases

I. Wstęp

Dorosły organizm wielokomórkowy budują zarówno komórki w pełni zróżnicowane, które dawno już przestały się dzielić, na przykład komórki układu nerwowego i miokardium, jak też komórki, które nie przestają się dzielić do końca życia organizmu, jak komórki macierzyste szpiku kostnego i nabłonków. Są też komórki, jak fibroblasty i limfocyty, o których sądzi się, że wyczerpują swój potencjał proliferacyjny w miarę postępującego procesu starzenia [1]. Homeostaza organizmu zależy od równowagi pomiędzy komórkami dzielącymi się i umierającymi. Zachwianie tej równowagi w stanach patologicznych może prowadzić do nadumieralności komórek jak to ma miejsce w przypadku limfocytów T u nosicieli wirusa HIV-1,

Contents:

- I. Introduction
- II. Cell cycle and cell death
 - II-1. Morphological and biochemical similarities of mitosis and apoptosis
 - II-2. Cyclin-dependent kinases activity in mitotic and apoptotic cells
 - II-3. The role of AP-1 transcription factor in proliferation and apoptosis
- III. Markers of cellular senescence
- IV. Death of senescent cell
- V. Concluding remarks

lub przerostu tkanki obserwowanego w chorobach nowotworowych [2]. Starzenie organizmu zakończone śmiercią można rozpatrywać jako zaburzenia w równowadze objawiające się zarówno zmniejszoną zdolnością komórek do podziałów, jak też do aktywnej śmierci.

II. Cykl komórkowy i śmierć komórki

Podziały komórkowe zachodzą pod wpływem zewnętrznych czynników stymulujących tzw. mitogenów, indukujących kaskadę genetycznych i biochemicznych zdarzeń, prowadzącą w efekcie końcowym do podwojenia DNA, podziału jądra komórkowego czyli mitozy, i powstania dwóch siostrzanych komórek.

Śmierć komórki zwana apoptozą, śmiercią programowaną, lub śmiercią samobójczą zachodzi w warunkach fizjologicznych pod wpływem bardzo różnorodnych czynników. Uruchamiają one w komórce różne programy genetyczne zależnie od typu komórki oraz bodźca. Jednakże niektóre zmiany biochemiczne i morfologiczne są podobne w każdej umierającej komórce i prowadzą w efekcie końcowym do fragmen-

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

tacji DNA i rozpadu komórki na ciała apoptotyczne. Poprzez apoptozę umierają komórki zbędne i potencjalnie szkodliwe dla organizmu. Na temat śmierci programowanej komórki ukazało się dotychczas bardzo wiele artykułów przeglądowych, w tym również w języku polskim [3-8].

Od pewnego czasu wydaje się oczywiste, że zarówno bodźce mitogenne jak też stymulujące apoptozę indukują w komórce pewne zdarzenia, które do pewnego etapu są wspólne dla obydwu procesów; podziału i śmierci komórki [9-11]. Czasami śmierć komórki określa się mianem poronnej mitozy [12]. Spotyka się też taki pogląd, że śmierć komórki następuje w wyniku konfliktu sygnałów indukujących jednocześnie podziały i zatrzymanie cyklu komórkowego [13].

II-1. Morfologiczne i biochemiczne podobieństwo mitozy i apoptozy

W morfologii komórek mitotycznych i apoptotycznych można odnaleźć wiele podobieństw. I tak, komórki hodowane *in vitro* i wchodzące w podziały tracą kontakt z podłożem, zaokrąglają się i kurczą. Zwykle następuje rozerwanie błony jądrowej. Chromosomy siostrzane przyczepione do wrzeciona podziałowego rozchodzą się do przeciwległych biegunów. Podobnie, komórki apoptotyczne tracą kontakt z podłożem, zaokrąglają się i kurczą. Następuje kondensacja chromatyny. DNA komórek apoptotycznych nie ulega jednakże replikacji (przynajmniej całkowitej), lecz po fragmentowaniu na odcinki równe wielokrotności 200 par zasad. Komórka rozpada się na liczne, różnej wielkości ciała apoptotyczne, które są fagocytowane [11]. Tak więc, chociaż komórki wykazują znaczne morfologiczne podobieństwo w początkowych etapach mitozy i apoptozy, różnią się dramatycznie w końcowej fazie obydwu procesów. Początkowe podobieństwa morfologiczne pozwalają przypuszczać, że procesy biochemiczne zapoczątkowujące kaskadę zdarzeń zachodzącą w mitozie i apoptozie są takie same lub podobne.

II-2. Aktywność cyklino-zależnych kinaz w komórkach mitotycznych i apoptotycznych

Przejście komórek przez poszczególne fazy cyklu komórkowego kontrolowane jest przez cyklino-zależne kinazy (cdk, *cyclin-dependent kinases*). Aktywność tych enzymów, które należą do rodziny kinaz fosforylujących w białkach reszty serynowe i treoninowe, regulowana jest poprzez ich aktywatory (cykliny) i inhibitory (p16, p15, p26, p27) [prace przeglądowe 14-16]. Wśród substratów cyklino-zależnych kinaz znajdują się białka cytosolowe jak i jądrowe, np. białka wiążące mikrotubule, lamininy i histony [11].

W wielu komórkach stymulowanych do apoptozy różnymi czynnikami obserwuje się wzrost ekspresji genów kodujących kinazy cyklino-zależne jak też ich

aktywatory, lub wzrost aktywności produktów białkowych ich genów. Wzrost aktywności cyklino A-zależnej kinazy cdc2 obserwowano w komórkach chłoniaka indukowanych do apoptozy komórkami NK. Natomiast w komórkach mysiego mięsaka z nieaktywną kinazą cdc2, traktowanych w podobny sposób, nie udało się uruchomić programu apoptozy [17]. W komórkach HeLa natomiast, wzrost aktywności kinazy cdc2 następował po traktowaniu ich licznymi czynnikami indukującymi apoptozę, takimi jak kofeina, 6-dimetylamino-puryna, staurosporyna i kwas okadajowy [18]. Szczurze fibroblasty hodowane bez surowicy wykazywały podczas apoptozy indukowanej protoonkogenem *c-myc* wzrost aktywności kinazy cdc2 poprzedzony indukcją transkrypcji cykliny A [19]. W neuronach stymulowanych do apoptozy obserwowano 10-krotny wzrost ekspresji innej cykliny, D1 należącej do cyklin fazy G1 [20]. W limfocytach indukowanych do śmierci tymidyną występował wzrost ekspresji genów kodujących *c-myc*, cdc2, PCNA i cyklinę A [21].

II-3. Rola czynnika transkrypcyjnego AP-1 w proliferacji i apoptozie

Komórki pobudzone do podziałów czynnikami wzrostowymi, poza indukcją aktywności specyficznej dla poszczególnych faz cyklu komórkowego cyklino-zależnych kinaz, wykazują natychmiastową ekspresję genów tak zwanej „wczesnej odpowiedzi komórkowej” [22]. Do tej grupy genów zaliczamy wiele protoonkogenów z rodzin *c-fos* i *c-jun*. Również czynnik transkrypcyjny AP-1, który jest dimerem składającym się z białek kodowanych przez geny zaliczane do rodzin protoonkogenów *c-fos* i *c-jun*, bierze udział w regulacji proliferacji komórkowej. Aktywuje on mianowicie ekspresję wielu genów stymulowaną działaniem czynników wzrostowych, cytokin, promotorów nowotworów, kancerogenów oraz różnych onkogenów. Znane są geny docelowe tego czynnika transkrypcyjnego, istotne dla podziałów komórkowych i kodujące białka enzymatyczne, takie jak kolagenaza, striomielizyna, metalotioneina II, a także interleukina-2 [23]. Wzrost aktywności AP-1 obserwuje się również pod wpływem innych, nie tylko mitogennych bodźców. Szczególnie dobrze udokumentowana jest rola AP-1 w regulacji genów docelowych w komórkach poddawanych działaniu promieni UV [24]. Ostatnio w wielu laboratoriach wykazano nie tylko wzrost ekspresji genów kodujących białka wchodzące w skład AP-1, ale również wzrost aktywności samego AP-1 również w komórkach apoptotycznych [25-32]. Są jednak również doniesienia o zahamowaniu indukcji AP-1 w komórkach poddawanych działaniu glukokortykoidów wykazujących aktywność immunosupresyjną i apoptogenną [33-35]. Wyniki ostatnio opublikowanych badań rzucają nieco światła na te kontrowersyjne dane i wskazują na nową rolę AP-1 w regu-

lacji funkcji komórki. Otóż w fibroblastach naświetlanych UV obserwowano wzrost ekspresji *c-fos* i aktywności AP-1, co autorzy pracy wiążą z bliżej nie znaną jeszcze ochronną rolą produktu białkowego genu *c-fos* przed skutkami uszkodzeń DNA. W komórkach pozbawionych genu *c-fos* nie obserwowano indukcji AP-1, natomiast wykazywały one znacznie większą podatność na apoptozę pod wpływem UV [36]. Bardzo możliwe więc, że wzrost aktywności AP-1 obserwowany w wielu komórkach apoptotycznych ma związek raczej z uruchomieniem procesów ochrony komórki przed skutkami uszkodzeń DNA niż z samym programem apoptozy. Apoptoza jako taka może stanowić następstwo braku wydolności procesów ochronnych spowodowane zbyt silnym bodźcem. Inne wytłumaczenie tego zjawiska może być związane z tym, że w komórkach apoptotycznych w kompleksie AP-1 obserwowano zwykle obecność głównie produktów białkowych genów z rodziny *jun*, a nie *fos* [27, 28, 31]. Niewykluczone, że indukcja AP-1 dotyczy tylko niektórych komórek stymulowanych do apoptozy i nie może być traktowana jako uniwersalna część programu apoptozy. Nie wydaje się to takie dziwne zważywszy, że praktycznie każda komórka może posiadać własny program śmierci zależny zarówno od czynników wewnętrznych jak i zewnętrznych.

III. Znaczniki starzenia komórkowego

Starzenie komórek *in vitro*, zwane również starzeniem replikacyjnym, stanowi bardzo dogodny model do badania procesu starzenia na poziomie komórkowym [37]. Objawia się ono ograniczoną zdolnością komórek do podziałów, wyznaczaną wiekiem osobniczym dawcy oraz średnią długością życia przedstawicieli jego gatunku (tzw. limit Hayflicka). Wielu badaczy uważa jednak, że starzenie komórek *in vitro*, nie tłumaczy w pełni procesu starzenia zachodzącego na poziomie całego organizmu, gdyż wiele komórek nie traci do końca jego życia zdolności proliferacyjnej. Możemy jednak przyjąć, że starzenie replikacyjne jest odbiciem procesów zachodzących *in vivo*, przynajmniej w odniesieniu do takich komórek jak fibroblasty i limfocyty [38].

Stare fibroblasty hodowane *in vitro*, będące w tak zwanej III fazie Hayflicka, nie są zdolne do proliferacji pomimo obecności w pożywce czynników mitogennych [39]. Zatrzymane są one w fazie G1 cyklu komórkowego. [40]. Chociaż do tej pory nie udało się stwierdzić w tych komórkach ekspresji genów specyficznych dla starych komórek, to jednak genetycznie i biochemicznie różnią się one od swoich młodszych, dzielących się komórek matczyńskich. Do dzisiaj opisano kilka znaczników starych komórek. Różnią się one od swych odpowiedników występujących w komórkach młodych, stężeniem lub modyfikacjami potranslacyjnymi. I tak w starych fibroblastach hodowanych *in vitro* oraz w limfocytach otrzymanych ze starych

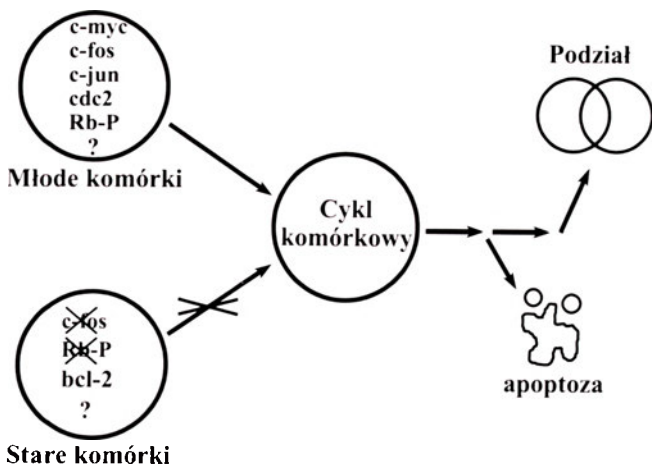
myszy i stymulowanych do proliferacji nie obserwuje się indukcji ekspresji genu *c-fos*, natomiast widoczne jest obniżenie aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1 w porównaniu z komórkami młodymi [41-43]. W starych, nie dzielących się komórkach nie stwierdzono też fosforylacji białka RB ani ekspresji kinazy *cdc2* oraz jej aktywatorów, cyklin A i B [44-46]. Gen *Rb* jest genem supresorowym nowotworu i bierze udział w regulacji proliferacji i różnicowania komórek. Fosforylacja ponad dziesięciu reszt serynowo-treoninowych w białku RB umożliwia komórce przejście z fazy G1 do fazy S [47, 48]. Jednakże kinaza *cdc2* oraz jej aktywatory cykliny A i B są aktywne w drugiej fazie cyklu komórkowego, nie mogą być zatem odpowiedzialne za brak fosforylacji białka RB w starych komórkach. Brak ekspresji genów kodujących te białka jest raczej konsekwencją, a nie przyczyną zatrzymania tych komórek w fazie G1. Prawdopodobnie brak fosforylacji białka RB w starych fibroblastach spowodowany jest występowaniem w tych komórkach nieaktywnej, zależnej od cykliny E, kinazy *cdk2*, tej samej, której aktywna forma występuje w młodych komórkach [49, 50]. Innym znacznikiem starych komórek może być niefosforylowana forma białka zwanego inhibitoryną [51]. Charakterystyczna dla starych (ale także młodych będących w fazie spoczynkowej) komórek jest obecność białka zwanego statyną, którego nie wykrywa się w komórkach proliferujących [52]. Z kolei białko zwane termininą różni się masą cząsteczkową w zależności od wieku komórek. W młodych spoczynkowych, jak i dzielących się komórkach występuje forma o masie cząsteczkowej 90/87 kDa, a w starych — 60/57 kDa [53]. W starych fibroblastach obserwowano 10-20 krotnie wyższą ekspresję genu zwanego *sdi1* [54] (patrz rozdział IV). Tylko w starych fibroblastach i keratynocytach wykryto obecność pewnej formy β -galaktozydazy [55]. Bardzo charakterystycznym wyznacznikiem replikacyjnego starzenia jest też skracanie telomerów opisywane wcześniej w *Postęпах Biochemii* [56].

IV. Śmierć starej komórki

Po zaprzestaniu podziałów fibroblasty mogą żyć w hodowli jeszcze bardzo długo. Morfologicznie różnią się jednak od młodych, dzielących się komórek [53]. Większość z nich ma znacznie większe rozmiary. W puli starych fibroblastów nie obserwuje się komórek, które wykazują morfologiczne podobieństwo do komórek apoptotycznych. Wydaje się, że komórki stare, jako niezdolne do proliferacji są szczególnie odporne na uruchomienie programu apoptozy. Nie wykluczone, że fenotyp starych komórek można uznać nie tylko za antyproliferacyjny, ale również za antyapoptotyczny. W hodowli fibroblastów *in vitro*, komórki apoptotyczne są usuwane wraz z pożywką podczas przesiewania komórek. Pozostają tylko komórki żywe, zdolne do adhezji. Przepuszczalnie więc podczas ruty-

nowych czynności związanych z hodowlą komórek dochodzi do selekcji fenotypu niezdolnego do śmierci programowanej. Jest to jednocześnie fenotyp starej komórki, która wyczerpała potencjał proliferacyjny [53]. Wydaje się, że również genotypowo stare komórki różnią się od komórek zdolnych do uruchomienia programu apoptozy. W starych komórkach w odróżnieniu od młodych stymulowanych do proliferacji lub apoptozy, nie następuje wzrost ekspresji protoonkogenu *c-fos* i wzrost aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, a także ekspresji genów kodujących kinazę *cdc2* oraz cykliny A i B nie zachodzi też fosforylacja RB (rozdział II-3). Natomiast w mysich fibroblastach 3T3 stymulowanych do apoptozy obserwowano indukcję protoonkogenów *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, a także genu *cdc2* oraz wzrost fosforylacji białka RB. W komórkach o morfologii charakterystycznej dla komórek apoptotycznych obserwowano włączanie bromodeoksyurydyny świadczące o niezbędności replikacji DNA (przynajmniej częściowej) w realizacji programu apoptozy [57]. W mysich fibroblastach 3T3 stymulowanych do apoptozy niedoborem surowicy obserwowano również spadek zawartości statyny, białka, które jest znacznikiem komórek spoczynkowych, w tym również starych [58]. Terminina z komórek apoptotycznych miała inną masę cząsteczkową (30 kDa) niż w dzielących się, a także w starych komórkach (rozdział III) [53]. Można się zatem spodziewać, że stare fibroblasty, niezdolne do replikacji DNA, ekspresji *c-fos* i fosforylacji białka RB, nie tylko nie są w stanie wejść w cykl komórkowy, ale nie potrafią też uruchomić programu apoptozy. Sytuację powyższą obrazuje rysunek 1. Rzeczywiście, ostatnio uzyskane wyniki świadczą o tym, że ludzkie fibroblasty z III fazy Hayflicka nie są podatne na apoptozę indukowaną niedoborem surowicy. W porównaniu z młodymi, umierającymi komórkami obserwowano w nich podwyższony poziom genu i białka *bcl-2* [59]. Produkt białkowy genu *bcl-2* w wielu komórkach hamuje apoptozę wywołowaną różnymi czynnikami [60].

Niejasna, jak do tej pory, wydaje się rola białka p53 w regulacji apoptozy starych komórek. W większości,



Ryc. 1. Schemat przedstawiający powiązania pomiędzy cyklem komórkowym i apoptozą.

choć nie we wszystkich do tej pory badanych komórkach, program apoptozy zależy od obecności dzikiej, niezmutowanej formy białka p53. Ma to szczególne znaczenie w przypadku śmierci indukowanej czynnikami uszkadzającymi DNA. Następuje wtedy wzrost ilości białka p53, które zatrzymuje komórkę w fazie G1 przez hamowanie replikacji DNA co daje jej czas na naprawę DNA przed podjęciem podziałów. Białko p53 może również indukować apoptozę. Ma to przede wszystkim miejsce wówczas, gdy uszkodzenia DNA są zbyt rozległe i komórka nie jest w stanie ich naprawić [61, 62]. Odbywa się to prawdopodobnie poprzez zahamowanie ekspresji genu *bcl-2*, którego p53 jest tzw. wyciszaczem (ang. *silencer*) [63].

W starych komórkach możnaby spodziewać się wzrostu ekspresji p53. Mogłoby to wraz z brakiem fosforylacji RB sprzyjać zatrzymaniu komórek w fazie G1. Rzeczywiście wykazano, że do immortalizacji starych fibroblastów wirusem SV40 (przywrócenia zdolności do podziałów) niezbędne jest związanie (a więc funkcjonalne unieczynnienie) przez onkogen wirusowy zarówno białka RB jak i białka p53 [64]. Z drugiej strony wiemy, że białko p53 jest niezbędne w realizacji programu apoptozy w komórkach wielu, choć nie wszystkich, typów. Tymczasem wiadomo, że stare komórki prawdopodobnie nie są zdolne do apoptozy. Można by się było zatem spodziewać w nich wręcz mniejszej ilości białka p53. Wyniki badań dotyczące ekspresji p53 w starych komórkach nie są jednoznaczne. W zależności od laboratorium, z którego pochodzą wskazują na zmniejszoną, niezmienną, lub wręcz powiększoną ilość mRNA p53 w starych, w porównaniu z młodymi komórkami [65 i literatura tamże]. Na podstawie wyników tych badań nie wiele można powiedzieć o funkcji tego białka. O jego funkcjonalnej sprawności w starych komórkach zdają się świadczyć wyniki innych badań. Otóż jak wspomniano wcześniej w starych fibroblastach obserwuje się znaczny wzrost ekspresji genu *sd11* [54]. Jak się okazało gen ten koduje białko, które jest inhibitorem kinaz cyklino-zależnych. Zostało ono zidentyfikowane niezależnie również przez inne grupy badaczy i nazwane WAF1/CIP1, lub p21 [15]. Ekspresję genu p21 indukuje dzika forma białka p53 [66, 67]. Ale niezależną od p53 indukcję ekspresji p21 obserwuje się w komórkach różnicujących [68], a także komórkach stymulowanych do proliferacji czynnikami wzrostowymi [69]. Są to wyniki dość kontrowersyjne, gdyż komórki różnicujące charakteryzują się zahamowaniem podziałów. Idąc za sugestią Micheli'ego i w s p. [69] możemy przyjąć, że p21 hamuje proliferację tylko w przypadku jego ilościowej dominacji nad kompleksem kinaza-cyklina, co ma prawdopodobnie miejsce w starych komórkach. Natomiast jego indukcja we wczesnej fazie G1 może służyć jako zabezpieczenie przed przedwczesnym wejściem komórek w fazę S cyklu komórkowego. Poza hamowaniem aktywności kinaz p21 jest jednym z efektorów apoptozy przebiegają-

cej z udziałem p53 [67]. Jak więc pogodzić ten fakt z opornością starych komórek na uruchomienie programu apoptozy? Niewykluczone, że te ostatnie znalazły sposób na wyłączenie p21 jako efektora śmierci programowanej zależnej od p53, pozostawiając mu tylko zadanie inhibitora kinaz cyklicznych. Przemawia za tym wzrost ilości białka bcl-2 w starych komórkach sugerujący upośledzenie funkcji p53, jako czynnika hamującego ekspresję genu *bcl-2* [59].

V. Uwagi końcowe

Przedstawione badania dotyczące braku podatności starych komórek na śmierć programowaną zostały wykonane na komórkach hodowanych *in vitro*. Czy komórki starzejące się wraz z całym organizmem również tracą zdolność do apoptozy? Odpowiedź na to pytanie może być niejednoznaczna, podobnie jak w przypadku pytania o możliwość utraty zdolności do podziałów komórek starzejącego się organizmu. Prawdopodobnie niektóre komórki np. szpiku kostnego, zachowują zdolność do śmierci programowanej do końca życia osobniczego organizmu. Z drugiej strony limfocyty i fibroblasty mogą wraz z utratą zdolności do podziałów wykazywać większą oporność na apoptozę, nie tylko w hodowli, lecz również w starzejącym się organizmie. Ewentualny spadek, wraz z wiekiem organizmu, zdolności komórek do apoptozy, wydaje się mieć swoje logiczne uzasadnienie. Otóż możemy sobie wyobrazić, że niezdolność starych komórek do śmierci programowanej, pociągać może za sobą brak odpowiedniej odnowy organizmu. Sądzi się bowiem, że aktywna śmierć komórek stanowi jeden z ważniejszych mechanizmów obronnych organizmu prowadzący do usunięcia komórek uszkodzonych i zmutowanych. Być może, w miarę postępującego procesu starzenia nagromadzane są w organizmie uszkodzone i zmutowane komórki, wśród których są również komórki nowotworowe. Kończy się to załamaniem funkcjonowania organizmu jako całości i jego śmiercią.

Praca wykonana w ramach grantu KBN 6P20703707

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

- Pereira-Smith OM (1992) *Exp Cell Res* **27**: 441-445
- Thompson CB (1995) *Science* **267**: 1456-1462
- Radziszewska E (1995) *Post Biol Kom* **22**: 247-263
- Rożynkova D (1994) *Post Biol Kom* **21**: 303-318
- Sikora E (1995) *Post Biochem* **41**: 211
- Sikora E (1994) *Post Biochem* **40**: 150-160
- Sikora E (1995) *Kosmos* **44**: 353-363
- Sikora E (1995) W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnału. red. W. Konarska, PWN, Warszawa, str. 218-226
- Padney S, Wang E (1995) *J Cell Biochem* **58**: 135-150
- Meikrantz W, Schlegel W (1995) *J Cell Biochem* **58**: 160-174
- King KL, Cidlowski JA (1995) *J Cell Biochem* **58**: 175-180
- Ucker CS (1991) *New Biol* **3**: 103-109
- Yonish-Rouach E, Grunwald D, Wilder S., Kimchi A, May E, Lawrence JJ, May P, Oren M (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 1415-1423
- Grzelakowska-Sztabert B (1992) *Post Biochem* **38**: 98-107
- Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Post Biochem* **41**: 80-93
- Hartwell LH, Kastan MB (1994) *Science* **226**: 1821-1828
- Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH (1994) *Science* **263**: 1143-1145
- Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) **91**: 3754-3758
- Hoang AT, Cohen KJ, Barret JF, Bergstrom DA, Dang CV (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6875-6879
- Freeman RS, Estus S, Johnson EM (1994) *Neuron* **12**: 343-355
- Gazziti Y, Erdos GW (1994) *Cancer Res* **54**: 950-960
- Bravo R (1990) W: Habenicht (red) Growth factors, differentiation factors and cytokines, Springer-Verlag, Berlin
- Angel M, Karin P (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
- Ramhsdorf HJ (1994) W: Angel PE i Herrlich PA (red), The Fos and Jun families transcription factors. CRC Press, Boca Raton FL str. 169-189
- Sikora E, Grassilli E, Bellesia E, Troiano L, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 386-391
- Sikora E, Grassilli E, Radziszewska E, Bellesia E, Barbieri D, Franceschi C (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **197**: 709-715
- Marti A, Jehn B, Costello E, Keon N, Ke G, Martin F, Jaggi R (1994) *Oncogene* **9**: 1213-1223
- Kamińska B, Filipkowski RK, Żurkowska G, Lason W, Przewłocki R, Kaczmarek L (1994) *Europ J Neurosci* **6**: 1558-1566
- Kim R, Beck WT (1994) *Cancer Res* **54**: 4958-4966
- Mollinedo F, Gajate C, Modolell M (1994) *Biochem J* **302**: 325-329
- Ham J, Babij C, Whitfield J, Pfarr CM, Lallemand D, Yaniv M, Rubin LL (1995) *Neuron* **14**: 927-939
- Tong L, Perez-Polo JR (1995) *Neurosci Lett* **191**: 137-140
- Walker PR, Kwast-Welfeld J, Gourdeau H, Leblanc J, Neugebauer W, Sikorska M (1993) *Exp Cell Res* **207**: 142-151
- Goldstone SD, Lavin MF (1994) *Oncogene* **9**: 2305-2311
- Helmbert A, Auphan N, Caelles C, Karin M (1995) *EMBO J* **14**: 452-460
- Schreiber M, Bauman B, Cotten M, Angel P, Wagner EF (1995) *EMBO J* **14**: 5338-5349
- Goldstein S (1990) *Science* **249**: 1129-1133
- Vojta PJ, Barretr JC (1995) *Biochim Biophys Acta* **1242**: 29-41
- Hayflick L (1992) *Exp Gerontol* **27**: 363-368
- Sikora E (1993) *Post Biochem* **39**: 212-220
- Seshadri T, Campisi J (1990) *Science* **247**: 205-209
- Riabowol K, Schiff J, Gilman M (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 157-161
- Sikora E, Kamińska B, Radziszewska E, Kaczmarek L (1992) *FEBS Lett* **312**: 179-182
- Richter KH, Afshari CA, Annab LA, Burkhardt BA, Owen RD, Boyd JB, Barrett JC (1991) *Cancer Res* **51**: 6010-6013
- Stein GH, Drullinger LF, Robertorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11012-11016
- Stein GH, Beeson M, Gordon L (1990) *Science* **249**: 666-669
- Weinberg RA (1995) *Cell* **81**: 323-330
- Grzelakowska-Sztabert B (1995) *Kosmos* **44**: 323-352
- Lucibello FC (1993) *J Cell Sci* **105**: 123-133
- Dulić V (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11034-11038

51. McClung JK, Jupe ER, Liu XT, Dell'Orco RT (1995) *Exp Gerontol* **30**: 99-124
52. Wang E, Lin SL (1986) *Exp Cell Res* **167**: 135-143
53. Wang E, Lee M-J, Pandey S (1994) *J Cell Biochem* **54**: 432-439
54. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR (1994) *Exp Cell Res* **211**: 90-98
55. Dimitri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano MM, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith OM, Peacocke M, Campisi J (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9363-9367
56. Jaruga E (1994) *Post Biochem* **40**: 161-165
57. Padney S, Wang E (1995) *J Cell Biochem* **58**: 135-150
58. Wang E, Padney S (1995) *J Cell Physiol* **163**: 155-163
59. Wang E (1995) *Cancer Res* **55**: 2284-2292
60. Reed JC (1994) *J Cell Biol* **124**: 1-6
61. Lane DP (1992) *Nature (Lond)* **358**: 15-16
62. Lane DP (1993) *Nature (Lond)* **362**: 786-787
63. Miyashita T, Harigai M, Hanada M, Reed JC (1994) *Cancer Res* **54**: 3131-3135
64. Shy JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) *Exp Cell Res* **196**: 33-39
65. Kulju K S, Lehman JM (1995) *Exp Cell Res* **217**: 336-334
66. El-Deiry WS, Tokino T, Valculesu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler K W, Vogelstein B (1993) *Cell* **75**: 817-825
67. Gotz C, Montenrah M (1995) *Int J Oncol* **6**: 1129-1135
68. Parker SB, Eichele G, Zhang G, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ (1995) *Science* **267**: 1024-19027
69. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D (1994) *Cancer Res* **54**: 3391-3395

*Artykuł dedykuję Pani Profesor Zofii Zielińskiej,
mojej drogiej, wieloletniej Szefowej.*

Dekarboksylaza ornitynowa jedynym nieubikwitynowanym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy?

Is ornithine decarboxylase a unique non-ubiquitinated protein degraded by the 26S proteasome?

MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. ODC i jej rola w regulacji biosyntezy poliamin
- III. Odkrycie antyzymu jako specyficznego inhibitora ODC
- IV. Rola antyzymu w degradacji ODC
- V. Identyfikacja systemu proteolitycznego czynnego w degradacji ODC
- VI. Struktura ODC a jej degradacja
- VII. Funkcjonalne domeny antyzymu
- VIII. Konstytutywna (podstawowa) i regulowana degradacja ODC
- IX. Degradacja ODC przebiegająca przy udziale antyzymu
- X. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. ODC and its role in the regulation of polyamine biosynthesis
- III. Discovery of antizyme as specific ODC inhibitor
- IV. Role of antizyme in ODC degradation
- V. Identification of proteolytic ODC degrading system
- VI. Relationship between ODC structure and its degradation
- VII. Functional domains of antizyme
- VIII. Constitutive (basal) and regulated ODC degradation
- IX. Model of antizyme-dependent ODC degradation
- X. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: ODC — dekarboksylaza ornitynowa.

I. Wstęp

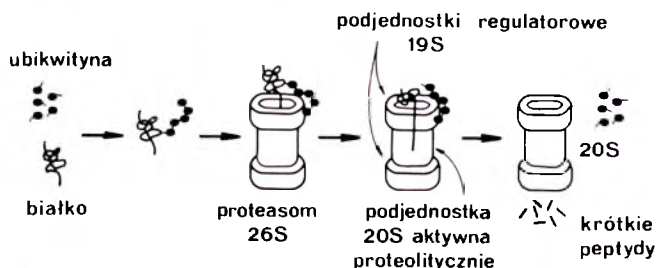
Białka komórkowe pozostają w dynamicznym stanie syntezy i degradacji. Procesy degradacyjne poszczególnych białek odznaczają się wysoką selektywnością i przebiegają z różną szybkością. Tak więc, czas życia białek wewnątrzkomórkowych może się różnić o kilka rzędów wielkości, poczynając od białek regulatorowych degradowanych szybko i w ściśle oznaczonym czasie, do białek strukturalnych często o bardzo

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

długim okresie półtrwania.

W komórkach ssaków wyróżnić można dwa degradacyjne systemy proteolityczne o dokładnie określonych funkcjach tj. system lizosomalny i pozalizosomalny [1]. W lizosomach degradowane są białka zewnątrzkomórkowe dostające się do komórki np. w procesie endo- czy pinocytozy, natomiast lizosomalna degradacja białek wewnątrzkomórkowych zachodzi głównie w czasie stresu np. głodu. Głównym pozalizosomalnym systemem proteolitycznym jest, intensywnie badany w ostatnich latach, zależny od ATP szlak ubikwityna/26S proteasom opisany w licznych pracach przeglądowych [1-8].

Istotnym składnikiem tego szlaku jest ubikwityna* przyłączana kowalencyjnie, z utworzeniem łańcucha multiubikwitynowego, do substratu białkowego w wyniku reakcji kaskadowej, w której biorą udział 3 enzymy (E1, E2 i E3) oraz ATP. Modyfikacja białka przez multiubikwytynację stanowi sygnał do jego degradacji, która zachodzi w 26S proteasomach — wielkich białkowych kompleksach multienzymatycznych (Ryc. 1). Ubikwityna z przyłączonym doń białkiem zostaje rozpoznana i przyłączona do podjednostki regulatorowej kompleksu proteolitycznego 26S proteasomu. Łańcuch białkowy ulega rozfałdowaniu i translokacji do wnętrza cylindrycznej, aktywnej proteolitycznie podjednostki 20S, gdzie jest degradowany do krótkich peptydów. Jednocześnie obserwuje się recykliczację ubikwityny — jej łańcuch zostaje odłączony od proteasomu i rozłożony na pojedyncze cząsteczki, by móc ponownie uczestniczyć w metabolicznym znakowaniu białek mających podlegać degradacji.



Ryc. 1. Hipotetyczny szlak degradacji białka ubikwityna, proteasom (wg [5]).

Proteoliza zależna od ubikwityny/proteasomu nie ogranicza się tylko, jak sądzono do niedawna, do białek uszkodzonych o nieprawidłowej strukturze. Degradacji na tej drodze ulegają również białka strukturalne i konstytutywne, a także enzymy regulujące szlaki biosyntetyczne i białka regulacyjne takie jak np. niektóre czynniki transkrypcyjne, białkowe produkty onkogenów, czy białka cyklu komórkowego [8]. Tym samym degradacja białek jest niezwykle efektywnym sposobem regulacji procesów wewnątrzkomórkowych.

* O strukturze i funkcji ubikwityny pisała U. Piotrowska *Post Biochem* (1993) 39: 8-15

Przykładem enzymu o znaczeniu regulacyjnym jest dekarboksylaza ornitynowa (ODC), będąca jedynym dotychczas znanym białkiem, którego degradacja zachodzi w 26S proteasomach w procesie niezależnym od ubikwityny.

II. ODC i jej rola w regulacji biosyntezy poliamin

Biosynteza poliamin, niskocząsteczkowych, wielofunkcyjnych polikationów obecnych w każdej komórce roślinnej i zwierzęcej, regulowana jest przez ODC [9-12]. W organizmach eukariotycznych ODC jest białkiem niezwykle labilnym, o najkrótszym spośród enzymów ssaków okresie półtrwania [12] (w niektórych tkankach nie przekracza on 5 minut). Umożliwia to precyzyjną i szybką modulację jej stężenia, charakterystyczną dla białek regulatorowych i enzymów regulujących szlaki biosyntetyczne [13]. Istotnie, ODC odpowiada zmianą aktywności na szereg fizjologicznych i nefizjologicznych bodźców [9-11]. Jest również, a może przede wszystkim, zależna od stężenia swoich bezpośrednich (diamina, putrescyna) i pośrednich (poliaminy — spermidyna i spermina) biosyntetycznych produktów. Powyższa regulacja jest formą sprzężenia zwrotnego o unikalnym charakterze, gdzie allosteryczna inhibicja została zastąpiona proteolityczną degradacją. W interakcji tej pośredniczy niezwykle białko regulatorowe o nazwie antyzymu, zapewniające optymalny w danych warunkach fizjologicznych poziom poliamin, związków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki lecz silnie toksycznych w nadmiarze [14]. Regulowana degradacja ODC została przedstawiona w artykułach przeglądowych autorstwa znakomitych znawców przedmiotu [15, 16].

III. Odkrycie antyzymu jako specyficznego inhibitora ODC

Dwudziestoletnią historię badań antyzymu zapoczątkowało odkrycie w 1976 r. w pracowni C a n e l l a k i s a inhibitora ODC, indukowanego przez poliaminy zarówno w komórkach hodowanych *in vitro*, jak i *in vivo* w wątrobie szczura [17, 18]. Inhibitor ten, nazwany przez swoich odkrywców antyzymem ODC jest niewielkim (26.5 kDa), labilnym białkiem. Jego indukcję przez poliaminy hamuje cykloheksomid, lecz nie hamuje aktynomycyna D, zachodzi ona zatem na poziomie posttranskrypcyjnym [17, 18]. Antyzym wykazuje wysokie powinowactwo do ODC i hamuje ją niekompetycyjnie, tworząc enzymatycznie nieaktywny, ale odwracalny kompleks [18, 19]. Odwracalna inhibicja ODC przez antyzym wskazuje, że jako taki nie degraduje on enzymu, a więc nie działa jako proteaza.

Liczne badania prowadzone w latach osiemdziesiątych potwierdziły obecność antyzymu w formie wolnej

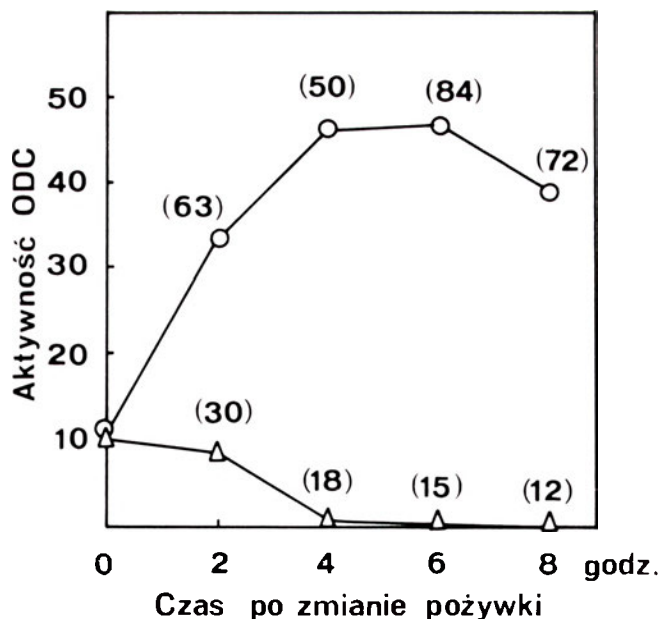
lub związanej w kompleksie z ODC w różnorodnym materiale biologicznym [20-25]. Antyzym znajdowano również w komórkach w nieobecności egzogennych poliamin [20, 22, 24, 25] co sugeruje jego fizjologiczną rolę w regulacji aktywności ODC. Obecnie wiadomo, że antyzym występuje powszechnie w tkankach wyższych *Eukariota*, takich jak ssaki, ptaki i płazy [15]. Antyzym z wątroby szczura oczyszczono do homogenności [26], otrzymano przeciwko niemu monoklonalne przeciwciała [27], co pozwoliło na sklonowanie cDNA, z częściową sekwencją kodującą antyzym (Z1) [28]. Używając go jako sondy sklonowano gen antyzymu szczurzego [29], a następnie gen antyzymu z *Xenopus laevis* [30].

Intrygujący okazał się molekularny mechanizm indukcji antyzymu przez poliaminy. Zwiększonej ilości antyzymu w komórce nie towarzyszy bowiem wzrost stężenia jego mRNA, wskazując, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami [17, 18] na to, że poliaminy indukują antyzym przez stymulację translacji mRNA [28]. mRNA antyzymu kodowany jest w dwóch otwartych ramkach odczytu, zaś poliaminy stymulują jego translację poprzez programowane przesunięcie ramek odczytu [31, 15]. Jest to pierwszy znany przypadek regulacji na tej drodze genów eukariotycznych, dotychczas spotykanej jedynie wśród genów wirusowych [32].

IV. Rola antyzymu w degradacji ODC

Możliwość udziału antyzymu w degradacji ODC rozważali już jego odkrywcy [17]. Przemawiał za nim m.in. fakt, że wywoływane przez poliaminy zarówno spadek aktywności i stężenia białka ODC, jak i indukcja antyzymu hamowane były przez inhibitory syntezy białka, lecz nie RNA [33-36, 17]. Badania prowadzone w nieobecności i obecności egzogennych poliamin potwierdzały, że tworzenie kompleksu ODC z antyzymem skracało czas półtrwania ODC, a zatem przyspieszało degradację enzymu [19, 22].

Bezpośrednich dowodów dostarczyły badania prowadzone na komórkach HTC trwale transfekowanych cDNA antyzymu, Z1, będącego pod kontrolą promotora indukowanego przez glukokortykoidy [37, 38]. W zastosowanym modelu doświadczalnym rozdzielono wpływ antyzymu od wpływu poliamin, bowiem w transfekowanych komórkach ekspresja genu antyzymu Z1 i indukcja jego aktywności następowała po podaniu deksametazonu. Towarzyszyła im szybka degradacja endogennej ODC, o czym świadczył spadek jej aktywności i ilości białka enzymatycznego, oraz skrócenie okresu półtrwania [37, 38]. W komórkach HZ7, w których antyzym po podaniu glukokortykoidu ulegał ekspresji, nie obserwowano po zmianie pożywki typowej indukcji aktywności ODC, lecz jej spadek z równoczesnym skróceniem okresu półtrwania enzymu (Ryc. 2). Towarzyszyło mu obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu putrescyny i spermidyny, oraz



Ryc. 2. Wpływ deksametazonu na indukcję ODC w komórkach HZ7. Pożywka kontrolna (○), pożywka zawierająca (△) 1 μM deksametazon. Czas półtrwania ODC (w min) podano w nawiasach (wg [38]).

zahamowanie wzrostu komórek świadczące o ważkiej, fizjologicznej roli antyzymu w metabolizmie poliamin [38]. Dalszy postęp przyniosło opracowanie i zastosowanie metody oznaczania degradacji ODC *in vitro* w ekstraktach komórek CHO, oraz w lizatach retikulocytów królika lub szczura [39-41]. Użyte ekstrakty różniły się stężeniem endogennego antyzymu; w lizacie retikulocytów było ono wysokie, na co wskazywała wyraźna degradacja ODC zachodząca również pod nieobecność egzogennego antyzymu [41]. W ekstrakcie komórek CHO egzogenny, oczyszczony antyzym stymulował degradację ODC, która osiągała najwyższy poziom gdy stosunek antyzym/ODC zbliżał się do 1 [39]. Antyzym indukowany był przez spermidynę dodaną do pożywki, w której rosły komórki CHO, czemu towarzyszyła zwiększona degradacja ODC [40]. Natomiast spermidyna dodana *in vitro*, bezpośrednio do mieszaniny degradacyjnej nie wywierała żadnego wpływu [39]. Ponadto wykazano, że przeciwciała skierowane przeciwko antyzymowi hamowały degradację ODC [40].

Powyższe badania, dzięki zastosowaniu ściśle kontrolowanych warunków degradacji ODC *in vitro*, umożliwiły nie tylko wykazanie udziału i roli antyzymu w tym procesie, ale także ustalenie rodzaju czynnego układu proteolitycznego (patrz rozdz. V).

V. Identyfikacja systemu proteolitycznego czynnego w degradacji ODC

Udział w proteolizie ODC lizosomów oraz kalpain, proteaz pozalizosomalnych zależnych od wapnia, wykluczono w badaniach przeprowadzonych z użyciem różnego typu inhibitorów. Związki zmieniające wewnątrzlizosomalne pH, jak również specyficzne inhibito-

ry lizosomalnych proteaz i kalpain nie hamowały degradacji ODC w komórkach chomiczych i mysich [36, 42, 43]. Proces degradacji ODC zależał natomiast od ATP, nie zachodził bowiem w komórkach ssaków i w lizacie retikulocytów w nieobecności ATP, czy układu regenerującego ten nukleotyd, lub w obecności inhibitorów oksydacyjnej fosforylacji [36, 39, 43, 44].

Zależność degradacji ODC od ubikwityny badano przy użyciu komórkowych mutantów termowrażliwych. W mutantach tych, w podwyższonej, niepermissywnej temperaturze, na skutek labilności enzymu E1 aktywującego ubikwitynę, zahamowana była proteoliza zależna od ubikwityny, ale nie degradacja ODC [36, 42]. Niezależność proteolizy ODC od ubikwityny potwierdziły też badania *in vitro* w lizacie retikulocytów zawierającym wszystkie składniki systemu proteolitycznego zależnego od ubikwityny [44]. Usunięcie z lizatu ubikwityny, enzymu E1, czy też wszystkich enzymów (E1, E2, E3) niezbędnych do związania ubikwityny z substratem białkowym nie hamowało degradacji ODC, natomiast całkowicie zapobiegało degradacji lizozymu, który jest przykładem białka degradowanego na drodze zależnej od ubikwityny [44].

26S proteasom, który do tej pory uważano za specyficzny wobec zubikwitynowanych białek, okazał

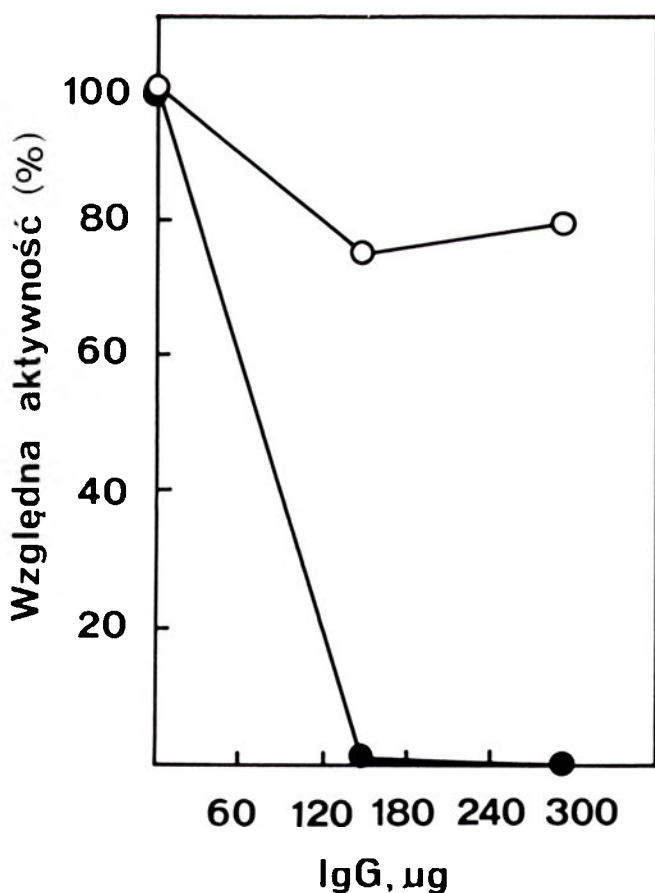
się proteazą degradującą ODC. I tak immunoprecypitacja 26S proteasomu z ekstraktu komórek HRC, CHO [43] lub lizatu retikulocytów [41] hamowała zależną od antyzymu i ATP degradację ODC (Ryc. 3), a rekonstrukcja systemu degradacyjnego następowała po dodaniu oczyszczonego, aktywnego preparatu 26S proteasomu [43]. Podobnie w lizacie retikulocytów degradacja ODC przebiegała efektywnie we frakcji zawierającej 26S proteasom, a hamowało ją przeciwciało specyficzne wobec podjednostki C9 wchodzącej w skład kompleksu 26S proteasomu [45]. W ekstrakcie z drożdży i w lizacie retikulocytów królika wyodrębniono 3 kompleksy białkowe (jednostka katalityczna 20S i 2 podjednostki regulatorowe 19S) składające się na 26S proteasom i wykazano ich niezbędność zarówno dla zależnej od antyzymu degradacji ODC, jak i zależnej od ubikwityny degradacji RNazy [46]. Ostatnio udało się zrekonstruować system degradujący ODC *in vitro*, który składał się z oczyszczonej ODC z komórek CHO, oczyszczonego 26S proteasomu z wątroby szczura i rekombinanta antyzymu [47]. W tym układzie, w obecności ATP, ODC ulegała endoproteolizie z utworzeniem krótkich 5-11 aminokwasowych peptydów [47].

Przedstawiony wybór prac pochodzi głównie z dwóch znanych ośrodków — japońskiego i izraelskiego, specjalizujących się w problematyce degradacji ODC zależnej od antyzymu i degradacji białek na szlaku ubikwityna/proteasom. Dostarczyły one przekonujących dowodów na to, że zależna od ATP i antyzymu nielizosomalna degradacja ODC zachodzi bez udziału ubikwityny w kompleksie proteolitycznym 26S proteasomu.

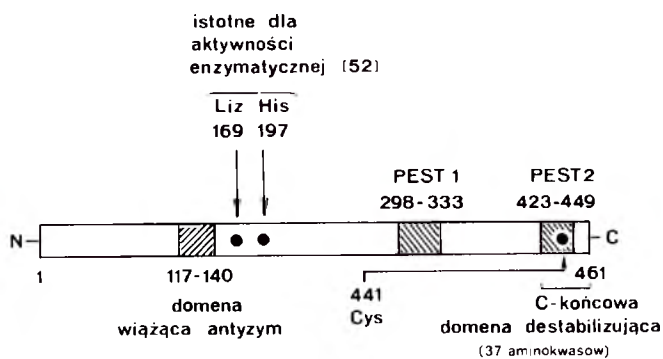
VI. Struktura ODC a jej degradacja

Strukturalne elementy ODC, od których zależy jej wewnątrzkomórkowa degradacja i rolę jaką w niej gra antyzym poznano w dużej mierze dzięki kolejnym pracom Coffino i w s p. [48-52]. Punktem wyjścia były badania porównawcze dotyczące właściwości i struktury ODC z komórek gryzoni i pasożyta *Trypanosoma brucei*. Obydwa enzymy były homodimerami, a różnice sekwencji monomerów dotyczyły głównie niewielkiego odcinka C-końcowego, który nie występował w enzymie z *Trypanosoma*. Właściwości enzymatyczne obydwu ODC były zbliżone, enzymy te różniły się natomiast zasadniczo stabilnością; ODC z *Trypanosoma*, w przeciwieństwie do mysiej ODC, była enzymem stabilnym, nieregulowanym przez poliaminy. Jako modelu doświadczalnego użyto zmutowane komórki CHO pozbawione endogennej aktywności ODC. Transfekowano je plazmidami zawierającymi DNA kodujące ODC o odpowiedniej strukturze a następnie badano aktywność, interakcję z antyzymem i szybkość degradacji genetycznie zmienionej ODC.

Stwierdzono, że odcinkiem odpowiedzialnym za szybką degradację mysiej ODC jest jej domena C-



Ryc. 3. Wpływ immunoprecypitacji proteasomu na degradację ODC w lizacie retikulocytów. Do lizatu szczurzych retikulocytów dodawano immunoglobulinę (IgG) kontrolną (○), lub przeciwciało specyficzne wobec proteasomu (●) i badano degradację oczyszczonej, egzogennej [³⁵S] ODC. Za 100% aktywności przyjęto degradację ODC w nieobecności dodanego przeciwciała (wg [41]).



Ryc. 4. Struktura monomeru mysiej ODC z zaznaczonymi domenami funkcjonalnymi. Mysia ODC jest homodimerem, którego podjednostki zbudowane są z 461 aminokwasów. W skład każdego z dwóch miejsc związanych z aktywnością enzymatyczną wchodzi aminokwasy położone na obu podjednostkach; dysocjacji dimeru na monomery (np. pod wpływem wysokiego stężenia soli) towarzyszy utrata aktywności ODC [26]. W każdym monomerze wyróżnić można 2 regiony PEST (bogate w prolinę, P, kwas glutaminowy, E, serynę, S, treoninę, T), które zgodnie z hipotezą PEST mają odgrywać istotną rolę w degradacji krótko żyjących białek [58]. Tylko drugi region PEST leży w domenie odpowiedzialnej za degradację ODC. Antyzym ma również 1 region PEST, ale nie jest on związany z żadną domeną funkcjonalną.

końcowa (Ryc. 4), bowiem ODC pozbawiona 37 aminokwasów na C-końcu stawała się białkiem stabilnym przy zachowanej w pełni aktywności katalitycznej [48, 53].

Znaczenie regionu C-terminalnego dla szybkości degradacji ODC potwierdziły też badania prowadzone zarówno w lizacie retikulocytów [54], jak i na komórkach HMO_A, w których przyczyną stwierdzanej stabilności ODC okazała się zamiana tylko jednego aminokwasu (Cys 441 → Trp) położonego w tym rejonie [55].

Ostatnio stwierdzono różnice w sekwencji nukleotydowej cDNA ODC otrzymanej z ludzkich tkanek hepatoma i tkanek prawidłowych tego samego pacjenta [56]. Po translacji w lizacie retikulocytów otrzymano zmutowaną ODC krótszą o blisko 50 aminokwasów C-końcowych. Białko to było stabilne w systemie degradacyjnym zależnym od antyzymu i ATP, co może tłumaczyć wysoką aktywność ODC znajdowaną w badanych tkankach nowotworowych [56].

Mysia ODC wiązała się z antyzymem *in vitro*, natomiast w przypadku enzymu z *Trypanosoma* nie stwierdzono takiej interakcji [49]. Aby zlokalizować region odpowiedzialny za wiązanie antyzymu przez mysia ODC skonstruowano metodami inżynierii genetycznej szereg białek — chimer, zbudowanych z ODC mysiej i *Trypanosoma*. Mysia ODC, w której zastąpiono odcinek pomiędzy 117 a 140 aminokwasem na odpowiadający mu region ODC pasożyta nie wiązała antyzymu i nie była przez niego hamowana, a w badaniach *in vivo* nie była regulowana przez egzogenne poliaminy. Zatem ten region mysiej ODC był odpowiedzialny za wiązanie antyzymu [49].

Interakcja ODC z antyzymem jest warunkiem niezbędnym, lecz nie wystarczającym do tego aby zachodziła degradacja ODC. Dobrym tego przykładem była chimera zbudowana z N końcowych 315 amino-

kwasów ODC mysiej i C-końca ODC z *Trypanosoma* [51]. Białko to wiązało antyzym i było przez niego hamowane, lecz nie ulegało degradacji na skutek braku wspomnianych sekwencji C-końcowych charakterystycznych dla mysiej ODC [51]. Podobnie zachowywał się, badany w lizacie retikulocytów, mutant ODC, Del-6, pozbawiony C terminalnego odcinka aminokwasowego [54].

Stabilność ODC z *Trypanosoma brucei* wynika, jak wykazano ostatnio, nie tylko z budowy tego białka, ale również z braku antyzymu i z obecności czynników inhibitorowych w komórkach pasożyta [57]. Mysia ODC, która ulegała ekspresji w *Trypanosoma* była bowiem całkowicie stabilna, a szczurzy antyzym hamował jej aktywność, lecz nie indukował degradacji [57].

VII. Funkcjonalne domeny antyzymu

Podobnie jak ODC, również cząsteczka antyzymu okazała się zróżnicowaną funkcjonalnie. W badaniach prowadzonych przez trzy niezależne zespoły badaczy, znaleziono przy użyciu strukturalnych mutantów antyzymu (otrzymanych w wyniku ekspresji cDNA antyzymu z delecjami w ściśle określonych regionach), dwie różniące się funkcjonalnie domeny w jego cząsteczce [52, 54, 59]. C-terminalna i środkowa część cząsteczki antyzymu była odpowiedzialna za wiązanie ODC, a także jej inaktywację i zmiany konformacyjne, lecz nie za indukcję degradacji. Do destabilizacji ODC niezbędny był dodatkowy, wewnętrzny region, którego szczegółowa funkcja nie została dotychczas wyjaśniona [52, 54, 59].

Przedstawione badania wskazują, że inaktywacja ODC i jej degradacja zależą od odpowiednich domen zarówno w cząsteczce ODC jak i antyzymu. Inaktywacja wymaga obecności specyficznych miejsc wiążących — ODC w cząsteczce antyzymu i antyzymu w cząsteczce ODC. Natomiast degradacja zależy od C-końcowego destabilizującego segmentu ODC, oraz od specyficznego segmentu antyzymu, różnego od miejsca wiążącego ODC.

VIII. Konstytutywna (podstawowa) i regulowana degradacja ODC

W zależności od warunków w jakich znajduje się komórka, Coffino i wsp. rozróżniali dwa typy degradacji proteolitycznej, którym może ulegać ODC [48-51]. Degradacja konstytutywna (podstawowa) była związana z niestabilnością białka ODC jako takiego, podczas gdy degradacji regulowanej, zależnej od antyzymu, ulegała ODC w komórkach traktowanych egzogennymi poliaminami. Starano się znaleźć regiony cząsteczki ODC odpowiedzialne za określony typ degradacji, zadając jednocześnie pytanie, czy szlaki degradacji konstytutywnej i regulowanej są zbieżne, czy też w pełni niezależne [51].

Inna grupa badaczy, stosując układ degradacyjny

lizatu retikulocytów wykazała, że *in vitro* mechanizm degradacji podstawowej i regulowanej jest taki sam i zależy od antyzymu [54]. Na tej podstawie zaproponowano model ogólnej degradacji ODC, który będzie musiał być jeszcze jednak potwierdzony w badaniach z użyciem nieuszkodzonych komórek. Zgodnie z tym modelem degradacja podstawowa ODC zachodzi przy udziale endogennego antyzymu i jest przyspieszana przez egzogeny antyzym [54], który można zatem nazwać mediatorem destrukcji ODC.

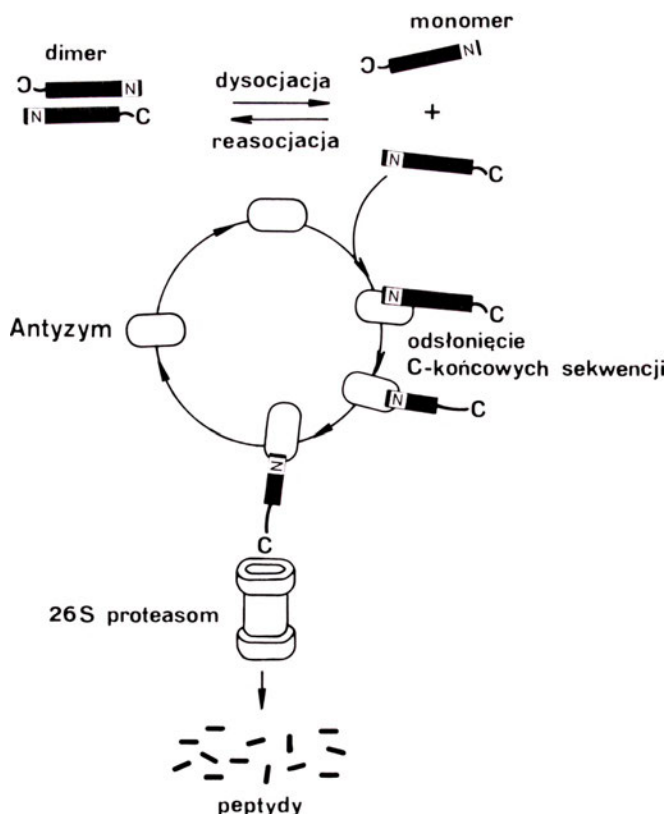
Problem podstawowej i regulowanej degradacji ODC i udziału w obu tych procesach antyzymu jest kontrowersyjny i pozostaje otwarty. Badacze zgodni są natomiast co do sekwencji wydarzeń prowadzących do degradacji ODC przy udziale antyzymu (patrz rozdz. IX).

IX. Degradacja ODC przebiegająca przy udziale antyzymu

Zgodnie z proponowaną hipotezą o zależnej od antyzymu degradacji ODC proces ten przebiega dwuetapowo [51, 52, 54, 15]. Pierwszy etap, odwracalny, zapoczątkowuje związanie antyzymu z ODC poprzez specyficzne sekwencje wiążące obecnie zarówno w cząsteczce ODC jak i antyzymu (Ryc. 5). Połączone jest to ze znikaniem dimerów ODC i pojawianiem nieaktywnych katalitycznie monomerów ściśle połączonych z antyzymem. Szybka wymiana podjednostek pomiędzy dimerami ODC, stwierdzana także w warunkach fizjologicznych [60], ułatwiać może wiązanie z antyzymem i przemawia za tym, że antyzym nie powoduje aktywnej dysocjacji homodimerów, ale raczej oddziałuje z monomerami, które są z nimi w równowadze. Interakcja z antyzymem indukuje zmiany konformacyjne monomeru ODC, w wyniku których następuje odsłonięcie, uprzednio niedostępnych, C-terminalnych sekwencji destabilizacyjnych. Ich zablokowanie przez specyficzne przeciwciała zapobiegało degradacji ODC [51]. Odsłonięcie ukrytej domeny C-końcowej ODC umożliwia drugi, już nieodwracalny etap, czyli zależną od ATP właściwą degradację proteolityczną przez 26S proteasomy. Zależy ona, jak powiedziano, również od specyficznej, różnej od regionu wiążącego, domeny antyzymu o nieznanym dotychczas funkcji. Można domniemywać [52], że domena ta bezpośrednio, lub pośrednio przez inne elementy komórkowe, ułatwia tworzenie kompleksu z podjednostką regulatorową 26S proteasomu, aktywuje ją lub też zmienia jej specyficzność. W czasie degradacji ODC cząsteczki antyzymu zostają uwolnione i ulegają recyklicacji, wiążąc się z następnymi monomerami ODC [54].

X. Uwagi końcowe

Na postawione w tytule pytanie — czy ODC jest jedynym białkiem degradowanym przez 26S proteasomy bez udziału ubikwityny — należy na obecnym stanie naszej wiedzy odpowiedzieć twierdząco. Nie-



Ryc. 5. Hipotetyczny przebieg zależnej od antyzymu degradacji ODC przez 26S proteasomy (wg [15], zmodyfikowany).

rzadka jest jednak opinia, że ODC nie jest pod tym względem białkiem unikalnym, a znalezienie innych jest tylko kwestią czasu [15, 46].

Niezwykle interesująca, nie do końca poznana, jest funkcja 26S proteasomu, który okazał się multikompleksem proteolitycznym zdolnym do degradacji białek zarówno na szlaku zależnym jak i niezależnym od ubikwityny. Równie intrygująca jest rola antyzymu; nie wiadomo czy uczestniczy on aktywnie w połączeniu kompleksu antyzym-ODC z proteasomem, czy tylko oddziałuje pośrednio poprzez zmiany konformacji ODC. Nie znane, zapewne inne niż w przypadku ubikwityny, jest też białko podjednostki regulatorowej proteasomu, które uczestniczy w tym wiązaniu. Funkcję antyzymu przyrównuje się czasem do onkobiałka E6 z wirusa brodawczaka ludzkiego, które uczestniczy w degradacji białka p53 na etapie poprzedzającym jego ubikwitynację [43, 52, 54].

Należy dodać, że degradacja ODC nie jest jedynym procesem komórkowym kontrolowanym przez antyzym, który okazał się białkiem polifunkcyjnym. Niedawno potwierdzono udział antyzymu w innym, obok modulacji biosyntezy poliamin procesie, a mianowicie w negatywnej regulacji ich transportu [61, 62, 14]. W ten sposób to niezwykle białko regulatorowe zapobiega nadmiarowi poliamin w komórce kontrolując dwa niezależne procesy — biosyntezę poliamin i ich transport.

Sugeruje się ponadto możliwość oddziaływania antyzymu nie tylko z ODC i transporterem poliamin, ale z innymi jeszcze częściowo tylko zidentyfikowanymi

białkami docelowymi [51]. Do grupy białek wiążących się z antyzymem należy tzw. inhibitor antyzymu, wykazujący wyższe niż ODC powinowactwo do antyzymu, o niejasnej funkcji fizjologicznej. Inhibitor antyzymu z wątroby szczura oczyszczony do homogenności [63] okazał się, podobnie jak ODC, homodimerem o krótkim okresie półtrwania. Białko to, wiążąc się z antyzymem, zastępuje ODC w kompleksie ODC-antyzym i całkowicie odwraca zahamowanie aktywności ODC przez antyzym [41]. Wychwytywanie antyzymu przez jego inhibitor sugeruje, że może być on białkiem regulatorowym stabilizującym ODC [64].

Ostatnie lata, dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej, przyniosły ogromny postęp w badaniach mechanizmu molekularnego regulowanej degradacji ODC, a także struktury i funkcji układów degradujących białka komórkowe. Nasza ciągle niepełna wiedza na ten temat wskazuje na złożoność badanych zjawisk i ich fizjologiczne znaczenie dla homeostazy poliamin w komórce.

Artykuł otrzymano 17 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

- Ciechanover A (1994) *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375**: 565-581
- Ciechanover A (1994) *Cell* **79**: 13-21
- Peters JM (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 377-381
- Jennissen HP (1995) *Eur J Biochem* **231**: 1-30
- Jentsch S, Schlenker S (1995) *Cell* **82**: 881-884
- Muller S, Schwartz LM (1995) *BioEssays* **17**: 677-684
- Wójcik C (1995) *Post Biol Kom* **22**: 295-315
- Deshaies RJ (1995) *Trends Cell Biol* **5**: 428-434
- Tabor CW, Tabor H (1984) *Ann Rev Biochem* **53**: 749-790
- Canellakis ES, Viceps-Madere D, Kyriakidis DA, Heller JS (1979) *Curr Top Cell Reg* **15**: 155-202
- Pegg AE, McCann PP (1982) *Am J Physiol* **243**: 212-221
- Pegg AE (1986) *Biochem J* **234**: 249-262
- Dice F (1990) *Semin Cell Biol* **1**: 411-413
- Suzuki T, He Y, Kashiwagi K, Murakami Y, Hayashi S, Igarashi K (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8930-8934
- Hayashi S, Murakami Y (1995) *Biochem J* **306**: 1-10
- Hayashi S, Murakami A, Matsufuji S (1996) *TIBS* **21**: 27-30
- Heller JS, Fong WF, Canellakis ES (1976) *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 1858-1862
- Fong WF, Heller JS, Canellakis ES (1976) *Biochim Biophys Acta* **428**: 456-465
- Murakami Y, Fujita K, Kameji T, Hayashi S (1985) *Biochem J* **225**: 689-697
- Fujita K, Matsufuji S, Murakami Y, Hayashi S (1984) *Biochem J* **218**: 557-562
- Linden M, Anehus S, Långström E, Baldetorp B, Heby O (1985) *J Cell Physiol* **125**: 273-276
- Murakami Y, Hayashi S (1985) *Biochem J* **226**: 893-896
- Laitinen P, Hietala OA, Pulkka AE, Pajunen AEI (1986) *Biochem J* **236**: 613-616
- Hu YW, Brosnan ME (1987) *Arch Biochem Biophys* **254**: 637-641
- Murakami Y, Marumo M, Hayashi S (1988) *Biochem J* **254**: 367-372
- Kitani T, Fujisawa H (1984) *J Biol Chem* **259**: 10036-10040
- Matsufuji S, Kanamoto R, Murakami Y, Hayashi S (1990) *J Biochem (Tokyo)* **107**: 87-91
- Matsufuji S, Miyazaki Y, Kanamoto R, Kameji T, Murakami Y, Baby TG, Fujita K, Ohno T, Hayashi S (1990) *J Biochem (Tokyo)* **108**: 365-371
- Miyazaki Y, Matsufuji S, Hayashi S (1992) *Gene* **113**: 191-197
- Ichiba T, Matsufuji S, Miyazaki Y, Hayashi S (1995) *Biochim Biophys Acta* **1262**: 83-86
- Matsufuji S, Matsufuji T, Miyazaki Y, Murakami Y, Atkins JF, Gesteland RF, Hayashi S (1995) *Cell* **80**: 51-60
- Atkins JF, Weiss RB, Gesteland RF (1990) *Cell* **62**: 413-423
- Mitchell JLA, Mahan DW, McCann PP, Qasba P (1985) *Biochim Biophys Acta* **840**: 309-316
- Kanamoto R, Utsunomiya K, Kameji T, Hayashi S (1986) *Eur J Biochem* **154**: 539-544
- Hölttä E, Pohjanpelto P (1986) *J Biol Chem* **261**: 9502-9508
- Rosenberg-Hasson Y, Bercovich Z, Ciechanover A, Kahana C (1989) *Eur J Biochem* **185**: 469-474
- Murakami Y, Matsufuji S, Miyazaki Y, Hayashi S (1992) *J Biol Chem* **267**: 13138-13141
- Murakami Y, Matsufuji S, Miyazaki Y, Hayashi S (1994) *Biochem J* **304**: 183-187
- Murakami Y, Tanaka K, Matsufuji S, Miyazaki Y, Hayashi S (1992) *Biochem J* **283**: 661-664
- Kanamoto R, Kameji T, Iwashita S, Igarashi K, Hayashi S (1993) *J Biol Chem* **268**: 9393-9399
- Murakami Y, Matsufuji S, Tanaka K, Ichihara A, Hayashi S (1993) *Biochem J* **295**: 305-308
- Glass JR, Gerner EW (1987) *J Cell Physiol* **130**: 133-141
- Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1992) *Nature (Lond)* **360**: 597-599
- Bercovich Z, Rosenberg-Hasson Y, Ciechanover A, Kahana C (1989) *J Biol Chem* **264**: 15949-15952
- Bercovich Z, Kahana C (1993) *Eur J Biochem* **213**: 205-210
- Elias S, Bercovich B, Kahana C, Coffino P, Fischer M, Hilt W, Wolf DH, Ciechanover A (1995) *Eur J Biochem* **229**: 276-283
- Tokunaga F, Goto T, Koide T, Murakami Y, Hayashi S, Tamura T, Tanaka K, Ichihara A (1994) *J Biol Chem* **269**: 17382-17385
- Ghoda L, Van Daalen Wetters T, Macrae M, Ascherman D, Coffino P (1989) *Science* **243**: 1493-1495
- Li X, Coffino P (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 3556-3562
- Ghoda L, Sidney D, Macrae M, Coffino P (1992) *Mol Cell Biol* **12**: 2178-2185
- Li X, Coffino P (1993) *Mol Cell Biol* **13**: 2377-2383
- Li X, Coffino P (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 87-92
- Lu L, Stanley BA, Pegg AE (1991) *Biochem J* **277**: 671-675
- Mamroud-Kidron E, Omer-Itsicovich M, Bercovich Z, Tobias KE, Rom E, Kahana C (1994) *Eur J Biochem* **226**: 547-554
- Miyazaki Y, Matsufuji S, Murakami Y, Hayashi S (1993) *Eur J Biochem* **214**: 837-844
- Tamori A, Nishiguchi S, Kuroki T, Koh N, Kobayashi K, Yano Y, Otani S (1995) *Cancer Res* **55**: 3500-3503
- Hua SB, Li X, Coffino P, Wang CC (1995) *J Biol Chem* **270**: 10264-10271
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) *Science* **234**: 364-368
- Ichiba T, Matsufuji S, Miyazaki Y, Murakami Y, Tanaka K, Ichihara A, Hayashi S (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 1721-1727
- Coleman CS, Stanley BA, Viswanath R, Pegg AE (1994) *J Biol Chem* **269**: 3155-3158
- Mitchell JLA, Judd GG, Bareyal-Leyser A, Ling SY (1994) *Biochem J* **299**: 19-22
- He Y, Suzuki T, Kashiwagi K, Igarashi K (1994) *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 608-614
- Kitani T, Fujisawa H (1989) *Biochim Biophys Acta* **991**: 44-49

Addendum

Po złożeniu niniejszej pracy do druku, w lutym 1996, ukazały się dwie istotne publikacje — o sklonowaniu inhibitora antyzymu z serca szczura [1], oraz o funkcjonalnej roli domeny antyzymu położonej w pobliżu N-końca (NAZ) [2]. NAZ połączony kowalencyjnie z ODC, a także szfuz-

Piśmiennictwo

1. Murakami Y, Ichiba T, Matsufuji S, Hayashi S (1996) *J Biol Chem* **271**: 3340-3342
2. Li X, Stebbins B, Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M, Coffino P (1996) *J Biol Chem* **271**: 4441-4446

*Pani Profesor Zofii Zielińskiej
z najlepszymi życzeniami.*

Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów

Cross-talk between transcription factors AP-1 and NFAT in the regulation of gene expression

BOŻENA KAMIŃSKA¹
GRAŻYNA MOSIENIAK²
MARTA WIŚNIEWSKA³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura i mechanizm działania kompleksu transkrypcyjnego AP-1
 - II-1. Budowa kompleksu AP-1
 - II-2. Domeny funkcjonalne białek Fos i Jun
 - II-3. Mechanizm regulacji transkrypcji przez kompleks AP-1
- III. Skład kompleksu AP-1 a jego właściwości biochemiczne
- IV. Zróżnicowanie składu kompleksu AP-1 *in vivo*
- V. Struktura i funkcja kompleksu transkrypcyjnego NFAT
 - V-1. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFAT
 - V-2. Składniki cytoplazmatyczne kompleksu NFAT i ich tkankowo-specyficzna ekspresja
- VI. Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów
 - VI-1. Oddziaływanie białka NFATp z promotorami różnych genów
 - VI-2. Tworzenie funkcjonalnego kompleksu NFAT
 - VI-3. Rola składników kompleksu NFAT w regulacji ekspresji genów
 - VI-4. Skład kompleksu NFAT *in vivo*
- VII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and mechanism of action of the AP-1 transcription complex
 - II-1. Structure of the AP-1 complex
 - II-2. Functional domains of Fos and Jun proteins
 - II-3. Mechanism of transcription regulation by AP-1 complex
- III. Composition of the AP-1 complex and its biochemical properties
- IV. Diversity of the AP-1 composition *in vivo*
- V. Structure and function of the NFAT transcription factor
 - V-1. Activation of the NFAT transcription factor
 - V-2. Cytoplasmic components of the NFAT transcription complex and their tissue-specific distribution
- VI. Cooperation of the AP-1 and NFAT transcription factors in the regulation of gene expression
 - VI-1. Interaction of the NFATp transcription factor with different promoters
 - VI-2. Formation of the functional NFAT complex
 - VI-3. Function of NFAT components in regulation of gene expression
 - VI-4. Composition of the NFAT complex *in vivo*
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: AP-1 — ang. *activator protein-1*, białko aktywatorowe 1; CREB — ang. *cyclic AMP-responsive element binding protein*, białko wiążące się z sekwencją CRE; GM-CSF — ang. *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*, czynnik wzrostu kolonii granulocy-

¹ Dr, ^{2,3} mgr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

tów/makrofagów; INF — interferon; IL2 — interleukina 2; IP3 — trisfosforan inozytolu; NFAT — ang. *nuclear factor of activated T cells*, białko jądrowe z aktywowanych limfocytów T; NFκB — ang. *nuclear factor of kappa chain B cells*, czynnik transkrypcyjny łańcuchów *kappa* limfocytów B; PMA — ester forbolu; PHA — fitohemaglutynina; PKC — kinaza białkowa C; RHR — ang. *Rel homology region*, rejon homologii z białkiem Rel; TBP — ang. *TATA box binding protein*, białko wiążące się z sekwencją TATA; TCR — ang. *T-cell receptor*, receptor limfocytów T; TFII D — ang. *transcription factor II D*, czynnik transkrypcyjny II D; TNF — ang. *tumor necrosis factor*, czynnik nekrozy nowotworu; TRE — ang. *TPA responsive element*, sekwencja regulowana przez TPA.

I. Wstęp

Aktywacja transkrypcji genów eukariotycznych w odpowiedzi na sygnały zewnątrzkomórkowe wymaga tworzenia wieloskładnikowych kompleksów transkrypcyjnych w obszarach regulatorowych genów. Złożona natura procesu ma duże znaczenie biologiczne, gdyż stwarza nieograniczone możliwości regulacji i zapewnia bezbłędną (przynajmniej teoretycznie) kontrolę ekspresji genów. Aby polimeraza RNA II zainicjowała transkrypcję, w obrębie promotora musi powstać kompleks około 20 białek. Kluczową rolę odgrywają w tym procesie białka specyficznie wiążące się z sekwencjami regulatorowymi genów i umożliwiające inicjację transkrypcji w miejscu startu syntezy mRNA danego genu. W skład podstawowego kompleksu transkrypcyjnego wchodzi czynniki: TFII D (TBP), A, B, F, E i H przyłączające się w określonej kolejności i kierujące polimerazę RNA II do miejsca startu transkrypcji [1].

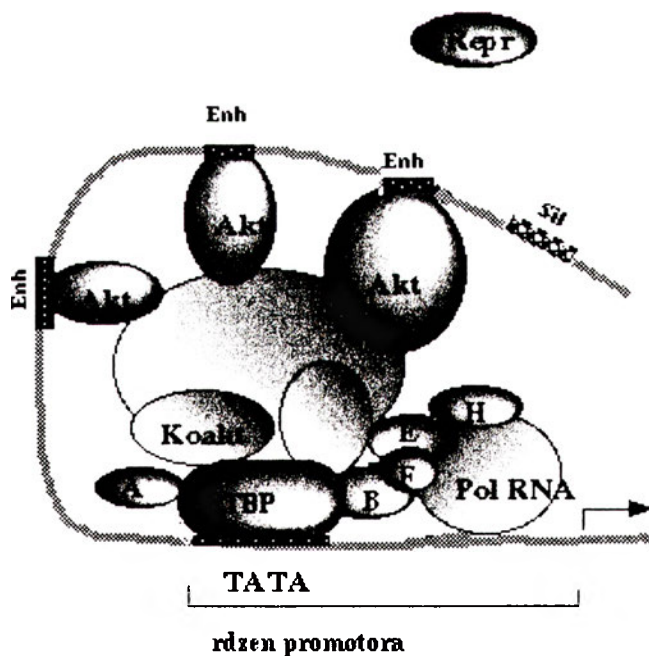
Jednakże taki podstawowy zestaw białek, występujący we wszystkich komórkach, aczkolwiek niezbędny w procesie syntezy RNA, kieruje transkrypcją na niskim i niezmiennym poziomie. O indukowalnej i tkankowo-specyficznej ekspresji genów, odpowiedzialnej za zróżnicowanie komórek i tkanek organizmu, decydują indukowalne czynniki transkrypcyjne. Te tkankowo-specyficzne lub indukowalne białka mogą działać jako aktywatory lub represory transkrypcji wiążąc się z obszarami regulatorowymi, często znacznie oddalonymi od miejsca startu transkrypcji [1]. Zwykle obszary regulatorowe genów mają szereg miejsc dla różnych czynników transkrypcyjnych i dopiero właściwa ich kombinacja sprawia, że gen ulega ekspresji. Synergistyczne bądź antagonistyczne oddziaływania pomiędzy składnikami „maszyny transkrypcyjnej” determinują swoistość i poziom ekspresji (Ryc. 1). Wśród indukowalnych czynników transkrypcyjnych szczególną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny AP-1, który działa jako „molekularny włącznik” indukujący długoterminowe zmiany fenotypu komórek. Indukcję czynnika AP-1 bądź genów kodujących jego składniki obserwowano w komórkach indukowanych do proliferacji, różnicowania [2], programowanej śmierci oraz w trakcie pobudzenia komórek ner-

wowych przez bodźce elektryczne bądź chemiczne [3]. Przedmiotem artykułu będą oddziaływania białek w obrębie czynnika AP-1 oraz jego współdziałanie z czynnikiem transkrypcyjnym NFAT stanowiące dobrą ilustrację złożoności mechanizmów kontrolujących ekspresję genów eukariotycznych.

II. Struktura i mechanizm działania kompleksu transkrypcyjnego AP-1

II-1. Budowa kompleksu AP-1

Czynnik transkrypcyjny AP-1 (ang. *activator protein-1*) został zidentyfikowany jako białko jądrowe wiążące się z sekwencją regulatorową w promotorze genu metalotioneiny IIa i regulujące aktywność tego promotora *in vitro* i *in vivo* [4-5]. Niedługo potem miejsce wiązania czynnika AP-1 zidentyfikowano jako element odpowiadający na TPA, ester forbolu, stąd określenie TRE (ang. *TPA responsive element*). Sekwencję tę znaleziono w genach, których ekspresja była indukowana w komórkach pod wpływem estrów forbolu, kodujących kolagenazę, metalotioneinę IIa, stromielizynę, interleukinę 2 [5]. Porównanie sekwencji TRE z różnych genów pozwoliło na ustalenie sekwencji, z którą wiąże się czynnik AP-1. Jest to palindromiczna sekwencja: 5'-TGAG/CTCA-3' określana mianem TRE albo AP-1 (zarówno czynnik jak



Ryc. 1. Schemat aktywnego kompleksu transkrypcyjnego zawierającego podstawowe i indukowalne czynniki transkrypcyjne. Czynniki transkrypcyjne wchodzące wraz z polimerazą RNA II (pol RNA) w skład podstawowego aparatu transkrypcyjnego oznaczone są literami A, B, E, F, H. TBP — białka wiążące się z sekwencją TATA. Pozostałe oznaczenia to: Akt — aktywatory, białka aktywujące transkrypcję wiążące się z sekwencjami wzmacniaczy (Enh); Repr — represory, białka hamujące transkrypcję wiążące się z sekwencjami wyciszaczy transkrypcji (Sil) oraz Koakt — koaktywatory, białka umożliwiające interakcje między aktywatorami i podstawowym aparatem transkrypcyjnym.

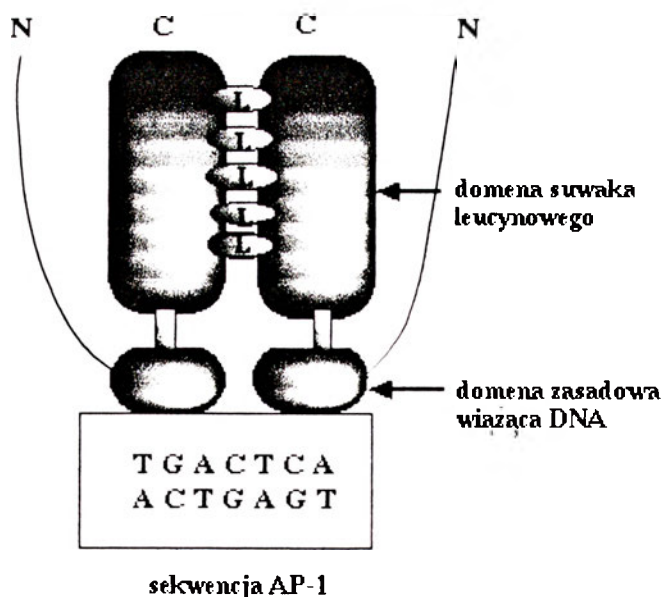
sekwencja noszą tę samą nazwę) [6].

Obecnie wiadomo, że czynnik transkrypcyjny AP-1 jest heterogennym kompleksem, w skład którego wchodzi białka należące do rodziny Fos i Jun. Funkcjonalny kompleks AP-1 jest homo- lub heterodimerem białek Fos i Jun. Do tej pory zidentyfikowano pięć białek Fos: c-Fos, FosB, Delta FosB, Fra 1 i Fra 2 oraz trzy białka Jun: c-Jun, JunB, JunD [7].

II-2. Domeny funkcjonalne białek Fos i Jun

Białka z rodziny Fos i Jun należą do czynników transkrypcyjnych z grupy „bZIP”, tzn. mają domenę zasadową (b-ang. *basic*) wiążącą się z DNA połączoną z domeną dimeryzacji o strukturze „suwaka leucynowego” (ZIP-ang. *leucine zipper*). Struktura ZIP to segmenty α -helisy zawierające 4 do 5 reszt leucynowych oddzielonych od siebie siedmioma resztami aminokwasowymi. Periodyczność rozmieszczenia reszt leucynowych w peptydzie powoduje ustawienie ich w tej samej pozycji rotacyjnej względem osi peptydu. Przyjmuje się, że dimeryzacja białek z motywem ZIP zachodzi dzięki hydrofobowym interakcjom pomiędzy leucynami domen „suwaka leucynowego” dwóch białek (Ryc. 2) [8-9]. Istotność domeny suwaka leucynowego i procesu dimeryzacji białek dla formowania prawidłowego, funkcjonalnego kompleksu AP-1, potwierdzają wyniki analizy delecyjnej genów *fos* i *jun*. Delekcje zaburzające strukturę ZIP znoszą zdolność białek c-Fos i c-Jun do tworzenia dimerów. Mutacje w innych obszarach genów *c-fos* i *c-jun* nie mają takiego wpływu na dimeryzację [9].

Domena odpowiedzialna za dimeryzację białek znajduje się w sąsiedztwie domeny zasadowej uczestniczącej w wiązaniu się białek z DNA. Przyjmuje się, że tworzenie dimeru utrwala i stabilizuje trójwymiarową



Ryc. 2. Struktura czynnika transkrypcyjnego AP-1. Na rycinie zaznaczono położenie domen funkcjonalnych oraz N- i C-końce białek tworzących dimer. L — oznacza resztę leucynową w domenie „suwaka leucynowego”.

strukturę kompleksu utrzymując go we właściwej orientacji przestrzennej wymaganej do wiązania DNA. Z badań stabilności wiązania AP-1 o różnym składzie z DNA wynika, że heterodimery c-Fos/c-Jun wiążą DNA bardziej trwale niż kompleksy zawierające homodimery Jun/Jun [10]. Istnieje ponadto pewna specyficzność w tworzeniu dimerów z białkami mającymi „suwak leucynowy”. Białko c-Fos dimeryzuje z białkami z rodziny Jun, ale nie tworzy homodimerów z białkami Fos oraz z innymi czynnikami transkrypcyjnymi: GCN4, CREB czy Myc [11-13].

Za regulowanie transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny AP-1 odpowiedzialne są domeny transaktywacyjne wchodzących w jego skład białek. Domeny transaktywacyjne białek c-Fos i c-Jun zostały zidentyfikowane przy pomocy analizy delecyjnej kodujących je genów i metody transkrypcji *in vitro* [14] oraz *in vivo* po transfekcji komórek linii F9 w hodowli [15]. Białko c-Jun ma domenę aktywatorową (A1), która jest regulowana przez tkankowo-specyficzny inhibitor oraz domenę regulatorową (δ) [16]. Obie domeny znajdują się w N-końcowej części białka i charakteryzują się występowaniem grup kwaśnych aminokwasów [15]. Dwa rejony białka c-Fos odpowiedzialne są za jego zdolność regulowania transkrypcji, jeden z nich charakteryzujący się występowaniem kwaśnych aminokwasów, który może być aktywatorem i drugi obfitujący w prolinę i kwaśne aminokwasy [14].

II-3. Mechanizm regulacji transkrypcji przez kompleks AP-1

Przyjmuje się, że mechanizm regulacji transkrypcji przez czynnik transkrypcyjny polega na oddziaływaniu czynnika z pewnymi składnikami podstawowego kompleksu inicjującego transkrypcję [1]. Ranson i w s.p. przedstawili dane wskazujące na bezpośrednie oddziaływanie białek c-Fos i c-Jun z białkiem TBP (ang. *TATA box binding protein*) — białkiem wiążącym się z sekwencją TATA, wymaganą do transkrypcji genów przez polimerazę RNA II [17]. Inne białka należące do rodziny Fos: Fos B i Fra 1, mimo iż mają podobną strukturę, nie oddziałują z TBP. Analiza mutacyjna wskazuje, że zarówno region zasadowy jak i domena „suwaka leucynowego” c-Fos i c-Jun są niezbędne do utworzenia stabilnego kompleksu z TBP. Białka c-Fos i c-Jun łączą się z tym samym 51-aminokwasowym rejonem C-końca TBP [17], do którego przyłącza się znane wirusowe białko aktywatorowe E1A [18]. Autorzy sugerują, że białka c-Fos i c-Jun funkcjonują jako aktywatory transkrypcji ułatwiając czynnikowi TBP tworzenie kompleksu, który zainicjuje syntezę RNA.

III. Skład kompleksu AP-1 a jego właściwości biochemiczne

Określono potencjalne kombinacje białek tworzą-

cych kompleks AP-1 na podstawie badań dimeryzacji białek Fos i Jun syntetyzowanych *in vitro*. Szczegółowa analiza właściwości kompleksów składających się z różnych kombinacji białek Fos i Jun, ujawniła subtelne różnice we właściwościach funkcjonalnych kompleksów AP-1.

Chociaż początkowo sądzono, że wszystkie białka Fos i Jun reagują z taką samą sekwencją AP-1 (TRE), stwierdzono, że JunB, w przeciwieństwie do c-Jun, nie aktywuje promotorów z pojedynczym miejscem AP-1, natomiast może aktywować promotory mające szereg miejsc AP-1. Sugeruje to, że transaktywacja przez JunB wymaga interakcji szeregu homodimerów zajmujących sąsiednie miejsca [19].

Stabilność wiązania kompleksów AP-1 różni się w zależności od jego składu białkowego. Heterodimery Fos/Jun wiążą DNA bardziej stabilnie niż homodimery Jun/Jun. W grupach homodimerów stabilność wiązania kompleksu AP-1 z DNA zmienia się następująco w zależności od obecności poszczególnych białek:

— białka Fos: FosB > Fra1 > c-Fos

— białka Jun: c-Jun > JunD > JunB [20].

Skład podjednostkowy kompleksu AP-1 może też determinować jego aktywność transkrypcyjną. JunB nie aktywuje promotorów z pojedynczym miejscem AP-1 mimo że się z nimi wiąże. Wiążąc się z miejscem AP-1, ale nie aktywując transkrypcji, JunB uniemożliwia działanie innych białek Jun, był więc ich negatywnym regulatorem. Także białka Fos mają swój negatywny regulator komórkowy. Nakaabeppu i Nathans [21] opisali naturalnie występujące białko FosB (delta FosB) krótsze od normalnego FosB o 101 aminokwasów (ang. *truncated FosB*). Delta FosB zachowuje zdolność do dimeryzacji i wiązania DNA, ale nie może aktywować transkrypcji. W ten sposób delta FosB może współzawodniczyć z innymi białkami i uniemożliwiać im interakcje z miejscami AP-1.

IV. Zróznicowanie składu kompleksu AP-1 *in vivo*

Teoretycznie istnieje szereg kombinacji, które mogą tworzyć pomiędzy sobą białka Fos i Jun i szereg z nich uzyskano i analizowano w badaniach nad białkami syntetyzowanymi *in vitro*. Nie oznacza to jednak, że wszystkie kombinacje obserwowane *in vitro* są rzeczywiście tworzone w komórkach *in vivo*. Są dane wskazujące na istnienie aktywnych homodimerów Jun. Transfekcja komórek teratocarcinoma linii F9 (w których nie ma ekspresji c-Fos i pokrewnych białek) wektorem ekspresyjnym z c-Jun, pobudza transkrypcję genu markerowego, zależnego od AP-1 [7]. Oznacza to, że w komórkach F9 dochodzi do tworzenia aktywnego transkrypcyjnie kompleksu c-Jun/c-Jun. Podobne wyniki uzyskano dla JunB i JunD [19, 21].

Uzyskanie danych o realnym składzie kompleksu AP-1 w określonych sytuacjach fizjologicznych stało

się możliwe wraz z pojawieniem się przeciwciał swoiście rozpoznających poszczególne białka Fos i Jun. Stosuje się m.in. metodę „supershift”, pozwalającą określać skład białkowy kompleksu AP-1. Metoda polega na preinkubacji ekstraktów białkowych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko poszczególnym białkom. Związane przeciwciała z białkiem powoduje dodatkowe opóźnienie migracji kompleksu DNA-białko i pojawienie się dodatkowego kompleksu DNA-białko-przeciwciało rozpoznawanego jako dodatkowy prążek techniką badania opóźnienia migracji w żelu (ang. *gel shift*).

Kompleks AP-1 jest indukowany w wielu sytuacjach: po pobudzeniu komórek do proliferacji, w trakcie programowanej śmierci komórek, w rozwoju i po stymulacji komórek układu nerwowego przez bodźce elektryczne i chemiczne, jednakże skład kompleksu AP-1 w różnych sytuacjach fizjologicznych jest inny [7, 22-28 i piśmiennictwo tam cytowane]. Wyniki własne i innych autorów wskazują na znaczne różnice i dynamiczne zmiany składu AP-1. Tabela 1 przedstawia dynamikę zmian w składzie AP-1 w mózgu szczura w różnych sytuacjach fizjologicznych [23, 24, 26, 28 oraz dane niepublikowane].

Podobne zjawisko wymiany składników AP-1 obserwowali Kovary i Bravo [29], którzy wykryli obecność różnych kompleksów AP-1 w cyklu komórkowym fibroblastów. Stwierdzili, że w trakcie przejścia G0-G1 wcześniej po przebudzeniu przez surowicę występuje c-Fos związany z białkami Jun (c-Jun, JunB, JunD), a potem c-Fos jest w kompleksie zastępowany przez białka Fra1 i Fra2. Zjawisko zastępowania białka c-Fos przez Fra1, Fra2 lub FosB może mieć duże znaczenie w regulacji aktywności AP-1, gdyż np. Fra1 i Fra2 hamują aktywność c-Jun [30] i są mniej

Tabela 1.

Skład kompleksu AP-1 w mózgu szczura w różnych sytuacjach fizjologicznych

Źródło białka i stan fizjologiczny	Składniki kompleksu AP-1	
	białka Jun	białka Fos
Kora czuciowa szczura kontrola	Jun D	Fos B
deprywacja wzrokowa	Jun D	Fos B
stymulacja wzrokowa, 2 h	Jun B, Jun D	c-Fos, Fos B
stymulacja wzrokowa, 6 h	Jun B, Jun D	Fos-B
Kora czuciowa, rozwój 21 dzień po urodzeniu	Jun D, Jun B	Fos B, Fra-2, c-Fos
Kora czuciowa 2 h po treningu	Jun D	Fos-B
Hipokamp w 2 h po drgawkach wywołanych przez metrazol	Jun B	c-Fos, Fos B
Hipokamp szczura po drgawkach wywołanych przez kainian	Jun B	c-Fos, Fos B
faza wczesna — 2 h	Jun B	c-Fos, Fra-2, Fos B
faza późna — 6 h	Jun B	c-Fos, Fra-2, Fos B
neurodegeneracja — 72 h	Jun D, c-Jun	Fos B

efektywne niż c-Fos w aktywacji transkrypcji. Wyniki badań nad składem i właściwościami kompleksu AP-1 rzucają światło na potencjalny mechanizm regulacji transkrypcji genów poprzez współdziałanie białek tworzących kompleks i determinujących jego aktywność. Wskazują też, jak wiele kombinacji może powstać w grupie kilku reagujących ze sobą białek.

V. Struktura i funkcja kompleksu transkrypcyjnego NFAT

V-1. Aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFAT

Od kilku lat pojawiają się doniesienia o bezpośrednich, fizycznych oddziaływaniach między czynnikami transkrypcyjnymi z niespokrewnionych ze sobą rodzin. Dobrym przykładem na współdziałanie, a nawet ścisłą zależność pomiędzy różnymi białkami regulującymi poziom ekspresji genów, jest czynnik NFAT, białko jądrowe pochodzące z aktywowanych limfocytów T (*nuclear factor of activated T cells*). Odkrycie czynnika transkrypcyjnego NFAT było związane z próbą identyfikacji białek zaangażowanych w kontrolę ekspresji genu kodującego interleukinę 2 — IL2 [31]. IL-2 jest cytokiną produkowaną przez limfocyty T po związaniu antygeny ze swoistym receptorem (TCR) na powierzchni tych komórek i odgrywa istotną rolę w regulacji ich proliferacji. Czynnikiem NFAT, wiążący się z określoną sekwencją w obrębie promotora genu IL-2, pojawia się w około 20 min. po stymulacji komórek białczkowych linii Jurkat, po czym jego ilość stopniowo rośnie przez 2h. Jego obecność poprzedza indukcję ekspresji genu IL-2, następującą w około 40 min. po aktywacji komórek [31]. NFAT reguluje również ekspresję genów kodujących inne limfokiny: IL-3, IL-4, GM-CSF, TNF α , IFN γ , produkowane przez limfocyty oraz komórki nie związane z układem odpornościowym [32].

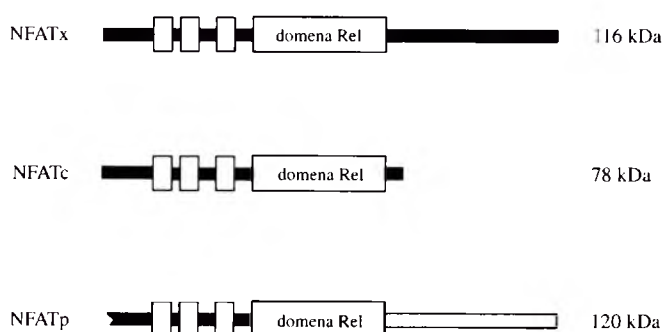
Czynnik transkrypcyjny NFAT jest kompleksem utworzonym przez dwa składniki: cytoplazmatyczny i jądrowy. Składnik cytoplazmatyczny jest obecny w komórkach niepobudzonych, natomiast składnik jądrowy jest indukowany w momencie gdy do komórki dociera sygnał zewnątrzkomórkowy [33]. Flanagan i wsp. [33] wykazali, że aktywacja czynnika transkrypcyjnego NFAT przebiega w dwóch etapach: etap pierwszy (A) jest uwarunkowany wzrostem poziomu Ca²⁺ wynikającym z pojawienia się wtórnego przekaźnika — trójfosforanu inozytolu (IP₃) po pobudzeniu TCR na powierzchni limfocytów. Wapń powoduje aktywację kalcyneuryny, fosfatazy serynowo-treoninowej zależnej od kalmoduliny i wapnia, której jednym z substratów jest właśnie składnik cytoplazmatyczny kompleksu NFAT. W wyniku defosforylacji białko przemieszcza się do jądra. Etap ten jest hamowany przez dwa związki o działaniu immunosupresyjnym — cyklosporynę A i FK506 [33, 34], które po związaniu z ich wewnątrzkomórkowym receptorem

powodują spadek aktywności enzymatycznej kalcyneuryny. Nadekspresja genów kodujących podjednostki: katalityczną i regulatorową tego enzymu w komórkach białczkowych linii Jurkat, prowadziła do zwiększonej ekspresji genu reporterowego zależnego od NFAT, jak również powodowała zwiększoną oporność komórek na działanie cyklosporyny A i FK506 [35]. Wyniki tych badań wskazują na kluczową rolę kalcyneuryny w szlaku przekazywania sygnału, którego elementem jest NFAT [36].

Etap drugi (B): W wyniku aktywacji kinazy białkowej C poprzez diacyloglicerol dochodzi do uruchomienia kaskady zdarzeń prowadzących do wzmożonej ekspresji genów kodujących białka składnika jądrowego. Stwierdzono, że jest nim znany od dawna czynnik transkrypcyjny AP-1. Tworzą go białka z rodziny Fos i Jun, które w formie hetero-(Fos-Jun) lub homodimerów (Jun-Jun) stanowią wraz ze składnikiem cytoplazmatycznym, aktywny kompleks NFAT — zdolny do rozpoznawania określonej sekwencji DNA, wiązania się z nią i aktywowania zależnych od niego genów [34, 36-39]. Schemat aktywacji czynnika transkrypcyjnego NFAT przedstawia rycina 1.

V-2. Składniki cytoplazmatyczne kompleksu NFAT i ich tkankowo-specyficzna ekspresja

Wyizolowano trzy białka, które wiążą się z sekwencją NFAT i mogą stanowić cytoplazmatyczny składnik kompleksu. Są to: NFATp (*preexisting*) — występujący w trzech izoformach, powstałych w wyniku alternatywnej obróbki mRNA, NFATc (*cytosolic*) i NFATx (Ryc. 4). Poznano również sekwencję kodujących je genów. Białka te zawierają domenę, obejmującą około 290 reszt aminokwasowych, homologiczną w około 20% z domeną białek z rodziny Rel (p65 podjednostka NF κ B) — odpowiedzialną za wiązanie z DNA i dimeryzację [38, 40]. W obrębie N-końcowym tej domeny w białku NFATp zidentyfikowano odcinek obejmujący 187 aminokwasów, konieczny do wiązania się białka z DNA [39]. Odcinek ten zawiera 8 aminokwasów bezpośrednio wiążących się z DNA i występujących również w białkach NFATc i NFATx [38, 39-41]. Podobieństwo pomiędzy białkami NFATp,



Ryc. 4. Struktura rodziny białek NFATc. Zaznaczono położenie domeny homologii do białek Rel. Otwarte bloki oznaczają obszary bogate w reszty serynowe i prolinowe. Sekwencja N-końca białka NFATp nie jest znana.

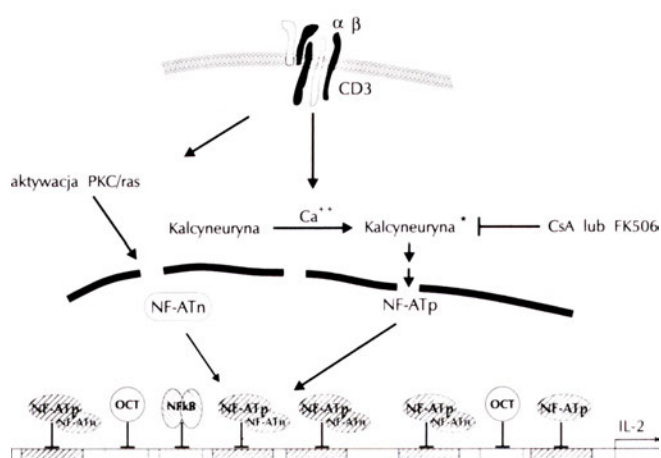
NFATc i NFATx jest szczególnie duże właśnie w rejonie homologii z białkami Rel i wynosi około 70% [38, 40, 41]. W odcinku N-końcowym wszystkich trzech białek zidentyfikowano obszary bogate w serynę i prolinę — tzw. SP box. Motyw ten powtarza się trzykrotnie w każdym białku i jest unikatowy w rodzinie NFAT, a jego znaczenie dla funkcjonowania kompleksu nie jest znane [41].

Chociaż NFATp oraz NFATc i NFATx są zdolne do rozpoznawania i wiązania się z taką samą sekwencją, specyficzność wiązania z DNA nie jest identyczna. Na przykład NFATc wiąże się w nieobecności AP-1 z sekwencją NFAT występującą w promotorze mysiego genu IL-2, podczas gdy NFATx nie jest zdolne do takiego oddziaływania [41].

Ekspresja genów kodujących mRNA składników cytoplazmatycznych kompleksu NFAT jest różna w różnych tkankach. Stwierdzono obecność mRNA genu kodującego NFATc w aktywowanych komórkach ze śledziona, grasicy oraz w komórkach skóry [40], czyli w obszarach, w których zachodzi transkrypcja zależna od NFAT [42]. Dużo niższy poziom mRNA NFATc stwierdzono w mięśniach, płucach, jądrach, prostaty, jajnikach, okrężnicy. Natomiast w mózgu, wątrobie i nerkach nie wykryto nawet śladowych ilości tego mRNA [40]. NFATc jest indukowany przez estry forbolu i jonomycynę w komórkach białaczkowych linii Jurkat. Indukacja ta jest hamowana przez cyklosporynę A. Wskazuje to na udział białka NFATc w autoregulacji genu, który je koduje [40].

Poziom mRNA NFATx jest wysoki w grasicy, zwłaszcza w populacji tymocytów CD4+CD8+, które w trakcie negatywnej selekcji tymocytów w grasicy, umierają na drodze apoptozy [41]. Istnieją przesłanki aby sądzić, że czynnik transkrypcyjny NFAT jest zaangażowany w regulację programowanej śmierci tymocytów [43]. Być może właśnie NFATx jest tym białkiem z grupy białek NFAT, które odgrywa istotną rolę w procesie dojrzewania limfocytów.

NFATp jest jedynym spośród trzech do tej pory opisanych białek, które występuje nie tylko w komórkach układu odpornościowego tj. splenocytach, tymocytach czy limfocytach z krwi obwodowej, ale również w mózgu [40, 41, 44]. Obecność białka NFATp stwierdzono w hipokampie, mózdku, korze czołowej, opuszcze węchowej a także w komórkach nowotworu kory nadnerczy PC12 [44]. Nie ma danych wskazujących czy aktywacja tego białka przebiega w taki sam sposób w komórkach układu nerwowego jak i w limfocytach. Jest to jednak prawdopodobne, ponieważ wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia w neuronach konieczny do defosforylacji białka NFATp, ma miejsce w wyniku depolaryzacji komórek lub zadziałania neurotransmitera. Ponadto kalcyneuryna — regulująca stan ufosforylowania NFAT — występuje obficie w układzie nerwowym. Białko NFATp wyróżnia się również tym spośród białek NFAT, że jest



Ryc. 3. Schemat aktywacji promotora genu interleukiny 2 przez kompleks transkrypcyjny NFAT. Stymulacja receptora antygeny (TCR) prowadzi do podwyższenia stężenia jonów wapnia oraz aktywacji szlaku przekazywania sygnału, w którym uczestniczą kinaza białkowa C (PKC) oraz białka G (ras). Jony wapnia aktywują kalcyneurynę (*jej aktywność jest hamowana przez leki immunosupresyjne: cyklosporynę A oraz FK 506), która defosforyluje cytoplazmatyczny składnik NFATp (p = preexisting) umożliwiając jego przemieszczenie się do jądra komórkowego. Aktywowany za pośrednictwem szlaku PKC/ras składnik jądrowy NFATn (n = nuclear) łączy się z NFATc tworząc funkcjonalny kompleks transkrypcyjny, który może wiązać się z sekwencjami NFAT. W promotorze genu interleukiny 2 oprócz 5 miejsc wiązania kompleksu NFAT są też miejsca wiązania czynników z rodziny oktamer (Oct) i NFkB.

zdolne do samodzielnego, bez udziału AP-1, wiązania się z rozpoznawaną sekwencją. Takie oddziaływanie stwierdzono w obrębie promotora genu kodującego TNF α , do którego wiążą się dwie cząsteczki NFATp [45] oraz w przypadku promotora genu IL-4 [46] i IL-2 (Ryc. 3) [47].

Podsumowując dotychczasowe dane można określić czynnik transkrypcyjny NFAT jako kompleks białkowy, który utworzony jest z jednego z trzech do tej pory poznanych białek znajdujących się w cytoplazmie oraz białek jądrowych z rodziny Fos i Jun, tworzących czynnik transkrypcyjny AP-1. Aktywacja kompleksu NFAT wiąże się ze wzrostem poziomu Ca²⁺ oraz pojawieniem się nowych białek (Fos, Jun), w następstwie aktywacji kinazy białkowej C. NFAT wydaje się być czynnikiem zaangażowanym głównie w regulację genów kodujących limfokiny, choć istnieją dane o jego obecności w komórkach nie związanych z układem odpornościowym.

VI. Współdziałanie czynników transkrypcyjnych AP-1 i NFAT w procesie regulacji ekspresji genów

VI-1. Oddziaływanie białka NFATp z promotorami różnych genów

W promotorach kilku genów kodujących cytokiny znaleziono miejsca wiązania białka NFATp. Są to promotory genów: interleukiny 2 (IL2) (Ryc. 3), IL3, IL4, czynnika stymulującego wzrost granulocytów

i makrofagów (GM-CSF) i czynnika nekrozy nowotworów (TNF α). Wszystkie te miejsca mają sekwencję GGA(A/G)AA, z którą wiąże się białko NFATp. W obszarze promotora, sąsiadującym z tą sekwencją, występują już jednak znaczne różnice [32].

Stwierdzono, że białko NFATp wiąże się z odpowiednimi miejscami promotora genu kodującego IL2 w kompleksie z AP-1, tworząc opisany wcześniej kompleks NFAT. W promotorze tego genu znaleziono także miejsce wiązania samego białka NFATp (Ryc. 3) [47]. W promotorze genów kodujących IL3 i GM-CSF miejsca wiązania białka NFATp sąsiadują z miejscami wiązania czynnika AP-1 lub CREB (ang. *cyclic AMP responsive element binding protein*), a w promotorze genu kodującego IL4 — z miejscem wiążącym czynniki z rodziny Oktamer [32]. Promotor genu kodującego TNF α posiada tak zwane elementy κ , z którymi wiąże się białko NFATp, najprawdopodobniej w kompleksie NFATp/NFAT. Mutacja w sekwencji 5'-lub 3'-końca elementu κ uniemożliwiała indukcję transkrypcji genu TNF α [32, 45]. Spośród wspomnianych promotorów, najlepiej poznany jest promotor genu IL2 i wiązanie się białka NFATp w kompleksie z AP1 z odpowiednimi sekwencjami DNA zostało udokumentowane doświadczalnie [36].

VI-2. Tworzenie funkcjonalnego kompleksu NFAT

Białka NFATp, NFATc, NFATx (w dalszej części zostanie omówiony głównie NFATp, gdyż badania przeprowadzone były przede wszystkim na tym białku) i czynnik transkrypcyjny AP-1 tworzą kompleks NFAT. Aby zbadać, które domeny białek składających się na kompleks NFAT są odpowiedzialne za jego tworzenie, posłużono się analizą oddziaływań między poszczególnymi białkami pozbawionymi określonych domen.

Stwierdzono, że w oddziaływaniach między składnikami kompleksu ze strony czynnika AP-1 uczestniczy domena zawierająca strukturę „suwaka leucynowego” — bZIP [36].

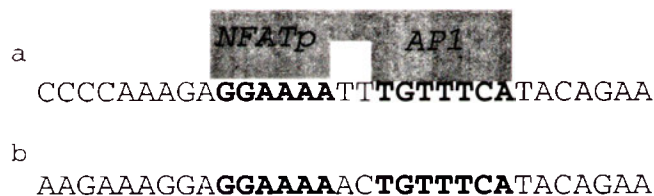
Regionem białka NFATp niezbędnym do tworzenia kompleksu z czynnikiem AP1 jest centralny fragment białka długości 187 aminokwasów [39], którego sekwencja jest ewolucyjnie zachowywana w rodzinie białek NFAT [48, 41]. Jest to część dłuższego fragmentu, około 300 aminokwasowego, o ograniczonej homologii do ewolucyjnie zachowywanego regionu białek Rel (RHR — ang. *Rel homology region*). Homologia odpowiedniego fragmentu NFATp do RHR wynosi zaledwie 20%, ale wspomina się o niej, gdyż dotyczy obszaru o podobnej funkcji w białkach z obu rodzin. W obu przypadkach region ten odpowiada za wiązanie się czynnika z DNA i za oddziaływanie ze strukturą „suwaka leucynowego” przy tworzeniu kompleksów z czynnikami z innych rodzin. Za bezpośrednie oddziaływanie z DNA w przypadku białek Rel od-

powiedzialna jest sekwencja aminokwasowa RERYX-CEG [39]. Wyniki analizy zdolności wiązania się z DNA zmutowanego białka NFATp sugerują, że za bezpośrednie oddziaływanie tego białka z DNA odpowiada sekwencja RAHYETEG [39].

Wydaje się, że centralną rolę w powstawaniu kompleksu NFAT odgrywa sekwencja DNA, z którą ten kompleks się wiąże. Przemawiają za tym wyniki doświadczeń typu gel-shift, w których mysie białka NFATp, c-Fos i c-Jun inkubowano z sondami AP-1 i NFAT w różnych kombinacjach. Obecność czynnika NFATp nie wpływała w żaden sposób na wiązanie się białek Fos i Jun z sekwencją AP-1, co sugeruje, że w nieobecność sekwencji NFAT nie powstaje białkowy kompleks NFAT [36].

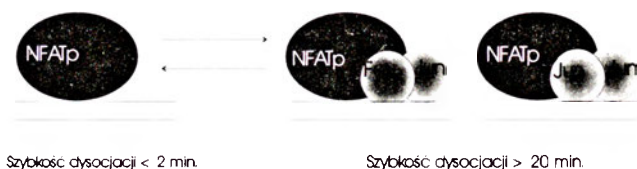
VI-3. Rola składników kompleksu NFAT w regulacji ekspresji genów

Rycina 5 przedstawia sekwencję rozpoznawaną przez kompleks NFAT z mysiego i ludzkiego promotora genu kodującego IL2. W jej obrębie znajduje się fragment rozpoznawany przez czynnik NFATp oraz sekwencja, z którą może wiązać się kompleks AP-1. Sekwencja ta odbiega od sekwencji najwyższej zgodności dla AP-1 (por. Ryc. 2 i Ryc. 5), dlatego może słabiej oddziaływać z czynnikiem AP1 [32].



Ryc. 5. Sekwencje miejsc wiązania kompleksu NFAT w dystalnej części promotora mysiego (A) i ludzkiego (B) genu interleukiny 2. Zaznaczono sekwencje, z którymi wiążą się czynniki AP-1 i NFATp.

Wiązanie się NFATp z DNA w promotorze mysiego genu IL2 jest mniej stabilne niż wiązanie się całego kompleksu NFAT [36, 47] (Ryc. 6). W przypadku promotora ludzkiego genu IL2 w ogóle nie stwierdzono wiązania się z nią samego białka NFATp, a jedynie wiązanie się całego kompleksu NFAT [49]. Przyczyną może być niewielka różnica w sekwencji obu promotorów (Ryc. 5). Z kolei kompleks AP1 samodzielnie nie wiąże się z miejscem NFAT w promotorze mysiego genu [36, 37]. Sugeruje to, że czynnik NFATp odpowiada za specyficzność wiązania kompleksu NFAT. Kompleks AP1 zaś wyraźnie stabilizuje



Ryc. 6. Wpływ składu kompleksu NFAT na stabilność jego wiązania z DNA.

wiązanie NFATp z odpowiednią sekwencją DNA.

Aby określić rolę poszczególnych składników kompleksu NFAT w aktywacji transkrypcji, testowano *in vitro* wpływ na transkrypcję odpowiedniej matrycy następujących mysich białek: NFATp, c-Fos i mutantu c-Fos pozbawionego domeny transaktywującej oraz c-Jun, c-Jun pozbawionego domeny transaktywującej i mutantu c-Jun (J91-334) o podwyższonej zdolności aktywacji. Matrycą był plazmid zawierający mysy gen IL2 pod kontrolą obszaru regulatorowego z trzema miejscami NFAT. Ani białko NFATp ani kompleks API oddzielnie nie wpływały na ekspresję genu IL2, podobnie jak NFATp wraz z c-Jun i c-Fos pozbawionymi domeny transaktywującej. Kompleksy NFATp/c-Fos i c-Jun lub NFATp/c-Jun aktywowały transkrypcję matrycy DNA. Najwyższy poziom ekspresji uzyskano inkubując matrycę z kompleksem NFATp/mutant c-Jun J91-334. Wyniki doświadczeń wskazują, że rola czynnika API w kompleksie NFAT nie ogranicza się do stabilizacji wiązania kompleksu z DNA. Czynniki API funkcjonuje także jako aktywator transkrypcji. Jedyne zastrzeżenie budzi fakt użycia w opisanych badaniach niekompletnego białka NFATp. Nie można wykluczyć, że NFATp o pełnej długości posiada domenę odpowiedzialną za aktywację transkrypcji i może samo aktywować transkrypcję genu IL2 *in vivo*.

VI-4. Skład kompleksu NFAT *in vivo*

Oddziaływanie między NFATp a API o różnym składzie daje możliwość modulacji działania całego kompleksu NFAT. W istocie, mimo że teoretycznie różne białka z rodziny Fos i Jun mogą wchodzić w skład NFAT, tylko niektóre z nich faktycznie wchodzi w jego skład i ich ilościowy udział w kompleksie jest różny.

Indukcja mRNA kodującego większość białek Fos i Jun ma miejsce w 30 min. po stymulacji mysich limfocytów T linii Ar-5 przez przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi CD3. Wyjątkiem jest mRNA *junD*, którego wysoki poziom nie zmienia się znacząco pod wpływem pobudzenia. Z kolei mRNA *fra-1* jest indukowane w 4 godziny po stymulacji. Zbadano, które białka Fos i Jun wchodzi w skład kompleksu API, a które w skład NFAT w dwie godziny po opisanej stymulacji. W kompleksach API znajdowały się wszystkie białka z rodziny Fos i Jun, natomiast w skład kompleksów NFAT wchodziły jedynie: c-Fos, Fra-2, JunB i w mniejszym stopniu JunD [50].

W 4 godziny po stymulacji normalnych ludzkich limfocytów T i komórek białaczkowych linii Jurkat przez fitohemaglutyninę (PHA) i estry forbolu (PMA), w kompleksie NFAT wykryto przede wszystkim c-Fos, a także c-Jun i JunD [51]. Natomiast w 6-8 godz. po stymulacji ludzkich limfocytów T z krwi obwodowej przez estry forbolu i jonomycynę w skład NFAT wchodziły przede wszystkim Fra1 i JunB [37].

Zebrane do tej pory dane świadczą o tym, że czynniki API o bardzo różnym składzie uczestniczą w tworzeniu kompleksu NFAT. Dane te dotyczą różnych organizmów, komórek, sposobów stymulacji i uzyskiwane były w różnym czasie po pobudzeniu. Aczkolwiek nie wylania się z nich jeszcze spójny obraz tworzenia kompleksów NFAT o określonym składzie, uzyskane wyniki sugerują, że dochodzi do zamiany składnika c-Fos i Fra-1 w obrębie NFAT. Może to zmieniać właściwości biologiczne kompleksu, gdyż Fra1 hamuje aktywność c-Jun i jest mniej efektywne w stymulacji transkrypcji niż c-Fos [29, 30].


Podsumowanie

Przedstawione powyżej omówienie oddziaływań między różnymi czynnikami transkrypcyjnymi nie wyczerpuje tematu i jest tylko przykładem ilustrującym, jak złożone są mechanizmy regulacji ekspresji genów. Aktywność wielu promotorów zależy od równoczesnej obecności i współdziałania czynników transkrypcyjnych. Biorąc pod uwagę, że różne czynniki są aktywowane przez swoiste wtórne przekaźniki, należy sądzić, że dopiero bodźce równoległe pobudzające szereg z nich, pobudzą transkrypcję. Zdolność czynników transkrypcyjnych do dimeryzacji umożliwia tworzenie kompleksów o zróżnicowanym składzie pomiędzy białkami z tej samej lub z różnych rodzin. W ten sposób nawet stosunkowo niewielka liczba białek współdziałając ze sobą może powodować zróżnicowaną odpowiedź transkrypcyjną. Stwarza to zresztą okazję do bardziej złożonej kontroli formowania się funkcjonalnych kompleksów transkrypcyjnych.

Artykuł otrzymano 18 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 5 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Tjian R, Maniatis T (1994) *Cell* **77**: 5-8
2. Kaczmarek L, Kamińska B (1989) *Exp Cell Res* **183**: 24-35
3. Kaczmarek L (1994) *Amino Acids* **7**: 245-254
4. Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R (1987) *Nature (Lond)* **325**: 368-372
5. Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M (1987) *Cell* **49**: 729-739
6. Lee W, Mitchell PJ, Tjian R (1987) *Cell* **49**: 741-752
7. Angel P, Karin M (1991) *Biochim Biophys Acta* **1072**: 129-157
8. Vogt PK, Bos TJ (1989) *Trends Biochem Sci* **14**: 172-175
9. Cohen DR, Curran T (1990) *Oncogene* **5**: 929-939
10. Rauscher FJ III, Voullas PJ, Franza BR, Curran T (1988) *Gees Dev* **2**: 1687-1699
11. Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME, Leder P (1988) *Cell* **55**: 917-924
12. Kouzarides T, Ziff E (1988) *Nature (Lond)* **336**: 646-651
13. Turner R, Tjian R (1989) *Science* **244**: 1689-1694
14. Abate C, Luk D, Curran T (1991) *Mol Cell Biol* **11**: 3624-3632
15. Angel P, Smeal T, Meek J, Karin M (1988) *New Biol* **1**: 35-43
16. Baichwal VR, Tjian R (1990) *Cell* **63**: 815-825

17. Ransone LJ, Kerr LD, Schmitt MJ, Wamsley P, Verma IM (1993) *Gene Expression* 3: 37-48
18. Lee WS, Kao CC, Bryant GO, Liu X, Berk AJ (1991) *Cell* 67: 365-476
19. Chiu R, Angel P, Karin M (1989) *Cell* 59: 979-986
20. Ryseck KP, Bravo R (1991) *Oncogene* 6: 533-542
21. Nakabeppu Y, Nathans D (1991) *Cell* 64: 751-759
22. Kamińska B, Kaczmarek L (1993) *Neurosci Lett* 153: 189-191
23. Kamińska B, Filipowski RK, Żurkowska G, Lason W, Przewłocki R, Kaczmarek L (1994) *Eur J Neurosci* 6: 1558-1566
24. Kamińska B, Łukasiuk K, Kaczmarek L (1994) *Acta Neurobiol Exp* 54: 65-72
25. Przewłocki R, Kamińska B, Łukasiuk K, Nowicka Z, Przewłocka B, Kaczmarek L, Lason W (1995) *Neuroscience* 68: 73-81
26. Kamińska B, Mosieniak G, Gierdalski M, Kosut, Kaczmarek L (1995) *Mol Brain Res* 33: 295-304
27. Kaczmarek L (1994) *Amino Acids* 7: 245-254
28. Łukasiuk K, Kaczmarek L (1994) *Brain Res* 643: 227-233
29. Kovary, Bravo R (1992) *Mol Cell Biol* 12: 5015-5023
30. Suzuki T, Okuno H, Yoshida T, Endo T, Nishina H, Iba H (1992) *Nucl Acid Res* 19: 5537-5542
31. Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR (1988) *Science* 241: 202-205
32. Rao A (1994) *Immunol Today* 15: 274-281
33. Flangan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR (1991) *Nature (Lond)* 352: 803-807
34. Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A (1992) *Nature (Lond)* 356: 801-804
35. Clipstone NA, Crabtree GR (1992) *Nature (Lond)* 357: 659-697
36. Jain J, McCaffrey PG, Miner Z, Kerppola TK, Lambert JN, Verdine GL, Curran T, Rao A (1993) *Nature (Lond)* 365: 352-355
37. Boise LH, Petryniak B, Mao X, June CH, Wang CY, Lindsten T, Bravo R, Kovary K, Leiden JM, Thompson CB (1993) *Mol Cell Biol* 13: 1911-1919
38. McCaffrey PG, Luo C, Kerppola TK, Jain J, Badalian TM, Ho AM, Burgeon E, Lane WS, Lambert JN, Curran T, Verdine GL, Rao A, Hogan PG (1993) *Science* 262: 750-754
39. Jain J, Burgeon E, Badalina TM, Hogan PG, Rao A (1995) *J Biol Chem* 270: 4138-4145
40. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR (1994) *Nature (Lond)* 369: 497-502
41. Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, Arai KI, Arai N (1995) *Mol Cell Biol* 15: 2697-2706
42. Verweij CL, Guidos C, Crabtree GR (1990) *J Biol Chem* 265: 15788-15795
43. Crabtree GR, Clipstone NE (1994) *Annu Rev Biochem* 63: 1045-1083
44. Ho AM, Rao A, Hogan PG (1994) *J Biol Chem* 269: 28181-28186
45. McCaffrey PG, Goldfeld AE, Rao A (1994) *J Biol Chem* 269: 30445-30450
46. Rooney JW, Hodge MR, McCaffrey PG, Rao A, Glimcher LH (1994) *EMBO J* 13: 625-633
47. Rooney JW, Sun YL, Glimcher LH, Honey T (1995) *Mol Cell Biol* 15: 6299-6310
48. Nolan  (1994) *Cell* 77: 1-4
49. Jain J, Miner Z, Rao A (1993) *J Immunol* 151: 837-848
50. Jain J, Nalefski EA, McCaffrey PG, Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V, Rao A (1994) *Mol Cell Biol* 14: 1566-1574
51. Yaseen NR, Jungham P, Kerppola T, Curran T, Sharma S (1994) *Mol Cell Biol* 14: 6886-6895

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

Obecny adres:

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

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

Regulacja metabolizmu folianowego u grzybów: *Aspergillus nidulans* jako model badawczy*

Regulation of folate metabolism in fungi: *Aspergillus nidulans* as a experimental model

ANDRZEJ PASZEWSKI¹,
MAŁGORZATA BALIŃSKA²

Spis treści:

- I. Znaczenie folianów w metabolizmie komórkowym
- II. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach organizmów wyższych
- III. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach bakterii
- IV. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach grzybów

I. Znaczenie folianów w metabolizmie komórkowym

Terminem „foliany” określa się liczną grupę związków, pochodnych kwasu foliowego, które biorą udział, głównie jako koenzymy, w podstawowych procesach metabolicznych w komórce takich jak biosynteza prekursorów DNA i białek. Enzymatyczne przemiany koenzymatycznych form folianu dostarczają aktywnych form jednostek jednowęglowych niezbędnych do powstania metioniny, histydyny oraz interkonwersji glicyna-seryna oraz biosyntezy puryn i tymidylanu [1] (Ryc. 1). Tak więc metabolizm folianów jest szczególnie ważny ze względu na jego rolę w procesach replikacyjnych w komórce. Niektóre enzymy biorące udział w przemianach folianu są aktywne głównie w fazie S cyklu komórkowego (reduktaza dihydrofolianowa, synteza tymidylanowa i prawdopodobnie transformylazy rybotydów glicynamidu i aminoimidazolokarboksyimidu) [2].

II. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach organizmów wyższych

Regulacja procesów metabolicznych może zacho-

Contents:

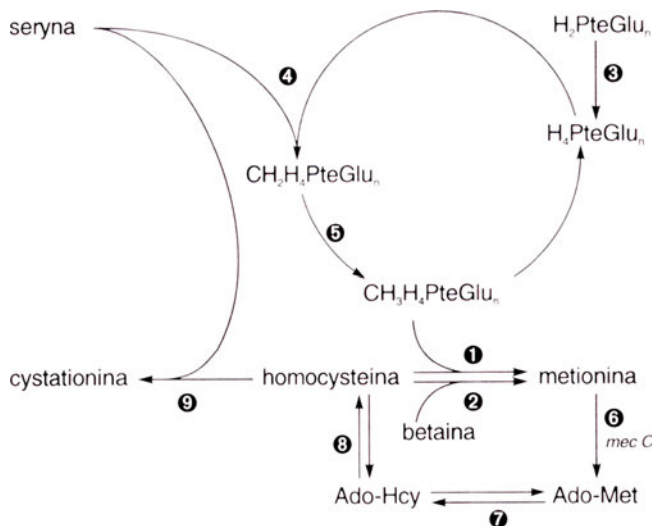
- I. Role of folates in cell metabolism
- II. Regulation of the level of folate enzymes in higher organisms
- III. Regulation of the level of folate enzymes in bacteria
- IV. Regulation of the level of folate enzymes in fungi

dzić poprzez zmiany stężeń substratów i efektorów (aktywatorów i inhibitorów) enzymów, względnie przez zmiany zawartości enzymów w komórce. Pierwszy z wymienionych systemów regulacyjnych stanowi mechanizm natychmiastowej odpowiedzi komórki na wszystkie perturbacje metaboliczne, drugi zaś ma znaczenie w odpowiedzi na bardziej trwale bodźce np. na obecność określonych związków pokarmowych w otoczeniu komórki lub ich wyczerpanie.

Na temat regulacji aktywności enzymów czynnych w metabolizmie folianów u organizmów wyższych jest stosunkowo dużo danych doświadczalnych [1, 3-5], znacznie mniej natomiast dotyczących regulacji ich wewnątrzkomórkowego poziomu. Większość danych dotyczy zmian poziomu syntazy tymidylanowej i reduktazy dihydrofolianowej w związku ze zwiększonym zapotrzebowaniem na tymidylan komórek będących w fazie S cyklu podziałowego [2, 6, 7]. Zmiany poziomu tych enzymów w powiązaniu z cyklem komórkowym obserwowano też u drożdży [8]. W komórkach ssaków stwierdzono ponadto znaczne zwiększenie ilości białka syntazy tymidylanowej i reduktazy dihydrofolianowej w wyniku zwielokrotnienia, pod wpływem cytostatyków, liczby kopii genów kodujących te enzymy [9, 10].

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

* W *Postęпах Biochemii* na przestrzeni wielu lat ukazały się artykuły omawiające ówczesny stan wiedzy dotyczący metabolizmu folianów np. Barbara Grzelakowska-Sztabert (1977) *Post Biochem* 22, 345-385



Ryc. 1. Metabolizm folianów

Enzymy: 1 — syntaza metioninowa (metylotransferaza 5-metylotetrahydropterolilopoliglutaminian: homocysteina (EC 2.1.1.13)); 2 — s-metylotransferaza betaina: homocysteina (EC 2.1.1.5); 3 — reduktaza dihydrofolianowa (oksydoreduktaza dihydropterolilopoliglutaminian: NADP (EC 1.5.1.4)); 4 — hydroksymetylotransferaza serynowa (EC 2.1.2.1); 5 — reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (FADH₂) (EC 1.1.99.15); 6 — syntaza S-adenozylometioninowa (EC 2.1.1.12); 7 — różne transmetylazy; 8 — syntaza S-adenozylhomocysteinowa (EC 2.1.1.10); 9 — β-syntaza cystationinowa (EC 4.2.1.22)

Skróty: H₂PteGlu_n — dihydropterolilopoliglutaminian; H₄PteGlu_n — tetrahydropterolilopoliglutaminian; CH₂H₄PteGlu_n — metylenotetrahydropterolilopoliglutaminian; CH₃H₄PteGlu_n — metylotetrahydropterolilopoliglutaminian; Ado-met — adenozylometionina; AdoHcy — adenozylohomocysteina. *MecC*-symbol genu kodującego syntazę S-adenozylometioninową

Danych na temat zmiany poziomu enzymów folianowych zachodzących pod wpływem zmiany wewnątrzkomórkowej puli niskocząsteczkowych metabolitów powodowanych zmianami w składzie pokarmu jest jeszcze mniej. W badaniach nad szczurami Finkelstein i Martin [11] wykazali, że dieta bogata w metioninę prowadziła do trzykrotnego zmniejszenia poziomu syntazy metioninowej w wątrobie szczura z jednoczesnym jaskrawym podwyższeniem poziomów β-syntazy cystationinowej i transmetylasy betaina:homocysteina (Ryc. 1). Wiązało się to ze zmianą wewnątrzkomórkowego stężenia homocysteiny, która była wykorzystywana w trzech reakcjach katalizowanych przez wymienione enzymy. Podkreślić jednak trzeba, że w omawianych doświadczeniach równie istotną rolę w regulacji metabolizmu homocysteiny, co zmiany w poziomie enzymów, spełnia regulacja ich aktywności. Szczególnie istotna jest tu silna inhibicja reduktazy metylenotetrahydrofolianowej i aktywacja β-syntazy cystationinowej przez S-adenozylometioninę [12].

Badania nad metabolizmem folianów prowadzone na organizmach wyższych napotykają na trudności, ponieważ nie ma łatwego sposobu otrzymywania mutantów zarówno w genach struktury, kodujących poszczególne enzymy cyklu folianowego jak i genach

regulacyjnych to jest tych, których produkty regulują ekspresję innych genów, a nie uczestniczą w reakcjach metabolicznych. Trzeba przy tym zwrócić uwagę, że mikroorganizmy, zwłaszcza wolnożyjące, regulują swój metabolizm w odpowiedzi na zmieniające się warunki środowiska. Stąd wydaje się, że modele bakteryjne i grzybowe mogą być pomocne w wyjaśnianiu szeregu aspektów metabolizmu folianowego, takich jak regulacje syntazy enzymów folianowych i puli folianów, szczególnie, że u tych organizmów stosunkowo łatwo otrzymuje się mutanty.

III. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach bakterii

Już w latach siedemdziesiątych wykazano w komórkach *Escherichia coli*, że metionina reprimuje syntezę hydroksymetylotransferazy serynowej, reduktazy metylenotetrahydrofolianowej i syntazy metioninowej (cytowane za [13]). Nowsze badania Deva i Harveya [14, 15], pokazały, że regulacja poziomu hydroksymetylotransferazy serynowej ma złożony charakter, ponieważ oprócz metioniny uczestniczą w niej seryna, puryny, a także homocysteina. Wykazano, że korepresorem (Ryc. 1) jest nie metionina, ale S-adenozylometionina oraz, że homocysteina stymuluje syntezę tego enzymu. W komórkach *E. coli* stwierdzono również symulację syntazy metioninowej niezależnej od witaminy B₁₂ przez homocysteinę. Jednocześnie homocysteina powodowała represję wytwarzania syntazy metioninowej zależnej od tej witaminy [16]. W regulacji tej uczestniczy białko regulatorowe kodowane przez gen *metR*. Jest to jedyny, jak dotąd, przypadek stwierdzenia roli homocysteiny jako efektora w regulacji poziomu enzymów folianowych w komórkach bakterii.

IV. Regulacja poziomu enzymów folianowych w komórkach grzybów

Badania nad nitkowatym grzybem *Neurospora crassa* wykazały, że metionina, zwłaszcza dodana do pożywki łącznie z choliną (także donator grupy metylowej) powoduje represję syntazy enzymów folianowych prowadzących do syntazy metioniny: hydroksymetylotransferazy serynowej, dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej oraz syntazy metioninowej (Ryc. 1). Podobną represję powoduje też dodany do pożywki wyciąg z drożdży [13]. Prawdopodobnie więc poziom syntazy trzech badanych enzymów jest regulowany przez kilka niskocząsteczkowych efektorów.

U innego grzyba nitkowatego *Aspergillus nidulans*, który jak *N. crassa*, jest równie powszechnie stosowanym obiektem prac genetycznych, wyizolowano setki różnorodnych mutantów metabolicznych, jednak nie udało się uzyskać mutacji w genach kodujących poszczególne enzymy folianowe. Natomiast znane były dwa mutanty *metH2* i *metD10* zaburzone w syntezie

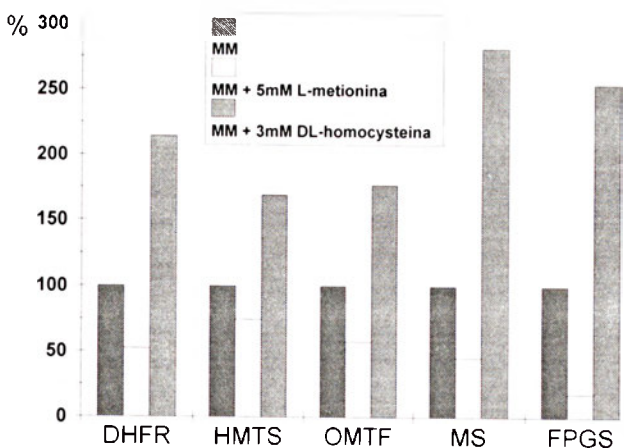
metioniny bardzo słabo rosnące bez dodania tego aminokwasu do pożywki. Analizując pulę aminokwasów siarkowych tych mutantów [17] wyrosłych na pożywce z $^{35}\text{SO}_4$, wykryto homolantioninę, analog cystationiny, powstający przy nadmiarze homocysteiny w komórce. Świadczyło to o niewydajnej syntezie metioniny z homocysteiny. Jak się okazało aktywność syntazy metioninowej jest w mutancie *metH2* obniżona [18], nie na tyle jednak, aby tłumaczyło to zapotrzebowanie tego szczepu na metioninę. Oba mutanty wykazują także niższy, niż szczep dziki, poziom hydroksymetylotransferazy serynowej, ale *metD10* ma wyższy, niż szczep dziki, poziom drugiego enzymu syntetyzującego metioninę — metylotransferazy betaina:homocysteina. Otrzymane wyniki wskazują na plejotropowy charakter obu mutacji i sugerują, że dotyczą one genu regulatorowego kontrolującego syntezę szeregu enzymów folianowych. Zostało to potwierdzone badaniami nad syntetazą folylopoliglutamylową, katalizującą powstawanie fizjologicznych substratów dla wszystkich enzymów folianowych. W obu mutantach rosnących w pożywce minimalnej nie zawierającej metioniny poziom enzymu odpowiadał stanowi represji obserwowanemu w szczepie standardowym rosnącym w pożywce uzupełnionej metioniną. Korelowało to ze znacznie obniżoną zdolnością mutantów do glutamylacji *in vivo* analoga folianu — ametopteryny, który jest łatwym do śledzenia i analizy przedstawicielem pochodnych folianowych [19]. Wyniki nowszych badań potwierdziły, że mutacje *metH2* i *metD10* prowadzą do zmian w regulacji syntezy enzymów folianowych: w mutancie *metD10* stwierdzono wyższy niż w szczepie dzikim poziom syntazy metioninowej i reduktazy dihydrofolianowej niższy zaś poziom hydroksymetylotransferazy serynowej i dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej [20].

Silnym impulsem do badania regulacji syntezy enzymów folianowych u *Aspergillus* było wykrycie, że niektóre z nich ulegają derepresji w mutantach *scon* (*sulfur controller*), w których zniesiona jest tzw. metaboliczna represja siarkowa [21]. Oznacza to, że gdy dostępne jest w podłożu preferencyjne źródło siarki (najlepiej metionina), to ulega represji szlak asymilacji siarczanu. Jest to zrozumiałe, gdy weźmie się pod uwagę energochłonność tej asymilacji (dwie cząsteczki ATP na jedną cząsteczkę siarczanu), a także fakt, że metionina jest doskonałym prekursorem cysteiny. Otóż w mutantach *scon* zaburzona jest metaboliczna regulacja siarkowa. Opisano cztery geny *sconA*, *sconB*, *sconC* i *sconD*, w których mutacje dają opisany efekt. Mutanty te charakteryzują się wysokim poziomem szeregu enzymów metabolizmu siarkowego, prawie niezmiennym w obecności metioniny tego dodanej do pożywki. W efekcie, w grzybnich mutantów *scon* obserwowano znacznie wyższy niż w szczepie dzikim poziom aminokwasów siarkowych, zwłaszcza cysteiny (2-10 razy więcej) i homocysteiny (2-5 razy więcej) [21]. Wyższe było też stężenie metioniny, ale nie prze-

kraczało dwukrotnie poziomu tego aminokwasu w szczepie dzikim.

Wysoki poziom kilku enzymów folianowych takich jak: reduktaza dihydrofolianowa, hydroksymetylotransferaza serynowa, dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa i syntaza metioninowa okazał się bardzo istotną właściwością mutantów *scon*. W przeciwieństwie jednak do enzymów metabolizmu siarkowego synteza wymienionych enzymów folianowych ulegała represji w warunkach wzrostu w obecności metioniny w pożywce. Sugerowało to, że podwyższony poziom tych enzymów w mutantach *scon* rosnących w pożywce minimalnej nie jest bezpośrednim skutkiem mutacji, a efektem wtórnym, np. podwyższonego stężenia jakiegoś związku siarkowego. Dane z badań bakterii (patrz rozdział II) sugerowały, że może chodzić tu o homocysteinę, co zostało potwierdzone doświadczalnie. Okazało się, że homocysteina dodana do pożywki wzrostowej powoduje podwyższenie poziomu badanych enzymów folianowych, zaś metionina ich represję (Ryc. 2). Biorąc pod uwagę wzajemne powiązanie metaboliczne tych dwóch aminokwasów, taki sposób regulacji syntezy enzymów folianowych nie wydaje się dziwny. Warto przy tym nadmienić, że mutant *mecC* częściowo zablokowany w syntezie S-adenozylometioniny (Ryc. 1), który ma 3-krotnie podwyższony w stosunku do szczepu dzikiego poziom wolnej metioniny [20], wykazuje poziom enzymów folianowych odpowiadających stanowi represji. Świadczy to, że efektem represji jest sama metionina, a nie S-adenozylometionina. Warto jednak zwrócić uwagę, że S-adenozylometionina uczestniczy w regulacji aktywności szeregu enzymów metabolizmu aminokwasów siarkowych i metabolizmu folianowego [12]. Stwierdziliśmy na przykład, że hamuje ona silnie reduktazę metylenotetrahydrofolianową ($I_{50} = 3 \mu\text{M}$) [dane niepublikowane].

Wyniki badań nad mutantami *scon* nasunęły przypuszczenie, że mutanty *metH2* i *metD10* mogą być



Ryc. 2. Poziom reduktazy dihydrofolianowej (DHFR), hydroksymetylotransferazy serynowej (HMTS), syntazy metioninowej (MS), reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (OMTF) i syntetazy folylopoliglutamylowej (FPGS) w szczepie dzikim *Aspergillus nidulans* wyrosłym w pożywce minimalnej i w pożywce minimalnej uzupełnionej homocysteiną lub metioniną. Poziom enzymów w grzybnicy z pożywki minimalnej określono jak 100%.

Tabela 1.

Aktywność syntetazy folylopoliglutamylowej (FPGS) i syntazy metioninowej (MS) w szczepie dzikim, mutancie *metH2* i rewertantach (R) tego mutantu rosnących w pożywce minimalnej (MM) i w pożywce minimalnej uzupełnionej metioniną [19]

Szczep	Aktywność (nmole/godz./mg białka)			
	FPGS		MS	
	MM	MM + met	MM	MM + met
Dziki	4.03	0.72	12.8	7.3
<i>metH2</i>	1.29	0.73	10.0	5.9
R5	4.85	0.84	14.6	6.3
R7	5.20	0.86	18.1	14.9
R8	5.40	4.75	13.1	14.0
R10	5.30	1.01	18.7	8.5
R14	5.25	4.95	13.6	13.7
R15	4.95	5.70	13.1	17.4

nadwrażliwe na represję metioninową pod względem enzymów folianowych (być może także tych, które nie były przez nas badane), co powoduje zakłócenie metabolizmu folianowego i niezbędność metioniny do ich wzrostu. Jeżeli założenie to jest prawdziwe, to powinno być możliwe otrzymanie rewertantów zdolnych do wzrostu bez metioniny. Część z nich mogłaby mieć uszkodzony zależny od metioniny system represji, co prowadziłoby do podwyższenia poziomu enzymów folianowych. Dane przedstawione w tabeli 1 wykazują, że w kilku rewertantach szczepu *metH2* poziom dwóch badanych dotąd enzymów folianowych jest wysoki, co potwierdza słuszność powyższego założenia. Jednocześnie stwierdzono, że rewersja w przypadku rewertantów R8, R10, R15 jest skutkiem mutacji w genach innych niż *metH*. Oznacza to, że mutacje te powstały w dotychczas niezidentyfikowanych genach regulacyjnych metabolizmu folianowego u *Aspergillus nidulans*, których liczba jest najprawdopodobniej większa.

Powyższy przegląd wykazuje, że *Aspergillus nidulans* jest doskonałym materiałem modelowym do badania regulacji metabolizmu folianowego u eukariontów. Jest on pierwszym organizmem z tej grupy, w którym udało się otrzymać mutacje w genach regulujących poziom enzymów folianowych. Otwierają się więc możliwości zrozumienia mechanizmów kontrolujących tę ważną domenę metabolizmu komórkowego, a także stwarza to wyjątkową okazję do zbadania w jaki sposób zakłócenia w metabolizmie folianowym odbijają się na metabolizmie aminokwasów siarkowych oraz syntezie puryn i pirymidyn. Wprawdzie nie wszystkie właściwości regulacji metabolizmu *A. nidulans* muszą być takie same jak u wyższych eukariontów, w tym ssaków, to jednak część mechanizmów regulacyjnych może być wspólna.

Artykuł otrzymano 18 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 29 lutego 1996 r.

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych Grant Nr 6P20300407.

Piśmiennictwo

1. Blakley RL, Benkovic ST (red) (1984) *Folates and Pteridines* t. 1, J. Wiley and Sons New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore
2. Johnson LF (1984) W: Stein GS, Stein JL (red) *Recombinat DNA and cell proliferation*, Academic Press, London, New York, Orlando, str. 25-57
3. Kim J-S, Lowe K, Shane B (1993) *J Biol Chem* **268**: 21680-21685
4. Shirck V, Strong VB (1989) *Arch Biochem Biophys* **269**: 371-380
5. Stokstad ERL (1990) *Clin Nutr* **13**: 1-21
6. Cadman E, Heimer R (1986) *Cancer Res* **46**: 1195-1198
7. Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, Kaneda S, Takeishi K, Seno T (1986) *J Mol Biol* **190**: 559-567
8. Storms RK, Ord RW, Greenwood MT, Miramadi B, Chu FK, Belfort M (1984) *Moll Cell Biol* **4**: 2858-2564
9. Schimke RT, Kaufman RJ, Alt FW, Kellems RE (1978) *Science* **202**: 1051-1052
10. Keyomarsi K, Samet J, Malmar G, Pardee AB (1993) *J Biol Chem* **268**: 15142-15149
11. Finkelstein JD, Martin JJ (1986) *J Biol Chem* **261**: 1582-1587
12. Finkelstein JD (1990) *J Nurt Biochem* **1**: 228-237
13. Burton EG, Metznerberg RL (1975) *Arch Biochem Biophys* **168**: 219-229
14. Dev IK, Harvey RJ (1984) *J Biol Chem* **259**: 8394-8401
15. Dev IK, Harvey RJ (1984) *J Biol Chem* **259**: 8402-8406
16. Byerly KA, Urbanowski ML, Stauffer GV (1990) *J Bacteriol* **172**: 2839-2843
17. Paszewski A, Grabski J (1975) *Acta Biochim Pol* **22**: 263-268
18. Balińska M, Paszewski A (1979) *Biochem Biophys Res Commun* **91**: 1095-1100
19. Lewandowska I, Sikora E, Szablewska I, Balińska M, Paszewski A (1993) *Adv Biol Biochem* **338**: 675-677
20. Lewandowska I, Balińska M, Natorff R, Paszewski A (1996) *Biochim Biophys Acta* (w druku)
21. Natorff R, Balińska M, Paszewski A (1993) *Mol Gen Genet* **238**: 185-192

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

Inhibicja syntazy tymidylanowej w chemioterapii

Thymidylate synthase inhibition in chemotherapy

WOJCIECH RODE*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizm reakcji syntazy tymidylanowej
- III. Mechanizmy inhibicji przez analogi dUMP aktywne w chemioterapii
- IV. Rozpoznanie pierścienia pirymidynowego substratu lub jego analogu przez enzym
- V. Selektywność inhibicji różnych syntaz tymidylanowych przez analogi dUMP
- VI. Analogi N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu jako inhibitory syntazy tymidylanowej aktywne w chemioterapii
- VII. Selektowność inhibicji różnych syntaz tymidylanowych przez analogi N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu
- VIII. Regulacja ekspresji syntazy tymidylanowej w komórce
- IX. Inhibicja syntazy tymidylanowej a cytotoxiczność

Wykaz stosowanych skrótów: FdUMP — 5-fluoro-2'-deзокsyurydylan; CF₃dUMP — 5-trifluorometylo-2'-deзокsyurydylan; FdCMP — 5-fluoro-2'-deзоксycytydylan; N⁴-OH-FdCMP — N⁴-hydroxy-5-fluoro-2'-deзоксycytydylan; FdUrd — 5-fluoro-2'-deзоксurydyna; CH₂H₄PteGlu — N^{5,10}-metylenotetrahydrofolian; H₂PteGlu — dihydrofolian.

I. Wstęp

Syntaza tymidylanowa (EC 2.1.1.45) katalizuje metylację w pozycji C(5) 2'-deзоксurydylanu (dUMP), zachodzącą w wyniku sprzężonych reakcji przeniesienia reszty jednowęglowej (na poziomie utlenienia aldehydu) z N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu (CH₂H₄PteGlu) i jej redukcji, z równoczesnym powstaniem dihydrofolianu i tymidylanu (dTMP). *In vivo* kofaktor folianowy i produkt reakcji występują zwykle w formach γ -oligoglutaminianowych, które nie są transportowane przez błonę komórkową, a więc zapobiegają utracie tych związków przez komórkę [1, 2]. Reakcja katalizowana przez syntazę tymidylanową jest jedynym źródłem tymidylanu syntetyzowanego *de novo* w komórce. Dlatego enzym ten jest docelowym w chemioterapii przeciwnowotworowej, przeciwwirusowej, przeciwgrzybiczej i przeciwpierwotniaczej [2-7].

* Prof. dr hab., Instytut Biochemii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Contents:

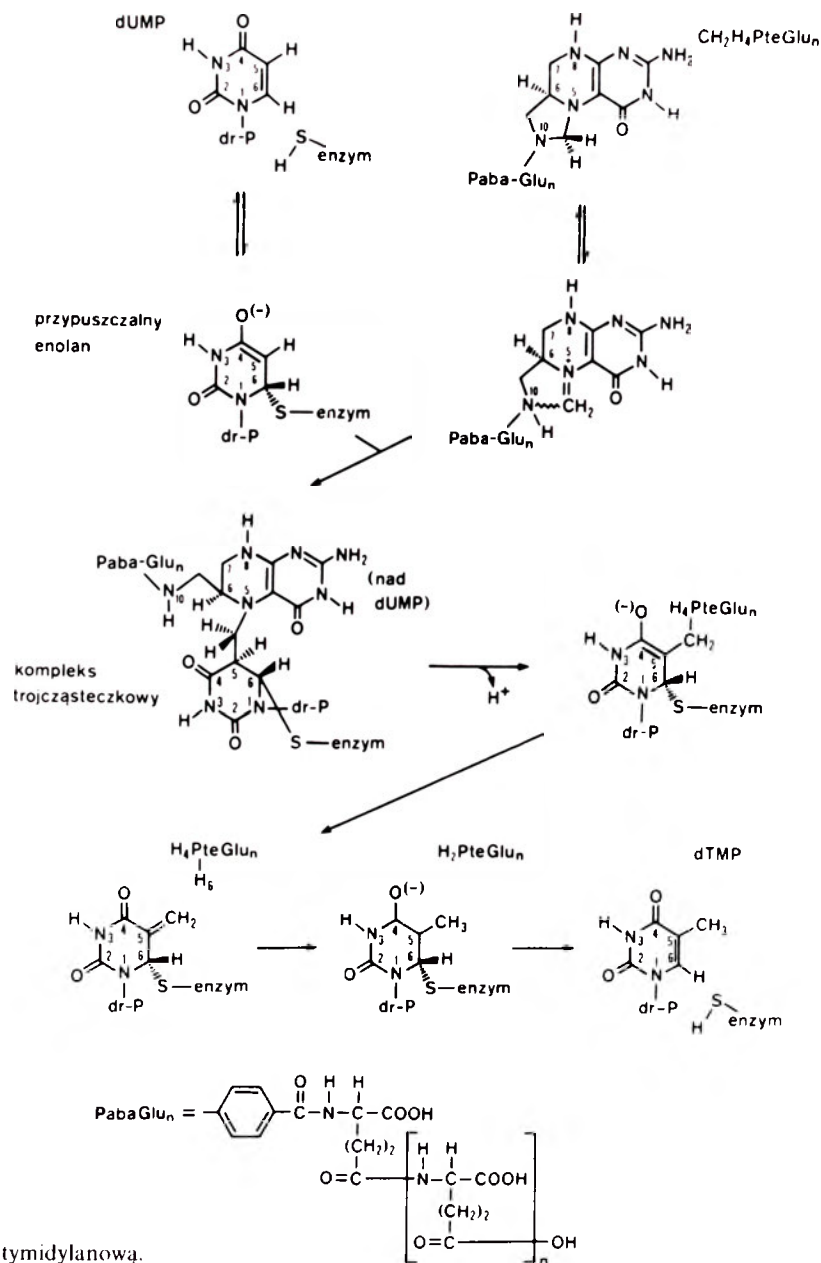
- I. Introduction
- II. Thymidylate synthase reaction mechanism
- III. Mechanisms of inhibition by dUMP analogues active in chemotherapy
- IV. Recognition of the pyrimidine ring of the substrate or its analogue by the enzyme
- V. Selectivity of inhibition by dUMP analogues of different thymidylate synthases
- VI. N^{5,10}-Methylenetetrahydrofolate analogues as thymidylate synthase inhibitors active in chemotherapy
- VII. Selectivity of inhibition by N^{5,10}-methylenetetrahydrofolate analogues of different thymidylate synthases
- VIII. Cellular regulation of thymidylate synthase expression
- IX. Thymidylate synthase inhibition and cytotoxicity

Warunkiem koniecznym skuteczności chemioterapii jest wrażliwość procesu docelowego na aktywną formę leku. Obniżenie tej wrażliwości w populacji komórek nowotworowych lub bakteryjnych, wirusów czy pasożytów jest jednym z możliwych mechanizmów powstawania oporności na lek. Z drugiej strony, różnica w zakresie omawianej wrażliwości, występująca pomiędzy któryś z wspomnianych czynników patogennych i organizmem gospodarza, może warunkować swoistość leku, czyli takie jego działanie, które niszczy patogen, oszczędzając gospodarza.

Aktywne formy leków skierowanych przeciw syntazie tymidylanowej mogą być analogami dUMP lub CH₂H₄PteGlu, a skuteczność ich działania zależy od aktywności inhibitorowej w stosunku od enzymu oraz do poziomu enzymu w komórce [8].

II. Mechanizm reakcji syntazy tymidylanowej

Syntaza tymidylanowa katalizuje reakcję poprzez utworzenie trójcząsteczkowego kompleksu substrat-enzym-kofaktor, który, po reorganizacji wiązań, rozpada się do produktu, dTMP, dihydrofolianu i enzymu (Ryc. 1). Enzym aktywuje dUMP w wyniku ataku nukleofilowego reszty cysteinowej centrum aktywnego na C₍₆₎ pierścienia pirymidynowego. Na tym etapie ujemny ładunek reszty cysteinowej jest zdelokalizowany, prawdopodobnie w kierunku grupy C₍₄₎ = O dUMP, tworząc anion enolanowy (Ryc. 1). Uważa się, że pozycja C₍₅₎ tego jonu ma charakter



Ryc. 1. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową.

silnie nukleofilowy, co ułatwia następujący teraz atak reszty metylenowej w formie jonu iminiowego powstałego w wyniku otwarcia pierścienia imidazolidynowego kofaktora. W konsekwencji powstaje kowalencyjnie związany pośrednik, trójcząsteczkowy kompleks enzymu z substratem i kofaktorem. Następnie oddysocjowuje proton z pozycji C₍₅₎ pierścienia pirymidynowego dUMP. Prowadzi to do β-eliminacji tetrahydrofolianu, który pozostaje jednak w dalszym ciągu związany niekowalencyjnie w centrum aktywnym, co umożliwi przeniesienie jonu wodorkowego (proton z dwoma elektronami; H⁻) z pozycji C₍₆₎ pterydyny. W następstwie dochodzi do redukcji grupy metylenowej na C₍₅₎ pierścienia pirymidynowego. Zakończenie reakcji wymaga regeneracji podwójnego wiązania 5,6 w pierścieniu pirymidynowym i eliminacji, której produktami są dTMP i enzym [prace przeglądowe: 9-11].

W warunkach stanu ustalonego kinetyka reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową przy udziałzie

le CH₂H₄PteGlu w formie monoglutaminianowej jest zgodna z mechanizmem sekwencyjnym uporządkowanym. Oznacza to, że dUMP wiąże się z enzymem przed kofaktorem, a dihydrofolian jest pierwszym produktem, dysocjującym przed dTMP [12-15]. Dodatkowymi dowodami wskazującymi na mechanizm uporządkowany są: wpływ podwyższonego stężenia CH₂H₄PteGlu, obniżający prędkość dysocjacji FdUMP z kowalencyjnie powiązanego kompleksu (patrz niżej) FdUMP-CH₂H₄PteGlu-enzym [16] oraz zależne od dUMP wiązanie syntazy tymidylanowej przez unieruchomione w fazie stałej analogi CH₂H₄PteGlu, umożliwiające wysoce selektywną chromatografię powinowactwa enzymu [17, 18]. Mechanizm ten pozostaje w zgodzie także z wynikami badań krystalograficznych, wskazującymi na znaczny udział pierścienia pirymidynowego dUMP w formowaniu miejsca wiązania CH₂H₄PteGlu w cząsteczce enzymu [9, 19].

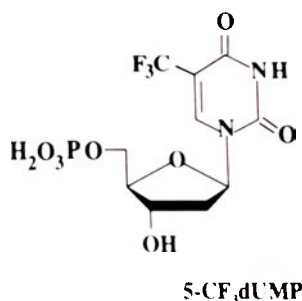
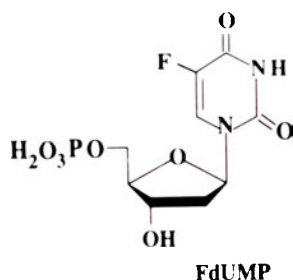
Wyniki badań, w których zastosowano CH₂H₄Pte-

Glu w formach γ -oligoglutaminianowych, wskazują na możliwość wiązania folilooligoglutaminianów z syntazą tymidylanową pod nieobecność dUMP [20]. Potwierdzają to dane krystalograficzne dowodzące istnienia struktury zawierającej analog $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$, 10-propargilo-5,8-dideazafolian (CB3717; patrz niżej), w formie γ -oligoglutaminianowej, związany z enzymem bakteryjnym w nieobecności substratu nukleotydowego [21].

III. Mechanizmy inhibicji przez analogi dUMP aktywne w chemioterapii

Dwa analogi dUMP o właściwościach silnych inhibitorów syntazy tymidylanowej, 5-fluoro-dUMP (FdUMP) i 5-(trifluorometylo)-dUMP (CF_3 dUMP), są aktywnymi formami leków stosowanych w chemioterapii, takich jak 5-fluorouracyl, 5-fluoro-2'-dezoksyurydyna (FdUrd) i 5-fluorocytozyna oraz 5-(trifluorometylo)-2'-dezoksyurydyna. Podstawą działania obu tych inhibitorów jest mechanizm reakcji katalizowanej przez syntazę tymidylanową („*mechanism-based inhibitors*”). Posiadają one na $\text{C}_{(5)}$ pierścienia pirymidynowego podstawniki ściągające elektrony (Ryc. 2), co jest wspólną cechą większości dobrych inhibitorów syntazy tymidylanowej [przegląd w cyt. 22-24].

Inhibicja enzymu przez FdUMP następuje poprzez zależne od czasu powstawania trójcząsteczkowego kompleksu syntazy tymidylanowej z FdUMP i $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$, w reakcji podobnej do tej, w której udział bierze dUMP. Reakcja z udziałem FdUMP zatrzymuje się jednak na tym etapie, ponieważ atom fluoru, obecny na $\text{C}_{(5)}$ pierścienia pirymidynowego, nie może dysocjować (wiązanie C-F jest zbyt silne). W rezultacie następuje powoli odwracalna inaktywacja enzymu [22]. Inaktywację powoduje także CF_3 dUMP, ale inhibitor wiąże się z enzymem bez udziału $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$. Atak nukleofilowej reszty cys-



Ryc. 2. Analogi dUMP aktywne w chemioterapii, 5-fluoro-dUMP i 5-trifluorometylo-dUMP.

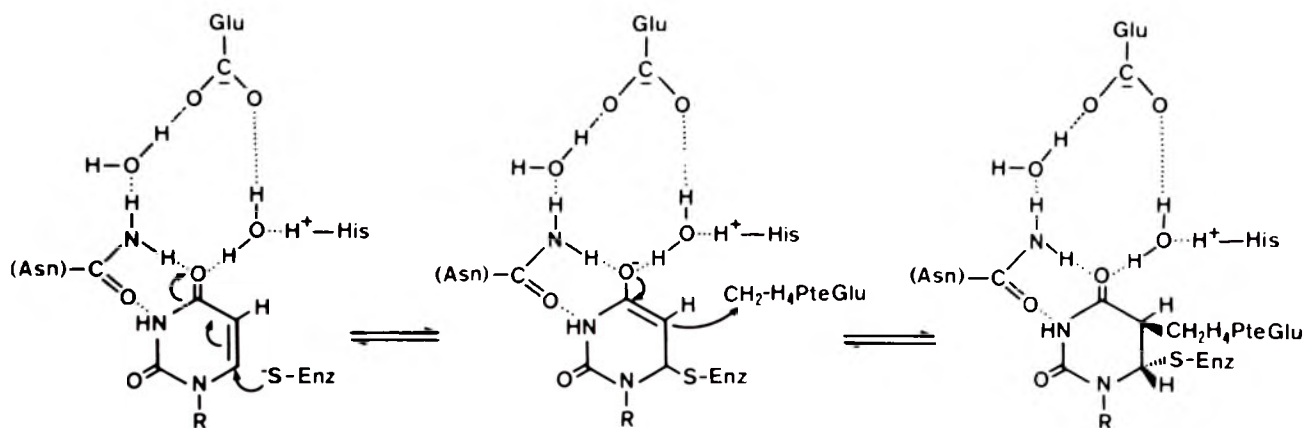
teinowej na $\text{C}_{(6)}$ pierścienia pirymidynowego prowadzi do aktywacji grupy trifluorometylowej i uwolnienia jonu fluorkowego, a następnie do reakcji powstałej grupy $\text{C}_{(5)} = \text{CF}_2$ z nukleofilem (reszta tyrozynowa) enzymu, w której wyniku powstaje kompleks powiązany kowalencyjnie [25].

IV. Rozpoznanie pierścienia pirymidynowego substratu lub jego analogu

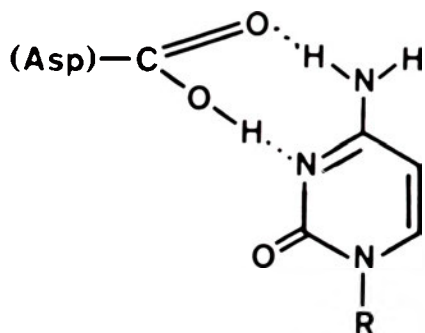
Warto tu zauważyć, że grupom $\text{C}_{(4)} = \text{O}$ i niedysocjowanej $\text{N}_{(3)}\text{-H}$, występującym w tych postaciach w pierścieniu pirymidynowym dUMP w fizjologicznym pH, przypisuje się ostatnio kluczową rolę w mechanizmie swoistości substratowej enzymu [26]. Mechanizm ten (Ryc. 3) polega na tworzeniu przez wspomniane grupy wiązań wodorowych z konserwatywną resztą asparaginową centrum aktywnego [27, 28]. Skutkiem działania tego mechanizmu jest rozróżnianie przez centrum aktywne pomiędzy dUMP i dCMP. W przypadku dUMP grupy $\text{N}_{(3)}\text{-H}$ i O^4 grają rolę, odpowiednio, donora i akceptora protonu, których to ról nie mogą grać grupy $\text{N}_{(3)}$ i N_4H_2 , obecnie w fizjologicznym pH w dCMP. Warto tu wspomnieć, że w centrum aktywnym hydroksymetylasy dezoksytydylanowej, rozpoznającej jako substrat dCMP, wspomniane grupy $\text{N}_{(3)}$ i N^{-4}H_2 pierścienia pirymidynowego tego nukleotydu grają rolę, odpowiednio, akceptora i donora protonu (Ryc. 4), tworząc wiązania wodorowe z resztą asparaginianu [29]. Co więcej, zamiana za pomocą ukierunkowanej mutageny wspomnianej reszty asparaginy na resztę sparaginianu w centrum aktywnym syntazy tymidylanowej, powoduje zmianę selektywności substratowej z dUMP na dCMP [30]. Przypuszcza się, że proces rozróżniania substratu ma związek z mechanizmem reakcji enzymatycznej [27], a wspomniana reszta asparaginowa stabilizuje - poprzez sieć wiązań wodorowych tworzonych przy udziale reszt histydynowej i glutaminianowej oraz uporządkowanych cząsteczek wody (Ryc. 3) - cząstkowy ładunek ujemny na O^4 dUMP kowalencyjnie związanego z enzymem [9]. Uzyskane przez nas dowody uzależnienia silnej, związanej z mechanizmem reakcji inaktywacji syntazy tymidylanowej przez analogi pirymidynowe, takie jak FdUMP i 4-tio-FdUMP, od niedysocjowanego stanu grupy $\text{N}_{(3)}\text{-H}$ [26], wskazują na zaangażowanie asparaginy centrum aktywnego w to oddziaływanie. W zgodzie z tym założeniem pozostaje także około tysiącrotnie słabsza inhibicja powolnego wiązania (*slow-binding inhibition*) syntazy tymidylanowej przez 5-fluoro-dCMP [31], o strukturze $\text{-N}_{(3)} = \text{C}_{(4)}\text{-NH}_2$ -, niż przez $\text{N}^{-4}\text{-OH-FdCMP}$ [32], o strukturze $\text{-N}_{(3)}\text{-H-C}_{(4)} (= \text{N-OH})$ -.

V. Selektyność inhibicji różnych syntaz tymidylanowych przez analogi dUMP

Inhibicję przez FdUMP opisują zwykle wartości K_i



Ryc. 3. Udział reszty asparaginowej centrum aktywnego syntazy tymidylanowej w powstawaniu kompleksu enzymu z dUMP i N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianem (R = 2'-dezoksyrybozo-5'-fosforan).



Ryc. 4. Udział reszty asparaginianowej, występującej w centrum aktywnym hydroksymetylasy dezoksytydylanowej, we wiązaniu dCMP.

w zakresie 10^{-9} M, ale oporność nowotworów na 5-fluorouracyl lub FdUrd może być wynikiem obecności zmienionych form syntazy tymidylanowej, mniej wrażliwych na inhibitor [14, 33-36]. Nasze niedawne badania wykazały, że zastąpienie grupy C₍₄₎=O pierścienia pirymidynowego FdUMP, przez grupę C₍₄₎=N-OH (w N⁴-hydroksy-5-fluoro-2'-dezoksytydylno-5'-monofosforanie; N⁴-OH-FdUMP) lub grupę C₍₄₎=S (w 4-tio-FdUMP) pozwala na zachowanie siły inhibicji, ale może zmienić jej selektywność w stosunku do syntaz tymidylanowych o różnym pochodzeniu i różnej wrażliwości na inhibicję przez FdUMP. W szczególności modyfikacja taka w sposób zaskakujący wpływa na oddziaływanie z parą enzymów pochodzących z komórek L1210 macierzystych i opornych na FdUrd. Enzym z komórek opornych, którego słabsza, w porównaniu z enzymem z komórek macierzystych, inhibicja przez FdUMP jest elementem mechanizmu oporności, hamowany jest podobnie, jak ten z komórek macierzystych, przez N⁴-OH-FdCMP, a silniej przez 4-tio-FdUMP [32, 37]. Podkreślić należy, że podobna zmiana wrażliwości nie zachodziła w przypadku podstawienia 2-tio, czyli w 2-tio-FdUMP [37]. Zjawisko to wydaje się być skutkiem jakiegoś współdziałania, którego natura pozostaje nieznana, pomiędzy podstawnikami na C₍₄₎ i C₍₅₎ w ich oddziaływaniu z enzymem [32, 37, przegląd: 38]. W przypadku N⁴-OH-FdCMP wysunięto przypuszczenie, że to współdziałanie może być wynikiem powstawania wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodo-

rowego (N⁴-O-H...F-C₍₅₎) pomiędzy grupami N⁴-OH i C₍₅₎-F, wpływającego na równowagę rotamerów *syn* i *anti* (w stosunku do N₍₃₎) wokół wiązania C₍₄₎-N⁴, której występowanie zakładano, poprzez stabilizację aktywnej inhibitorowo formy *anti* [32]. Jednak wyniki obliczeń *ab initio*, wykonanych metodami mechaniki kwantowej, zaprzeczyły możliwości występowania takiego mechanizmu [39]. Biorąc to ostatnie pod uwagę, na selektywność inhibicji szczególnie wpływ wydaje się wywierać podstawnik na C₍₄₎. Inaktywacja przez zarówno N⁴-OH-FdUMP lub 4-tio-FdUMP, jak i FdUMP, polega na utworzeniu trójcząsteczkowego kompleksu enzym-CH₂H₄PteGlu-inhibitor. Zastąpienie grupy C₍₄₎=O (w FdUMP) grupą C₍₄₎=N-OH (w N⁴-OH-FdUMP) lub C₍₄₎=S (w 4-tio-FdUMP) wpływa na ten proces, najprawdopodobniej uwrażliwiając jego przebieg na występowanie w centrach aktywnych syntaz tymidylanowych różnicy (różnic) wśród niekonserwatywnych reszt aminokwasowych.

Przeprowadzone ostatnio metodami mechaniki kwantowej obliczenia *ab initio*, badające potencjalne znaczenie dla wyżej omówionego zjawiska CH₂H₄PteGlu związanego w centrum aktywnym, pokazały możliwość występowania oddziaływania, poprzez wiązanie wodorowe, pomiędzy grupą C₍₄₎=O lub jej modyfikacją pierścienia pirymidynowego i atomem azotu N₍₁₀₎ CH₂H₄PteGlu, który wydaje się być uwikłany w abstrakcję protonu z C₍₅₎dUMP. Oddziaływanie to, poprzez wrażliwość na niekonserwatywne reszty aminokwasowe centrum aktywnego, mogłoby różnicować inhibicję enzymu o różnym pochodzeniu analogami dUMP podstawionymi na C₍₄₎ [40].

VI. Analogi N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu jako inhibitory syntazy tymidylanowej aktywne w chemioterapii

Ostatnio duże nadzieje na zastosowanie w chemioterapii nowotworów budzą analogi CH₂H₄PteGlu, które są bardzo dobrymi inhibitorami syntazy tymidylanowej o silnych właściwościach cytotoksycznych, z których kilka zatwierdzono do prób klinicznych [8, 41-43 i prace cytowane w 43].

Analogów takich poszukiwano od dawna, ponieważ mają one potencjalną przewagę, z punktu widzenia inhibicji syntazy tymidylanowej w komórce, nad FdUMP. Ten ostatni prowokuje oporność metaboliczną [44], będącą konsekwencją nagromadzenia, w wyniku zahamowania aktywności syntazy tymidylanowej, jej substratu, dUMP, przeciwdziałającego inhibicji przez współzawodniczący z substratem FdUMP [4, 45]. Ponadto, inhibicja przez FdUMP zależy od stężenia $\text{CH}_2\text{H}_4\text{PteGlu}$ lub jego oligoglutaminianowych pochodnych. Ich stężenie jest zwykle w komórkach ssaczych niskie, mogące ograniczyć wiązanie inhibitora z enzymem [praca przeglądowa: 5], a jednocześnie nie ulega ono podwyższeniu na skutek inhibicji syntazy tymidylanowej, ponieważ zredukowane formy folianu pozostają w komórce w równowadze [46].

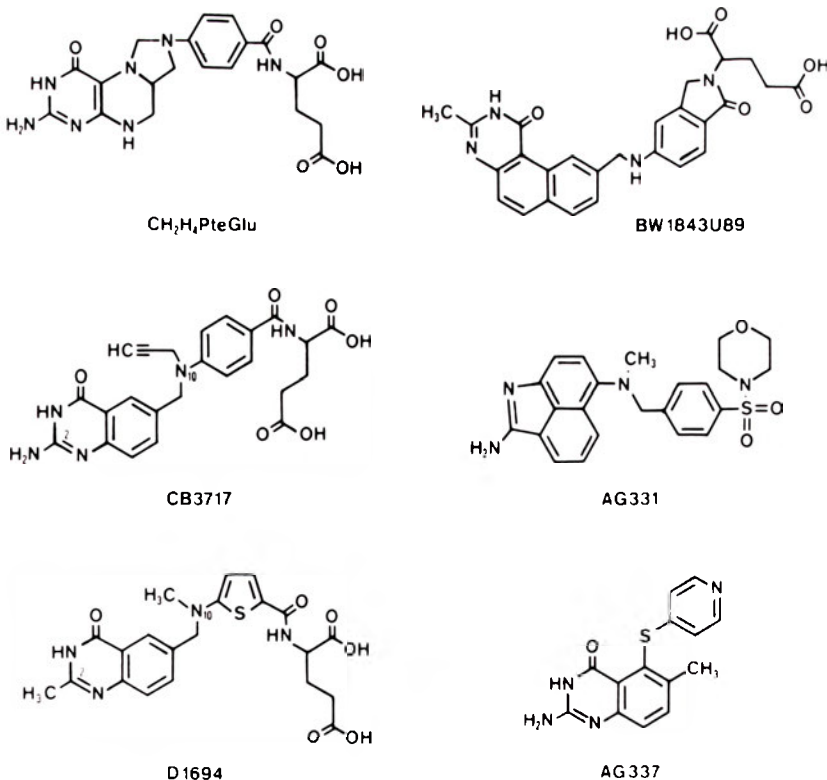
Pierwszym antyfolianem o właściwościach inhibitora syntazy tymidylanowej, dopuszczonym do badań klinicznych, był związek oznaczony symbolem CB 3717 (10-propargilo-5,8-dideazafolian; Ryc. 5) [praca przeglądowa: 5, 41]. Znaczej aktywności przeciwnowotworowej, stwierdzonej w stosunku do różnych nowotworów ludzkich, towarzyszyły niestety niepożądane efekty uboczne, w postaci hepatotoksyczności i nefrotoksyczności, będące skutkami słabej rozpuszczalności tego analogu [47]. Dlatego CB 3717 nie stał się lekiem. Podjęto jednak badania nad modyfikacją jego struktury, które doprowadziły do znacznego poprawienia rozpuszczalności, przy zachowaniu podobnych właściwości inhibitorowych w stosunku do syntazy tymidylanowej oraz aktywności przeciwnowotworowej, poprzez zamianę grupy aminowej w pozycji $\text{C}_{(2)}$ na atom wodoru lub grupę metylową [48]. Szczególnie silna inhibicja wzrostu komórek nowo-

tworowych towarzyszyła podstawieniu grupą 2-metylową [49], prawdopodobnie w związku z bardziej efektywnym przekształcaniem pochodnej 2-metylowej przez syntetazę folilopoliglutaminianową do form γ -oligoglutaminianowych, nie podlegających, w odróżnieniu do formy monoglutaminianowej, transportowi z komórki przez błonę komórkową na zewnątrz [50]. Ważną cechą form γ -oligoglutaminianowych zarówno CB3717 jak i wspomnianych $\text{C}_{(2)}$ -pochodnych jest znacznie silniejsza (do dwóch rzędów wielkości), w porównaniu z formami monoglutaminowymi (wartości K_i w zakresie nM), inhibicja ciasnego wiązania [51] syntazy tymidylanowej [52-54].

Konsekwencją analizy powyższych wyników były syntezy licznych pochodnych 10-propargylo-2-dezamino-5,8-dideazafolianu, zmodyfikowanych w pozycjach $\text{C}_{(2)}$, N^{10} lub w reszcie benzoilowej. Poszukiwano dobrze rozpuszczalnego, jak najsilniejszego inhibitora syntazy tymidylanowej, który byłby dobrym substratem syntetazy folilopoliglutaminianowej. W rezultacie tych poszukiwań [przeгляд: 55] powstała pochodna N^{10} -metylotiofenowa, D1694 (Ryc. 5), podlegająca obecnie II fazie prób klinicznych.

Inną grupę antyfolianów stanowią pochodne benzochinazoliny, spośród których do badań klinicznych wybrano związek BW1843U89 (Ryc. 5), rozpuszczalny, bardzo silny (K_i w zakresie 0.1 nM) inhibitor syntazy tymidylanowej, badany obecnie jako potencjalny lek przeciwnowotworowy [56].

Szczegółowe badania struktury krystalicznej syntazy tymidylanowej, a zwłaszcza jej kompleksów z dUMP lub FdUMP oraz $\text{N}^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianem lub jego analogiem [przeгляд: 11], a także rozwój techniki iteracyjnej analizy krystalograficznej



Ryc. 5. Inhibitory syntazy tymidylanowej, analogi $\text{N}^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianu, dopuszczone do badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe.

białka [57], umożliwiły zaprojektowanie szeregu nowych struktur potencjalnych inhibitorów syntazy tymidylanowej. Synteza tych związków, których przykładami dopuszczonymi do badań klinicznych jako potencjalne leki przeciwnowotworowe są pochodne 2,6-diaminobenzo[*cd*]indolowe, AG331 i AG337 (Ryc. 5), potwierdziła (wartości K_i w zakresie 1-10 nM) przewidywania na temat ich silnych właściwości inhibitorowych [58, 59]. Związki te nie posiadają reszty glutaminianowej, a więc korzystają z innej (bez udziału nośnika) niż analogi posiadające taką resztę (transport nośnikowy) drogi transportu przez błonę komórkową. Nie mogą one też ulegać poliglutamylacji. Dlatego inhibitory te są kandydatami na leki aktywne w stosunku do komórek nowotworowych opornych na antyfoliany poprzez ich upośledzony transport nośnikowy przez błony lub mało aktywną poliglutamylację.

VII. Selektyność inhibicji różnych syntaz tymidylanowych przez analogi N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu

Nieliczne opublikowane wyniki badań porównawczych enzymu o różnym pochodzeniu wskazują na istnienie wpływu oligoglutamylacji „klasycznych” (tzn. posiadających resztę glutaminianową), analogów CH₂H₄PteGlu na wybiórczą inhibicję syntazy tymidylanowej [15, 60].

VIII. Regulacja ekspresji syntazy tymidylanowej w komórce

Poziom syntazy tymidylanowej może być parametrem prognostycznym z punktu widzenia planowanej chemioterapii skierowanej przeciw temu enzymowi [61], jako że podwyższona ekspresja białka enzymatycznego pozostaje w prostej korelacji z opornością na leki skierowane przeciw temu enzymowi [62-65].

Poziom syntazy tymidylanowej jest znacznie wyższy w komórkach proliferujących niż pozostających w fazie G₀ [praca przeglądowa: 2], przy czym wydaje się to pozostawać w związku raczej z faktem proliferacji, czyli opuszczenia fazy G₀, niż z którąkolwiek z faz cyklu komórkowego [66]. Regulacja poziomu mRNA syntazy tymidylanowej rozgrywa się prawdopodobnie w większym stopniu na etapie potranskrypcyjnym, niż na transkrypcyjnym, przy czym prawidłowy przebieg regulacji wymaga połączonego udziału zarówno promotora genu syntazy tymidylanowej, jak i intronów [praca przeglądowa: 67]. Wyniki ostatnich badań sugerują, że to proces wycinania intronów, a nie sekwencje w nich zawarte, jest dla tej regulacji istotny [68].

Ekspresja genu omawianego enzymu regulowana jest także na etapie translacji, ponieważ białko syntazy tymidylanowej może blokować translację swojego własnego mRNA poprzez związanie go. Blok ten jest zwalniany w obecności substratów enzymu lub ich analogów, co tłumaczy wzrost stężenia syntazy tymi-

dylanowej w komórkach poddanych działaniu jej inhibitorów [praca przeglądowa: 67]. Warto tu wspomnieć, że jednym z możliwych mechanizmów obserwowanego wpływu interferonu- γ potęgującego cytotoksyczne działanie 5-fluorouracylu (jego aktywną formą jest m.in. 5-fluoro-dUMP) jest przeciwdziałanie wzrostowi stężenia enzymu na skutek autoregulacji translacji [69, 70].

Ostatnio opublikowane wyniki wskazujące na bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy mRNA protoonkogeny *c-myc* a białkiem syntazy tymidylanowej, oddziaływującym także z własnym mRNA, sugerują, że RNA *c-myc* ma udział w regulacji translacji tego enzymu oraz że białko syntazy tymidylanowej jest zaangażowane w regulację szeregu innych genów komórkowych [71].

IX. Inhibicja syntazy tymidylanowej a cytotoksyczność

Inhibicja syntazy tymidylanowej powoduje „śmierć beztyminową” komórki. Efektem bezpośrednim oddziaływania inhibitorów enzymu jest nagromadzenie w komórce dUMP, po czym następuje zmasowane włączenie tego nukleotydu (substratem polimerazy DNA staje się dUTP, którego hydroliza do dUMP ulega zahamowaniu) do DNA. Zjawisko to, na skutek wycinania uracylu (pod nieobecność dTTP nie może być zastąpiony tyminą) z DNA, prowadzi do fragmentacji tego ostatniego [praca przeglądowa: 2]. Ostatnio wydaje się jednak, że z punktu widzenia mechanizmu cytotoksyczności jest to dopiero faza wstępna. Stwierdzono, że inhibitory biosyntezy DNA, do których należą także inhibitory syntazy tymidylanowej, powodują śmierć komórek dopiero po pewnym okresie ich „niezrównoważonego wzrostu”, w czasie którego konieczna jest np. aktywna biosynteza białek. Obserwacja ta pozwoliła sformułować hipotezę, zgodnie z którą powodem śmierci komórki nie jest biochemiczne działanie inhibitora samo w sobie, ale będące jego następstwem rozprężenie cyklu komórkowego [72]. Rozprężenie to prowadzi do apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki [praca przeglądowa: 73], co tłumaczy, dlaczego bardzo różne inhibitory wzrostu, oddziałujące na różne procesy docelowe, powodują śmierć komórki poprzedzoną podobnymi objawami (endonukleolityczna hydroliza DNA, zmiany kondensacji chromatyny), a także sugeruje, że cytotoksyczność jest warunkowana zdolnością komórki do włączenia procesu apoptozy. W konsekwencji szczególnego znaczenia nabiera mechanizm sprzężenia bodźca, jakim jest oddziaływanie lek-cel (np. enzym docelowy) z reakcją, jaką jest śmierć komórki, ponieważ od tego mechanizmu zależy prawdopodobnie wrażliwość (oporność) komórki na lek, a te produkty genów, które realizują to sprzężenie, mogą się stać także celami dla leków nowego typu [73]. Ważnym przykładem takiego produktu genu, który wpływa zarówno na przebieg

cyklu komórkowego jak i na apoptozę, jest białko p53 [praca przeglądowa: 74]. Stwierdzono, że ekspresja tego białka jest potrzebna dla wywołania apoptozy działaniem leków, w tym 5-fluorouracylu [75]. Jednak zdolność p53 do wywoływania apoptozy ma prawdopodobnie związek z jego częstym unieczynnianiem, poprzez mutację, w procesie transformacji nowotworowej. Stąd te same zmiany genetyczne, które prowadzą do utraty zdolności do apoptozy w rozwoju nowotworu, mogą powodować oporność na różne leki przeciwnowotworowe, których skuteczność zależy właśnie od zajścia apoptozy [74]. Tak więc dalszy rozwój chemioterapii, także tej, której enzymem docelowym jest syntaza tymidylanowa, a w szczególności rozwiązanie problemu oporności, jest w dużym stopniu uzależniony od poznania molekularnego mechanizmu programowanej śmierci komórki.

Artykuł otrzymano 16 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

- Santi DV, Danenberg PV (1984) W: Blakley RL, Benkovic SJ (red) t. 1, Wiley, New York, str. 345-398
- Rode W (1986) *Post Biochem* **32**: 401-420
- Danenberg PV (1977) *Biochim Biophys Acta* **473**: 73-92
- Heidelberger C, Danenberg PV, Moran RG (1983) *Adv Enzymol* **54**: 57-119
- Jackman AL, Jones TR, Calvert AH (1985) W: Muggia FM (red) *Experimental and Clinical Progress in Cancer Chemotherapy*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, str. 155-210
- Douglas KT (1987) *Med Res Rev* **7**: 441-475
- Rathod PK, Leffers NP, Young RD (1992) *Antimicrob Agents Chemother* **36**: 704-711
- Van der Wilt CL, Peters GJ (1994) *Pharmacy World Sci* **16**: 84-103
- Matthews DA, Villafranca JE, Janson CA, Smith WW, Welsh K, Freer S (1990) *J Mol Biol* **214**: 937-948
- Stroud RM, Finer-Moore JS (1993) *FASEB J* **7**: 671-677
- Carreras CW, Santi DV (1995) *Annu Rev Biochem* **64**: 721-762
- Daron HH, Aull JL (1978) *J Biol Chem* **253**: 940-945
- Lorenson MY, Maley GF, Maley F (1967) *J Biol Chem* **242**: 3332-3344
- Jastreboff MM, Kędzierska B, Rode W (1983) *Biochem Pharmacol* **32**: 2259-2267
- Cieśla J, Gołos B, Dzik JM, Pawełczak K, Kempny M, Makowski M, Bretner M, Kulikowski T, Machnicka B, Rode W (1995) *Biochim Biophys Acta* **1249**: 127-136
- Danenberg PV, Danenberg KD (1978) *Biochemistry* **17**: 4018-4024
- Slavik K, Rode W, Slavikova V (1976) *Biochemistry* **15**: 4222-4227
- Rode W, Scanlon KJ, Hynes J, Bertino JR (1979) *J Biol Chem* **254**: 11538-11543
- Montfort WR, Perry KM, Fauman EB, Finer-Moore JS, Maley G, Hardy L, Maley F, Stroud RM (1990) *Biochemistry* **29**: 6964-6977
- Lu YZ, Aiello PD, Matthews RG (1984) *Biochemistry* **23**: 6870-6876
- Kamb A, Finer-Moore JS, Stroud RM (1992) *Biochemistry* **31**: 12876-12884
- Lewis CA Jr, Dunlap RB (1981) W: Burgen ASV, Roberts GCK (red) *Topics in Molecular Pharmacology*. Elsevier/North-Holland Biochemical, New York, str. 170-219
- Santi DV (1980) *J Med Chem* **23**: 103-111
- De Clercq E, Balzarini J, Torrence PF, Mertes MP, Schmidt CL, Shugar D, Barr PJ, Jones AS, Verhelst G, Walker RT (1981) *Mol Pharmacol* **19**: 321-330
- Eckstein JW, Foster PG, Finer-Moore J, Wataya Y, Santi DV (1994) *Biochemistry* **33**: 15086-15094
- Dzik JM, Kulikowski T, Zieliński Z, Cieśla J, Rode W, Shugar D (1987) *Biochem. Biophys Res Commun* **149**: 1200-1207
- Hardy LW, Nalivaika E (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9725-9729
- Liu L, Santi DV (1992) *Biochemistry* **31**: 5100-5104
- Graves KL, Butler MM, Hardy LW (1992) *Biochemistry* **31**: 10315-10321
- Hardy LW, Nalivaika E (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9725-9729
- Liu L, Santi DV (1994) *Biochim Biophys Acta* **1209**: 89-94
- Rode W, Zieliński Z, Dzik JM, Kulikowski T, Bretner M, Kierdaszuk B, Cieśla J, Shugar D (1990) *Biochemistry* **29**: 10835-10842
- Heidelberger C, Kaldor G, Mukherjee KL, Danenberg PB (1960) *Cancer Res* **20**: 903-909
- Bapat AR, Zarow C, Danenberg PV (1983) *J Biol Chem* **258**: 4130-4136
- Berger SH, Barbour KW, Berger FG (1988) *Mol Pharmacol* **34**: 480-484
- Zieliński Z, Dzik JM, Rode W, Kulikowski T, Bretner M, Kierdaszuk B, Shugar D (1990) W: Curtius H-Ch, Ghisla S, Blau N (red) *Chemistry and Biology of Pteridines 1989. Pteridines and Folic Acid Derivatives*. Walter de Gruyter, str. 817-820
- Dzik JM, Zieliński Z, Cieśla J, Bretner M, Kulikowski T, Shugar D, Bertino JR, Rode W (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 1301-1308
- Rode W (1993) *Acta Biochim Pol* **40**: 363-368
- Leś A, Adamowicz L, Rode W (1993) *Biochim Biophys Acta* **1173**: 39-48
- Rode W, Leś A (1996) *Acta Biochim Pol* **43**: 133-142
- Rosowsky A (1992) *Am J Pharmaceut Edu* **56**: 453-463
- Fleming GF, Schilsky RL (1992) *Seminars Oncol* **19**: 707-719
- Varney MD, Palmer CL, Deal JG, Webber S, Welsh KM, Bartlett CA, Morse CA, Smith WW, Janson CA (1995) *J Med Chem* **38**: 1892-1903
- Christopherson RI, Duggleby RG (1983) *Eur J Biochem* **134**: 331-335
- Berger SH, Hakala MT (1984) *Mol Pharmacol* **25**: 303-309
- Krebs HA, Hems R, Tyler B (1976) *Biochem J* **158**: 341-353
- Harrap KR, Jackman AL, Newell DR, Taylor GA, Hughes LR, Calvert AH (1989) *Adv Enz Regul* **29**: 161-179
- Jones TR, Thornton TJ, Flinn A, Jackman AL, Newell DR, Calvert AH (1989) *J Med Chem* **32**: 847-852
- Jackman AL, Newell DR, Gibson W, Jodrell DI, Taylor GA, Bishop JA, Hughes LR, Calvert AH (1991) *Biochem Pharmacol* **42**: 1885-1895
- Moran RG, Colman PD, Jones TR (1989) *Mol Pharmacol* **36**: 736-743
- Morrison JF (1982) *Trends Biochem Sci* **7**: 102-105
- Cheng YC, Dutschman GE, Starnes MC, Fisher MH, Nanavathi NT, Nair MG (1985) *Cancer Res* **45**: 598-600
- Nair MG, Nanavathi NT, Nair IG, Kisliuk RL, Gaumont Y, Hsiao MC, Kalman TI (1986) *J Med Chem* **29**: 1754-1760
- Jackman AL, Newell DR, Gibson W, Jodrell DI, Taylor GA, Bishop JA, Hughes LR, Calvert AH (1991) *Biochem Pharmacol* **42**: 1885-1895
- Jackman AL, Marsham PR, Moran RG, Kimbell R, O'Connor BM, Hughes LR, Calvert AH (1991) *Adv Enz Regul* **31**: 13-27
- Duch DS, Banks S, Dev IK, Dickerson SH, Ferrone R, Heath LS i wsp. (1993) *Cancer Res* **53**: 810-818
- Verlinde CLMJ, Hol WGH (1994) *Structure* **2**: 577-587

58. Varney MD, Marzoni GP, Palmer CL, Deal JG, Webber S, Welsh KM, Bacquet RJ, Barlett CA, Morse CA, Booth CLJ, Herrmann SM, Howland EF, Ward RW, White J (1992) *J Med Chem* **35**: 663-676
59. Appelt K, Bacquet RJ, Bartlett CA, Booth CLJ, Freer ST, Fuhry MM, Gehring MR, Herrmann SM, Howland EF, Janson CA, Jones TR, Kan C, Kathardekar V, Lewis KK, Marzoni GP, Matthews DA, Mohr C, Moomaw EW, Morse CA, Oatley SJ, Ogden RC, Reddy MR, Reich SH, Schoettlin WS, Smith WW, Varney MD, Villafrañca JE, Ward RW, Webber S, Webber SE, Welsh KM, White J (1991) *J Med Chem* **34**: 1925-1934
60. Maley GF, Maley F, Baugh CM (1979) *J Biol Chem* **254**: 7485-7487
61. Peters GJ, Van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnston PG, van Groeningen CJ, Pinedo HM (1995) *Eur J Cancer* **31A**: 1299-1305
62. Johnston PG, Lenz H-J, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L (1995) *Cancer Res* **55**: 1407-1412
63. Omura K, Kawakami K, Kanehira E, Nagasato A, Kawashima S, Tawarayama K, Watanabe S-i, Hirano K, Shirasaka T, Watanabe Y (1995) *Cancer Res* **55**: 3897-3901
64. Lu K, Yin M-B, McGuire JJ, Bonmassar E, Rustum Ym (1995) *Biochem Pharmacol* **50**: 391-398
65. Copur S, Aiba K, Drake JC, Allegra CJ, Chu E (1995) *Biochem Pharmacol* **49**: 1419-1426
66. Pestalozzi BC, McGinn CJ, Kinsella TJ, Drake JC, Glennon MC, Allegra CJ, Johnston PG (1995) *British J Canc* **71**: 1151-1157
67. Johnson LF (1994) *J Cell Biochem* **54**: 387-392
68. Ke Y, Ash J, Johnson LF (1996) *Mol Cell Biol* **16**: 376-383
69. Chu E, Zinn S, Boarman D, Allegra CJ (1990) *Cancer Res* **50**: 5834-5840
70. Chu E, Voeller DM, Johnston PG, Allegra CJ (1993) *Mol Pharmacol* **43**: 527-533
71. Chu E, Voeller DM, Jones KL, Takechi T, Maley GF, Maley F, Segal S, Allegra CJ (1994) *Mol Cell Biol* **14**: 207-213
72. Kung AL, Zetterberg A, Sherwood SW, Schimke RT (1990) *Cancer Res* **50**: 7307-7317
73. Hickman JA (1992) *Cancer Metastasis Rev* **11**: 121-139
74. Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ (1995) *Cancer Metastasis Rev* **14**: 3-15
75. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE (1993) *Cell* **74**: 957-967

*Pani Profesor Zofii Zielińskiej
z wyrazami najgłębszego szacunku, podziwu i sympatii
Pracownia Przekazników Sygnałów*

Przekazywanie informacji w komórce. Fosfolipidy jako cząsteczki sygnałowe

Signal transduction in the cell. Phospholipids as messenger molecules

JOLANTA BARAŃSKA¹,
RAFAŁ CZAJKOWSKI²,
MAŁGORZATA CZARNY³,
PAWEŁ SABAŁA⁴,
MAGDALENA WIKTOREK⁵

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Fosfolipazy aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe
- III. Rola PKC i Ca²⁺ w koordynacji współdziałania fosfolipaz

Contents:

- I. Introduction
- II. Extracellular signal-activated phospholipases
- III. Role of PKC and Ca²⁺ in coordinating activation of phospholipases

Wykaz stosowanych skrótów: DAG — diacyloglicerol; EGF — naskórkowy czynnik wzrostu; FA — kwasy tłuszczowe; GAP — białko aktywujące GTPazę (ang. *GTPase activating protein*); GDS — stymulator dysocjacji nukleotydów guaninowych białka Ral (ang. *guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral*); GIP — białko hamujące GTPazę; InsP₃ — trisfosfoinozytol; LPC — lizofosfatydylocholina; PDGF

¹ Doc. dr hab., ² student UW, ^{3,4} mgr, ⁵ mgr inż., Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

— czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi; PIC — fosfoinozytydaza C; PKC — kinaza białkowa C; PLA₂ — fosfolipaza A₂; PLC — fosfolipaza C; PLD — fosfolipaza D; PS — fosfatydyloseryna; PtdInsP₂ — fosfatydyloinozytolo-(4,5)-bisfosforan.

I. Wprowadzenie

Działanie zewnętrznych bodźców, jak np. hormonów, neurotransmiterów czy czynników wzrostu na specyficzne białka receptorowe znajdujące się w błonie plazmatycznej komórki, powoduje serię zdarzeń prowadzących do powstania wtórnych przekaźników informacji, a w konsekwencji konkretnych efektów biologicznych.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich 10 lat zwróciły uwagę na rolę fosfolipidów w procesach przekazywania informacji w komórce. Wykazały, że fosfolipidy są nie tylko ważnymi elementami budulcowymi błon biologicznych, lecz że są także potencjalnymi nośnikami informacji. Przeniesienie sygnału przez błonę komórkową zachodzi na drodze aktywacji fosfolipaz, które hydrolizując fosfolipidy prowadzą do powstania i uwolnienia do wnętrza komórki wtórnych przekaźników sygnałów. Współdziałanie enzymów hydrolizujących fosfolipidy, fosfolipaz, może w efekcie prowadzić do wzmocnienia lub osłabienia (modulacji) sygnału.

W obecnym artykule pragniemy przedstawić szlaki przekazywania sygnałów związane z działaniem fosfolipaz C, D i A₂ na fosfolipidy inozytolo- i fosfatydylocholine. W piśmiennictwie polskojęzycznym pojawiło się ostatnio wiele artykułów przeglądowych dotyczących procesów przekazywaniem informacji w komórce [1-16]*, dlatego też pragniemy przedstawić jedynie najnowsze informacje z tej tak gwałtownie rozwijającej się dziedziny wiedzy.

II. Fosfolipazy aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe

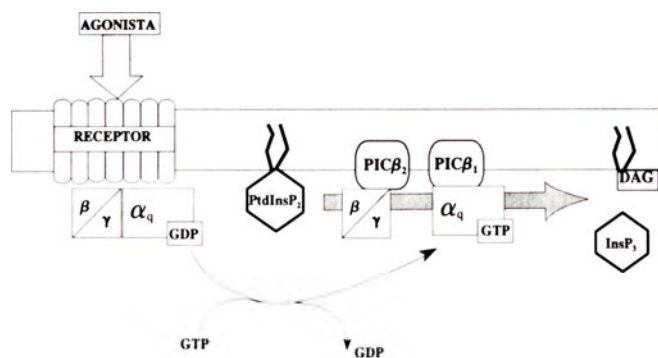
Spośród wszystkich fosfolipaz aktywowanych przez substancje sygnałowe do najlepiej poznanych należy fosfolipaza C działająca specyficznie na fosfolipidy inozytolo- i fosfoinozytydaza C (PIC) [17, 18]. Opisa- no i oczyszczono 9 izoenzymów PIC. Na podstawie homologii sekwencji aminokwasowej izoenzymy te podzielono na trzy typy — β (3 izoformy), γ (2 izoformy) i δ (4 izoformy) [19, 20].

Przebieg wydarzeń, prowadzących od aktywacji komórki przez agonistę do hydrolizy fosfolipidów inozytolo- i fosfoinozytolo- jest obecnie dobrze poznany [1, 7, 10, 16, 22]. Wiadomo zatem, że w zaktywowanej komórce, PIC działa głównie na fosfolipid inozytolo- i fos-

fatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan (PtdInsP₂). W wyniku jego hydrolizy powstają w komórce dwa wtórne przekaźniki informacji: trisfosfoinozytol (InsP₃) i diacylglicerol (DAG). Są one odpowiedzialne, odpowiednio, za uwalnianie Ca²⁺ z wewnątrzkomórkowych magazynów i aktywację kinazy białkowej C (PKC) [10, 16, 21, 22]. Mechanizm aktywacji różnych typów PIC, a szczególnie izoenzymów typu β i γ jest dość dobrze poznany [16, 17, 21-23]. Nie wiadomo natomiast w jaki sposób aktywowana jest PICδ. Wydaje się, że w odróżnieniu od dwóch pozostałych typów, PICδ jest enzymem działającym na terenie jądra komórkowego [15, 24].

Ryciny 1 i 2 ilustrują mechanizm działania PICβ i PICγ na PtdInsP₂. Przedstawione procesy zachodzą w błonie plazmatycznej komórek. Fosfoinozytydaza typu β aktywowana jest przez agonistów działających na receptory błony plazmatycznej charakteryzujące się obecnością 7 domen transbłonowych (Ryc. 1) [16, 22]. Receptory te związane są z białkami G [4, 14, 16, 22, 25]*. Białka G są zbudowane z trzech różnych podjednostek, z których podjednostka α zawiera bądź związany do niej GDP (forma nieaktywna), bądź GTP. Po związaniu agonisty z receptorem następuje aktywacja białka G na drodze wymiany GDP na GTP i dysocjacja podjednostki α od kompleksu podjednostek βγ (Ryc. 1, 2). Zarówno podjednostka α białek G, jak i kompleks podjednostek βγ, posiadają zdolność do aktywacji określonych białek efektorowych [4, 14, 22, 25]. Rycina 1 pokazuje, że podjednostka α białka G_q, jak i kompleks βγ aktywują izoformy β₁ i β₂ PIC. Zaktywowane różne izoformy PICβ działają hydrolytycznie na ten sam fosfolipid — PtdInsP₂, następuje zatem wzmocnienie sygnału [22].

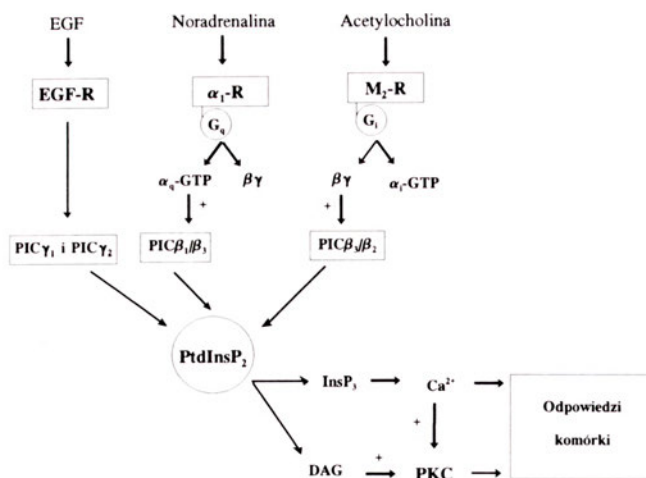
Wydaje się, że aktywacja PICβ może być regulowana przez różne izoenzymy białek G. Sklonowano geny wielu podjednostek białek G; znanych jest co najmniej



Ryc. 1. Schemat powstawania wtórnych przekaźników informacji w komórce po aktywacji receptora związanego z białkiem G. Objasnienia skrótów zawarto w wykazie zamieszczonym pod spisem treści.

*Czytelnikom zainteresowanym zagadnieniem przekazywania informacji w komórce polecamy książkę pt. „Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce”. Konarska L (red.), Warszawa: PWN, 1995, 1-230.

*Budowa, działanie, właściwości i podział białek G zostały ostatnio wyczerpująco omówione w artykułach: J. B a r a n s k a (1994) *Post Biol Kom* 21: 479-488; J. K w i a t k o w s k a - K o r c z a k (1995) W: *Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce*. Konarska L. (red.), Warszawa: PWN: 104-117.



Ryc. 2. Mechanizmy regulujące aktywację fosfoinozytydazy C typu β i γ ($\text{PIC}\beta$ i $\text{PIC}\gamma$), wg [19] (ryc. zmodyfikowana). Izoformy $\text{PIC}\beta$ są regulowane poprzez podjednostki białka G. Noradrenalina działając na receptor adrenergiczny α_1 ($\alpha_1\text{-R}$) powoduje aktywację $\text{PIC}\beta_1$ i $\text{PIC}\beta_3$ poprzez podjednostkę α białka G zawierającą związaną z nią GTP. Stymulacja receptora muskarynowochoolinergicznego typu M_2 ($M_2\text{-R}$) przez acetylcholinę powoduje aktywację izoformy $\text{PIC}\beta_3$ i $\text{PIC}\beta_2$ poprzez kompleks podjednostek $\beta\gamma$ białka G_i , wrażliwego na toksyny bakteryjne. Izoformy $\text{PIC}\gamma$ są aktywowane w wyniku fosforylacji przez kinazę tyrozynową, która stanowi integralną część receptora czynników wzrostu (EGR-R). Zaktywowane $\text{PIC}\beta$ i $\text{PIC}\gamma$ działają na fosfolipid inozytolowy PtdInsP_2 powodując powstanie wtórnych przekaźników informacji — trisfosfoinozytolu (InsP_3) i diacyloglicerolu (DAG) aktywującego kinazę białkową C (PKC).

21 izoform podjednostek α , 4 izoformy β i 6 izoform γ [14, 25]. $\text{PIC}\beta_1$ i $\text{PIC}\beta_3$ są aktywowane przez podjednostkę α białek G, niewrażliwych na toksyny bakteryjne (np. podjednostka α_q , Ryc. 1 i 2) [26-28]. W wyniku stymulacji receptorów adrenergicznych α_1 przez noradrenalinę następuje aktywacja $\text{PIC}\beta_1$ i $\text{PIC}\beta_3$ przez podjednostkę α_q białka G_q związanego z tym receptorem [19, 29] (Ryc. 2). Aktywacja receptora muskarynowego M_2 przez acetylcholinę prowadzi do aktywacji $\text{PIC}\beta_3$ i $\text{PIC}\beta_2$ przez kompleks podjednostek $\beta\gamma$ białka G_i [19, 28]. W tym przypadku podjednostka α_i białka G_i hamuje cyklazę adenylanową. Podane powyżej przykłady ilustrują mechanizmy regulujące aktywację izoenzymów $\text{PIC}\beta$ na poziomie zarówno bodźca działającego na receptor, jak i białka G, związanego z tym receptorem.

Mechanizm aktywacji $\text{PIC}\gamma$ jest inny [16, 17, 22, 30, 31] (Ryc. 2). Izoformy tej fosfoinozytydazy: $\text{PIC}\gamma_1$ i $\text{PIC}\gamma_2$ uczestniczą w kaskadzie zdarzeń indukowanych w komórce przez czynniki wzrostu, takie jak np. naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) (Ryc. 2), czy czynnik wzrostu pochodzący z płytek krwi (PDGF). Czynniki wzrostu działają na receptory, których integralną część stanowi kinaza tyrozynowa. Przyłączenie liganda (agonisty) do receptora powoduje inicjację kaskady autofosforylacji i fosforylacji prowadzonych przez kinazę tyrozynową receptora. Aktywacja $\text{PIC}\gamma$ następuje właśnie poprzez fosforylację reszt tyrozynowych enzymu (Tyr783 i Tyr1254) [23]. Zaktywowane izoformy $\text{PIC}\gamma$, podobnie jak $\text{PIC}\beta$, hydrolizują ten

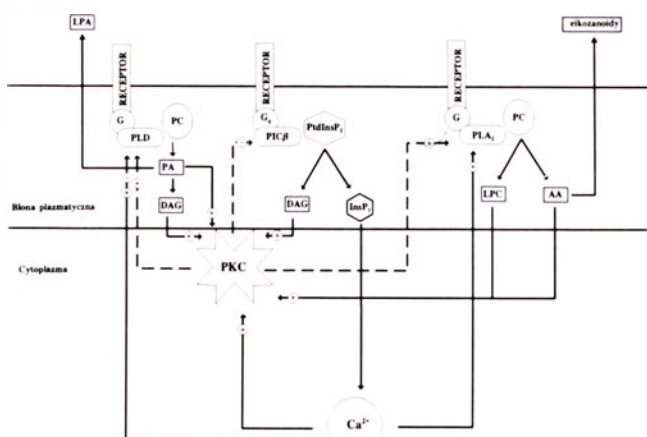
sam fosfolipid prowadzą do powstania tych samych wtórnych przekaźników informacji: InsP_3 i DAG (Ryc. 2).

W komórce nie pobudzonej przez agonistę działanie $\text{PIC}\gamma$ na fosfolipid inozytolowy PtdInsP_2 jest niemożliwe. Jest to spowodowane ochronnym działaniem białka cytoszkieletu — profiliny, która otacza PtdInsP_2 [31]. Fosfatydyloinozytol w kompleksie PtdInsP_2 -profilina jest hydrolizowany tylko przez aktywną, ufosforylowaną formę $\text{PIC}\gamma$, a więc tylko po stymulacji receptorów czynników wzrostu. W czasie hydrolizy PtdInsP_2 przez $\text{PIC}\gamma$ zostaje uwolniona również profilina, która może wchodzić w interakcje z filamentami aktynowymi. W konsekwencji może to prowadzić do rozpadu filamentów, tworzenia kompleksów profilina-aktyna i i przeorganizowania cytoszkieletu [18, 31]. Profilina nie chroni PtdInsP_2 przed hydrolitycznym działaniem $\text{PIC}\beta_1$ [31].

Należy dodać, że w latach osiemdziesiątych z dużą dozą sceptycyzmu traktowano hipotezy sugerujące istnienie bezpośrednich związków (oddziaływań) pomiędzy inozytologowym cyklem przekazywania informacji a regulacją cytoszkieletu. Dopiero badania lat ostatnich wykazały, że poszczególne elementy kaskady przekazywania sygnałów są związane z cytoszkieletem, i że związenie to ulega zmianie po aktywacji komórki przez agonistę [18, 31, 32]. Zatem hydroliza fosfolipidów inozytologowych może być regulowana nie tylko przez receptor i współdziałające z nim białka znajdujące się w błonie plazmatycznej, lecz także przez układ białek cytoszkieletu związany pośrednio tylko z tą błoną.

W wyniku hydrolizy fosfolipidu inozytologowego PtdInsP_2 powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: InsP_3 i DAG [16, 21, 22]. InsP_3 dyfunduje z błony plazmatycznej do cytosolu i łączy się z określonym receptorem znajdującym się w błonie endoplazmatycznego retikulum. Związanie InsP_3 z receptorem moduluje białko receptorowe powodując uwolnienie do cytosolu jonów wapnia zmagazynowanych w cysternie retikulum [8, 12, 16, 21]. Natomiast DAG pozostaje w błonie plazmatycznej i aktywuje kinazę białkową C (PKC) [33]. Wkrótce po odkryciu, że DAG jest wtórnym przekaźnikiem informacji stało się jasne, że większość tworzonego po aktywacji komórek DAG pochodzi z hydrolizy fosfatydylocholiny [9, 10, 23, 34-36]. Fosfatydyloetanolamina może być także źródłem tego lipidu, ale w znacznie mniejszym zakresie. Należy dodać, że fosfolipidy inozytologowe, a szczególnie PtdInsP_2 stanowią bardzo nieznaczny procent ($<0.1\%$) wszystkich fosfolipidów błon, podczas gdy fosfatydylocholina jest głównym fosfolipidem (50%) wszystkich fosfolipidów błon komórek organizmów eukariotycznych [9, 10].

Pojawienie się DAG w komórce po aktywacji ma często charakter dwufazowy. Pierwsza faza charakteryzuje się wysokim i krótkotrwałym wzrostem poziomu DAG. W tej fazie DAG pochodzi z hydrolizy



Ryc. 3. Schemat przedstawiający udział PKC i Ca^{2+} w koordynacji współdziałania fosfolipaz w komórce, wg [23] (ryc. zmodyfikowana).

Objaśnienia skrótów nie uwzględnionych w tekście: AA — kwas arachidonowy; G — białko G; LPA — kwas lizofosfatydowy; LPC — lizofosfatydylocholina; PA — kwas fosfatydowy; PC — fosfatydylocholina.

PtdIns₂ (równolegle obserwuje się wzrost, a następnie spadek stężenia drugiego wtórnego przekaźnika informacji — InsP₃). Faza druga, to długotrwały wzrost poziomu DAG, pochodzącego z hydrolizy fosfatydylocholino [33]. Głównym enzymem działającym na fosfatydylocholinę po pobudzeniu komórki jest fosfolipaza D (PLD), chociaż DAG może powstawać bezpośrednio w wyniku działania na ten fosfolipid fosfolipazy C (PLC) [8, 34-36] (Ryc. 3). PLD hydrolyzuje fosfatydylocholinę z uwolnieniem kwasu fosfatydowego i choliny. Kwas fosfatydowy ulega jednak w komórce defosforylacji do DAG przez fosfohydrolazę kwasu fosfatydowego [9, 10]. Przypuszcza się, że cytokiny (interferony i interleukiny [23]) stymulują głównie PLC działającą specyficznie na fosfatydylocholinę bez udziału hydrolizy fosfolipidów inozytowych, podczas gdy związki agonistyczne mobilizujące Ca^{2+} w komórce, jak np.: adrenalina, noradrenalina, wazopresyna czy bombezyna aktywują PIC, działającą na PtdInsP₂, oraz PLD, działającą na fosfatydylocholinę [23]. W tym przypadku obserwuje się, jak już zaznaczono poprzednio, dwufazowe pojawianie DAG w komórce i w efekcie przedłużoną aktywację PKC (Ryc. 3). DAG może powstawać w komórce także na drodze innych przekształceń metabolicznych, jak np.: hydrolizy triacylogliceroli czy sfingomielin*, jednak udział tych reakcji w procesach transdukcji sygnałów wydaje się raczej wątpliwy [23, 26].

Wzmocnienie i przedłużenie aktywności PKC wywołują również inne produkty rozpadu fosfatydylocholino (Ryc. 3) [23, 33, 37]. Stwierdzono na przykład, że lizofosfatydylocholina — powstająca w wyniku działania na fosfatydylocholinę fosfolipazy A₂ (PLA₂) — również aktywuje PKC. PLA₂ uwalnia także kwas arachidonowy i inne nienasycone kwasy tłuszczowe

* Szlak przekazywania informacji z udziałem sfingolipidów przedstawiono w artykule: J K w i a t k o w s k a (1994) *Post Biochem* 40: 130-134.

estryfikujące środkową grupę -OH glicerolu. Kwas arachidonowy i inne cis-nienasycone kwasy tłuszczowe również aktywują PKC. Współdziałanie zatem PIC działającej na PtdInsP₂, oraz PLD i PLA₂ działających na fosfatydylocholinę pozwala na utrzymanie w komórce przedłużonej aktywności PKC [23, 33, 37] (Ryc. 3).

Wydaje się, że PLD w organizmach ssaków występuje głównie w błonach komórkowych, choć dokładna lokalizacja enzymu nie jest jeszcze poznana. Także mechanizm aktywacji PLD nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony. Przypuszcza się, że trójpodjednostkowe białka G mogą (podobnie jak w przypadku PIC) bezpośrednio aktywować PLD, choć nie wiadomo, które typy i podjednostki białek G są zaangażowane w ten proces. Znany natomiast aktywatorem PLD jest PKC. Badania nad wpływem tego enzymu na aktywację PLD prowadzone są zazwyczaj z udziałem estrów forbolu. Związki te nie występują fizjologicznie, jednak dodane do komórek zastępują DAG powodując aktywację PKC, a następnie aktywują PLD.

Jednym z najciekawszych i stosunkowo niedawno poznanych mechanizmów aktywacji PLD, jest aktywacja enzymu przez kinazy tyrozynowe [38]. U podstaw tego, zresztą jeszcze nie do końca wyjaśnionego procesu znalazła się obserwacja, że po stymulacji komórek przez czynniki wzrostu, takie jak EGF lub PDGF, dochodzi do aktywacji PLD i zwiększenia poziomu kwasu fosfatydowego i DAG w komórce.

Po stymulacji komórek przez czynniki wzrostu dochodzi do fosforylacji licznych białek. Należy do nich nie tylko omówiona powyżej PIC_γ, lecz także GAP — białko aktywujące właściwości GTPazowe białka p21^{ras} (z rodziny białek Ras). GAP stymuluje zdolność Ras do hydrolizy GTP do GDP, co powoduje jego przekształcenie z formy aktywnej w nieaktywną [8], a więc jest negatywnym regulatorem białka Ras. Wykazano, że kwas fosfatydowy wiąże się z białkiem GAP i hamuje jego aktywność. Ponadto, zarówno kwas fosfatydowy, jak i DAG, stymulują inne cytoplazmatyczne białko — GIP, które hamuje aktywność GTPazową białka Ras [23]. Zatem, kwas fosfatydowy i DAG działając hamująco na GAP, lub stymulując na GIP, powodują, że białko Ras pozostaje aktywne. Stan taki jest typowy dla komórek stymulowanych czynnikami wzrostu, lub stransformowanych onkogenami.

Opublikowane ostatnio wyniki badań grupy amerykańskiej [38] wskazują, że w komórkach NIH 3T3 stransformowanych onkogenem v-src dochodzi do aktywacji PLD. Aktywacja ta zachodzi w wyniku kaskady następujących po sobie kolejnych reakcji. Badacze sugerują [38], że niereceptorowe kinazy tyrozynowe z rodziny Src aktywują białko Ras. Zaktywowany Ras aktywuje PLD włączając w ten proces inne białka, a mianowicie małe, monomeryczne białko G, Ral, występujące w błonie plazmatycznej w kompleksie z PLD, oraz adaptorowe, cytosolowe białko RalGDS.

A zatem, PLD może być aktywowana zarówno w wyniku reakcji zapoczątkowanej przez kinazy tyrozynowe, jak i przez PKC. W odróżnieniu jednak od PIC, której różne formy izomeryczne (PIC β i PIC γ) są aktywowane w różny sposób, dotychczas nie wiadomo, czy kinazy tyrozynowe i PKC działają na różne izoenzymy PLD.

III. Rola PKC i Ca²⁺ w koordynacji współdziałania fosfolipaz

Rodzina kinaz białkowych C zawiera co najmniej 10 izoform serynowo/treoninowych kinaz białkowej C (Tab. 1). „Klasyczne” formy izomeryczne kinazy białkowej C są aktywowane przez Ca²⁺, DAG i fosfatydyloserynę, a także lizofosfatydylocholinę i kwasy tłuszczowe. Inne, tzw. „nowe” izoformy PKC są niezależne od Ca²⁺ lecz wymagają do aktywacji DAG i fosfatydyloseryny, podczas gdy „atypowe” izoformy PKC są niezależne zarówno od Ca²⁺, jak i DAG [33] (Tab. 1).

Wszystkie zewnątrzkomórkowe sygnały wywołujące mobilizację Ca²⁺ w cytosolu powodują serię zdarzeń w komórce, w których biorą udział PIC, PLD i PLA₂ [23, 33, 36, 37]. Izoenzymy PKC pełnią istotną rolę koordynatora tych zdarzeń. Kiedy, w wyniku kaskady zdarzeń w komórce następuje aktywacja PIC, hydroliza PtdnsP₂ i powstanie wtórnych przekazników sygnałów InsP₃ i DAG, InsP₃ powoduje zwiększenie poziomu Ca²⁺ w cytosolu. Umożliwia to translokację nieaktywnej PKC z cytosolu do błony plazmatycznej. Tam, dzięki współdziałaniu z DAG, fosfatydyloseryną i Ca²⁺ następuje aktywacja PKC, a w konsekwencji aktywacja PLD [33, 37]. PKC i Ca²⁺ aktywują także PLA₂, choć znane są takie jej formy, które takiej aktywacji nie wymagają [23, 36]. Między PKC, a PLD i PLA₂ powstaje zatem pozytywne sprzężenie zwrotne [23, 33, 37] (Rys. 3). PKC natomiast hamuje PIC [23] (Ryc. 3). Negatywne sprzężenie zwrotne między PKC, a PIC jest spowodowane poprzez fosforylację przez PKC Ser887 w częs-

Tabela 1.

Izoformy kinazy białkowej C

	Izoforma	Aktywator lipidowy
Klasyczne PKC Izoenzymy zależne od Ca ²⁺	α	PS, DAG, FA, LPC
	β_1/β_{II}	PS, DAG, FA, LPC
	γ	PS, DAG, FA, LPC
Nowe PKC Izoenzymy niezależne od Ca ²⁺	δ	PS, DAG, FA
	ϵ	PS, DAG, FA
	η	?
	θ	?
Atypowe PKC Izoenzymy niezależne od Ca ²⁺	ζ	PS, FA
	λ	?

tecze PIC β i Ser1248 w cząsteczce PIC γ . Ufosforylowane enzymy nie mogą już być aktywowane przez białka G, czy kinazę tyrozynową receptorów czynników wzrostu i produkcja InsP₃ i DAG z rozpadu fosfolipidu inozytowego ustaje. Natomiast, dzięki dodatniemu sprzężeniu zwrotnemu między PKC a PLD czy PLA₂, w komórce pojawia się DAG, a także lizofosfatydylocholina i kwasy tłuszczowe pochodzące z rozpadu fosfatydylocholino (Ryc. 3). Mogą one powodować wtórną wobec fosfolipidu inozytowego, przedłużającą się aktywację PKC, istotną dla długotrwałych odpowiedzi biologicznych komórki, jak procesy wzrostu, podziały czy różnicowanie komórki [23, 33, 36, 37].

Aktywacja PLA₂ i PLD, stymulowana przez związki agonistyczne, które działają poprzez białka G może być także koordynowana przez Ca²⁺ (Ryc. 3). Na zdolność białka G do aktywacji PLD wskazuje stymulacja enzymu przez niehydrolizujący analog GTP-GTP γ S [38]. Jednak, w odróżnieniu od PLA₂, którego aktywność wzmacniają jony wapnia (Ryc. 3), wpływ tych jonów na hydrolizę fosfatydylocholino przez PLD nie jest do końca poznany [23, 33, 36]. Wydaje się, że Ca²⁺ raczej hamują PLD, szczególnie w wyższych stężeniach, mogą natomiast stymulować działanie białka G aktywującego PLD. Natomiast jony wapnia, już w stężeniach powyżej 50 nM, powodują aktywację PLA₂ i translokację tego enzymu z cytosolu do błon komórki [23, 36]. Najlepszym substratem dla PLA₂ jest fosfatydylocholina, gorszym fosfatydyloetanolamina, a słabym fosfatydyloinozytole. Uwolniony przez PLA₂ z cząsteczki fosfolipidu kwas arachidonowy jest prekurem prostaglandyn, tromboksanów, leukotrienów i innych eikozanoidów [33, 37, 39] (Ryc. 3).

Jak już wspomniano uprzednio, hydroliza fosfatydylocholino przez PLD powoduje powstanie w komórce kwasu fosfatydowego. Fosfolipid ten zaczyna być postrzegany jako wtórny przekaznik informacji w komórce [18, 36].

Kwas fosfatydowy wydaje się działać w komórce mitogenicznie, regulując aktywność białka Ras [36, 37] (*patrz*: poprzedni rozdział). Jest on także prekurem kwasu lizofosfatydowego. Kwas lizofosfatydowy jest uwalniany z komórek (np. komórek płytek krwi) i jako pierwotny przekaznik, działając na specyficzne receptory błony komórkowej, powoduje różne odpowiedzi biologiczne, jak np.: skurcz mięśni gładkich, cofanie różnicowania komórek neuroblastomy, czy zapoczątkowanie proliferacji fibroblastów [40]. W naszych rozważaniach najbardziej interesujące wydaje się jednak odkrycie, że kwas fosfatydowy może pełnić funkcje fizjologicznego aktywatora „atypowego” izoenzymu PKC-PKC ζ (zeta) [41, 42]. Co więcej, ta izomeryczna forma PKC jest wszechobecna w komórkach organizmów zwierzęcych [33, 37, 41].

Reasumując, hydroliza fosfolipidu inozytowego PtdInsP₂, prowadząca do powstania DAG i mobiliza-

cji Ca^{2+} , powoduje aktywację „klasycznych” izoform PKC. W wyniku hydrolizy fosfatydylocholiny przez PLC czy PLD nie następuje mobilizacja Ca^{2+} w komórce, natomiast uwalniany zostaje kwas fosfatydowy i DAG. DAG powstały z hydrolizy fosfatydylocholiny może aktywować tzw. „nowe” izoformy PKC, nie wymagające Ca^{2+} , a kwas fosfatydowy może być głównym aktywatorem „atypowej” izoformy PKC, która do swojej aktywności nie wymaga ani DAG, ani Ca^{2+} (Tab. I). Następnie, w pozytywnym lub negatywnym sprzężeniu zwrotnym izoenzymy PKC mogą aktywować, lub hamować określone fosfolipazy (Ryc. 3).

Ograniczona objętość artykułu nie pozwala na szersze potraktowanie tego pasjonującego tematu. Staraliśmy się w nim przedstawić nowe informacje o wtórnych lipidowych przekaznikach sygnałów pojawiających się w komórce w wyniku hydrolizy fosfolipidu inozytowego $PtdInsP_2$ i fosfatydylocholiny, katalizowanych przez fosfolipazy PIC, PLC, PLD i PLA_2 . Aktywacja powyższych fosfolipaz najprawdopodobniej nie odbywa się w tej samej błonie i występuje w różnym czasie od sygnału pierwotnego. Dzięki temu odpowiedź komórki na sygnał ulega modulacji kontrolowanej poprzez wzajemne oddziaływanie różnych szlaków przekazywania sygnałów.

Artykuł otrzymano 11 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 27 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Kwiatkowska J (1986) *Post Biochem* 32: 329-334
2. Kwiatkowska J (1988) *Post Biochem* 34: 123-130
3. Kwiatkowska J (1994) *Post Biochem* 40: 130-134
4. Kwiatkowska-Korczak J (1995) W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Konarska L (red), Warszawa: PWN: 148-158
5. Nowak JZ (1988) *Kosmos* 37: 339-378
6. Wikieł H, Strosznajder J (1988) *Post Biol Kom* 15: 1-23
7. Wikieł H, Strosznajder J (1991) *Post Biol Kom* 18: 109-115
8. Kamińska-Kaczmarek B (1995) W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Konarska L (red), Warszawa: PWN: 62-77
9. Barańska J, Czarny M (1991) *Post Biochem* 37: 129-132
10. Barańska J (1992) W: Monografie, Warszawa Pol. Tow. Biochem: 1-36
11. Czarny M, Poddana H, Barańska J (1992) *Post Biochem* 38: 107-117
12. Barańska J (1993) *Kosmos* 42: 557-564
13. Barańska J, Kaczmarek L, Skangiel-Kramska J (1994) W: Mechanizmy plastyczności mózgu. Kossut M (red), Warszawa: PWN: 148-158
14. Barańska J (1994) *Post Biol Kom* 21: 479-488
15. Wiktorek M, Rojek A, Czarny M, Barańska J (1995) *Post Biochem* 41: 67-71
16. Barańska J (1995) W: Molekularne mechanizmy przekazywania sygnałów w komórce. Konarska L (red), Warszawa: PWN: 138-154
17. Mitchell RH (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 274-276
18. Divecha N, Irvine RH (1995) *Cell* 80: 269-278
19. Lee MW, Severson DL (1994) *Am J Physiol* 267: C659-C678
20. Rhee SG, Choi KD (1992) *J Biol Chem* 267: 12393-12396
21. Berridge MJ, Irvine RF (1984) *Nature (Lond)* 312: 315-321
22. Berridge MJ (1993) *Nature (Lond)* 361: 315-325
23. Liscovitch M (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 393-399
24. Divecha N, Banfic H, Irvine RF (1993) *Cell* 74: 405-407
25. Hepler JR, Gilman AG (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 383-387
26. Jhon DY, Lee HH, Park D, Lee CW, Lee KH, Yoo OJ, Rhee SG (1993) *J Biol Chem* 266: 6654-6661
27. Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Sternweis PC (1991) *Science* 251: 804-807
28. Smrcka AV, Sternweis PC (1993) *J Biol Chem* 268: 9667-9674
29. Wu D, Katz C, Lee H, Simon MI (1992) *J Biol Chem* 267: 25798-25802
30. Schlessinger J, Ulrich A (1992) *Neuron* 9: 383-391
31. Meldolesi J, Magni M (1991) *Trends Pharmacol Sci* 12: 362-364
32. Neubig RR (1994) *FASEB* 8: 939-946
33. Nishizuka Y (1992) *Science* 258: 607-614
34. Exton JH (1990) *J Biol Chem* 265: 1-4
35. Exton JH, Taylor SJ, Augert G, Bocckino SB (1991) *Mol Cell Biochem* 104: 81-86
36. Exton JH (1994) *Biochem Biophys Acta* 1212: 26-42
37. Asaoka Y, Nakamura S, Yoshida K, Nishizuka Y (1992) *Trends Biochem Sci* 17: 414-417
38. Jiang H, Luo J-Q, Urano T, Frankel P, Lu Z, Foster DA, Feig LA (1995) *Nature (Lond)* 378: 409-421
39. Liscovitch MP, Ben-Av P, Danin M, Faiman G, Eldar H, Livneh E (1993) *J Lipid Mediators* 8: 177-182
40. Shimizu T, Wolfe LS (1990) *J Neurochem* 55: 1-15
41. Jalink K, Hordijk PL, Moolenaar WH (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 185-196
42. Wakelam MJO, Briscoe CP, Stewart A, Pettitt TR, Cross MJ, Paul A, Yule JM, Gardner SD, Hodgkin M (1993) *Biochem Soc Trans* 21: 874-877
43. Limatola K, Schaap D, Moolenaar WH, van Biltterswijk WJ (1994) *Biochem J* 304: 1001-1008



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

Oscylacje i fale wapniowe w komórce

Calcium oscillations and waves in a cell

AGNIESZKA MAKOWSKA¹,
JERZY DUSZYŃSKI²

Spis treści:

- I. Poziom Ca^{2+} w cytosolu wtórnym przekaznikiem informacji
- II. Rozmieszczenie wapnia w komórce
- III. Wapń wolny i związany
- IV. Podział ER z punktu widzenia zawartości wapnia
- V. Szybkość dyfuzji Ca^{2+} w obrębie komórki
- VI. Warunki występowania oscylacji w szlaku metabolicznym
- VII. Oscylacje stężenia jonów wapnia w cytosolu
- VIII. Modele opisujące oscylacje Ca^{2+} w komórce
- IX. Fale wapniowe
- X. Zmiany stężenia wapnia w jądrze komórkowym i w mitochondriach
- XI. Synchronizacja zmian stężenia wapnia w obrębie tkanki

Contents:

- I. Cytosolic calcium as a second messenger
- II. Subcellular distribution of calcium
- III. Free and bound calcium
- IV. Heterogeneity of ER calcium content
- V. Calcium diffusion in a cell
- VI. Oscillations in a metabolic pathway
- VII. Cytosolic calcium oscillations
- VIII. Theoretical models of calcium oscillations
- IX. Calcium waves
- X. Nuclear and mitochondrial modifications of calcium levels
- XI. Propagation of calcium changes within a tissue

Wykaz stosowanych skrótów: $[\text{Ca}^{2+}]$ — stężenie wapnia w cytosolu; IP_3 — trisfosfoinozytol; DAG — diacyloglicerol; PLC — fosfolipaza C; PKC — kinaza białkowa C; PIP_2 — fosfatydyloinozytolo(4,5)bisfosforan; $J_{\text{ATP}}^{\text{Ca}}$ — przepływ Ca^{2+} przez pompę wapniową; $J_{\text{IP}_3}^{\text{Ca}}$ — przepływ Ca^{2+} przez IP_3 -zależny kanał wapniowy; $J_{\text{Ca}}^{\text{Ca}}$ — przepływ wapnia indukowany przez wapń; $J_{\text{dyf}}^{\text{Ca}}$ — dyfuzja wapnia; R — receptor; G — białko G; RyR — receptor rianodiny; CIRC — indukowany przez wapń wpływ wapnia.

I. Poziom Ca^{2+} w cytosolu wtórnym przekaznikiem informacji

Wrażliwość komórki na zmiany w stanie fizjologicznym organizmu wymaga istnienia odpowiednich „czujników” oraz dróg przekazywania informacji do elementów regulujących funkcjonowanie komórki. Rolę „czujników” w komórce odgrywiają receptory. Ich struktura ulega zmianie w chwili, gdy przyłącza się do nich specyficzny ligand, np. hormon. Zmiana w strukturze receptora to pierwszy etap drogi przekazywania sygnału (kaskady sygnałowej). W komórkach organizmów wyższych istnieje wiele rodzajów receptorów i wywodzących się z nich kaskad sygnałowych. Charakterystycznym etapem wielu kaskad sygnałowych jest **zmiana stężenia wapnia w cytosolu ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)**. Jest to

tak ważny i generalny etap w przekazywaniu sygnału, że wapń zyskał rangę głównego wtórnego przekazywacza informacji w komórce [1, 2]. Poniżej sygnału wapniowego w kaskadzie sygnałowej znajduje się etap, w którym rolę odgrywają **białka przekaznikowe sygnału wapniowego**. Są to białka, których struktura jest wrażliwa na poziom wapnia. Przykładami takich białek są: kalmodulina, kalretynina, kalcyneuryna, kalpaina czy aneksyna. Białka te, w zależności od stopnia wypełnienia miejsc wiążących wapń, mogą modyfikować całe spektrum enzymów komórkowych.

Niniejsza praca poświęcona jest formom sygnału wapniowego w obrębie pojedynczej komórki. W pracy omówione zostanie rozmieszczenie wapnia w komórce, czasowy i przestrzenny przebieg zmian stężenia wapnia, czyli oscylacje i fale wapniowe, a także rozprzestrzenianie się tych zmian w obrębie tkanki.

II. Rozmieszczenie wapnia w komórce

Zmiany stężenia wapnia w komórce nazywane są metabolizmem wapniowym. Określenie to jest nieco mylące ponieważ w trakcie tych przemian dwuwartościowy kation wapniowy nie podlega żadnym przemianom chemicznym. Zmianie ulega jedynie jego lokalizacja w komórce, a co za tym idzie stężenie wapnia w poszczególnych przedziałach komórki. W metabolizmie wapniowym zasadniczą rolę odgrywają następu-

¹ Mgr, ² prof., Instytut Biologii Doświadczalnej im M. Nenckiego PAN ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

jące przedziały komórkowe: 1) cytosol, 2) retikulum endoplazmatyczne, 3) mitochondria i 4) jądro komórkowe oraz, poza nimi, przestrzeń zewnątrzkomórkowa. Najistotniejsze znaczenie przypisuje się współcześnie przepływowi Ca^{2+} pomiędzy endoplazmatycznym reticulum, cytosolem i przestrzenią zewnątrzkomórkową. Coraz częściej jednak pojawiają się prace akcentujące rolę mitochondriów [3, 4] i jądra komórkowego [5] w metabolizmie wapniowym, szczególnie w stanach patologicznych komórki.

W cytosolu typowej komórki organizmów wyższych, jaką jest np. hepatocyt, znajduje się 10-20% zasobów wapnia komórkowego. W stanie spoczynkowym komórki $[\text{Ca}^{2+}]_c$ osiąga wartość - 100 nM. Po obudzeniu komórki, np. na skutek działania hormonu, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wzrasta do ok. 1 μM . Na zewnątrz komórki, w płynach ustrojowych, stężenie Ca^{2+} osiąga wartość 2 mM. Gradient Ca^{2+} na błonie komórkowej ma wobec tego wartość 20000 w przypadku komórki spoczynkowej i 2000 w przypadku komórki pobudzonej. Sprawowanie przez błonę komórkową funkcji tak efektywnej bariery w stosunku do wapnia jest możliwe dzięki **pompie wapniowej** w błonie komórkowej (**ATP-azie wapniowej**). Wypompowuje ona na zewnątrz komórki Ca^{2+} z cytosolu i przeciwdziała wzrostowi zawartości wapnia w komórce na skutek biernego napływu Ca^{2+} z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. W błonie komórkowej jest też zlokalizowany **kanal wapniowy**. Otwiera się on przy pobudzeniu komórki i umożliwia napływ do cytosolu Ca^{2+} z płynów ustrojowych [6, 7].

III. Wapń wolny i związany

Zdecydowana większość zasobów wapniowych komórki jest zlokalizowana w endoplazmatycznym retikulum (ER). Zasadnicze znaczenie w nagromadzeniu wapnia w tym przedziale mają dwa **białka buforujące wapń**: kalsekwestryna i kalretikulina [8]. Charakteryzują się one wysoką pojemnością i niskim powinowactwem w stosunku do wapnia (1 mol kalsekwestryny wiąże do 50 moli Ca^{2+} przy K_d ok. 1 mM; kalretikulina wiąże od 20 do 50 moli Ca^{2+} na mol białka przy K_d w zakresie 1-4 mM). Obecność tych białek sprawia, że bez ryzyka znacznego podwyższenia stężenia Ca^{2+} w świetle ER mogą być zgromadzone duże zasoby łatwo uwalnianego wapnia. Długotrwałe podwyższenie stężenia Ca^{2+} jest bowiem niebezpieczne dla struktur komórkowych [9], a w przypadku ER może prowadzić do takich procesów jak wytrącanie fosforanu, aktywacja proteaz czy fosfolipaz i, w konsekwencji, utrata integralności błony. Elementami niezbędnymi do prawidłowego funkcjonowania ER jako magazynu wapniowego są również dwa białka błonowe: **ATPaza wapniowa** (wpompowująca wapń do ER i zużywająca cytosolowe ATP) oraz **IP_3 -zależny kanał wapniowy**. W komórce spoczynkowej kanał ten jest zamknięty, po aktywacji przez IP_3 kanał zostaje

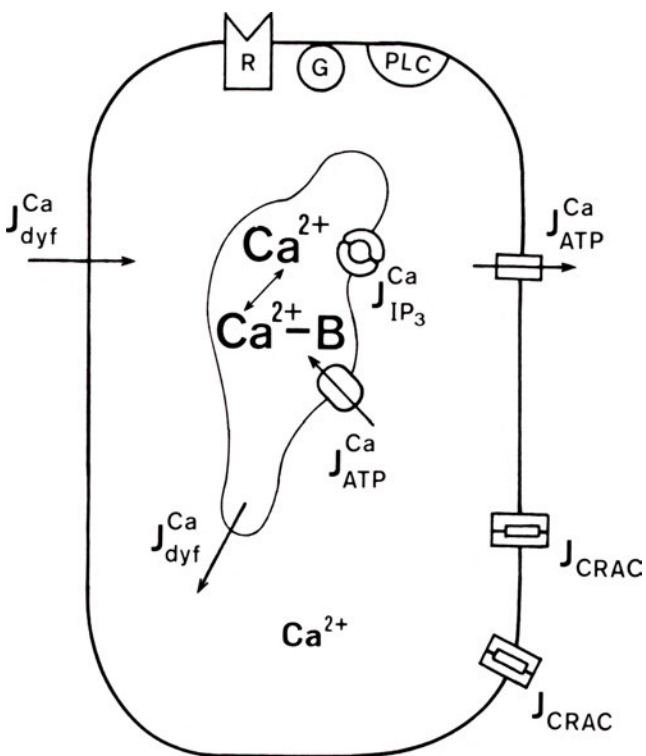
otwarty i następuje wpływ Ca^{2+} z ER do cytosolu. W błonie ER wielu rodzajów komórek występuje też kanał wapniowy regulowany przez wapń (aktywuje go zwiększone stężenie Ca^{2+} w cytosolu). Kanał ten jest nazywany **rianodinowym (RyR)**, ponieważ jest blokowany przez alkaloid rianodinę.

Także w cytosolu zdecydowana większość występującego tam wapnia jest związana z **białkami buforującymi wapń** (parvalbuminą i kalbindiną), z metabolitami (np. z cytrynianem lub ATP, które silnie wiążą kationy dwuwartościowe) lub z powierzchniami błon komórkowych. Omówione do tej pory elementy regulujące wapniową gospodarkę komórki przedstawiono na schemacie (Ryc. 1).

IV. Podział ER z punktu widzenia zawartości wapnia

Endoplazmatyczne retikulum jest skomplikowaną strukturą. W ER rozróżnia się frakcję gładką, szorstką oraz tę część systemu ER, która łączy się z błoną jądrową. Pomimo tego zróżnicowania uważa się, że wewnętrzna przestrzeń ER stanowi jedną całość o identycznym składzie enzymatycznym [3]. Wiele danych wskazuje jednak na to, że zawartość wapnia w ER jest niejednolita. Jedną z przyczyn nagromadzenia większej ilości Ca^{2+} w określonych regionach ER (kalciosom [3, 10]) mogłoby być nierównomierne rozmieszczenie w błonie ER białek transportujących wapń oraz utrudniona dyfuzja Ca^{2+} wewnątrz ER.

Badania z użyciem technik cytoimmunologicznych potwierdziły przypuszczenie, że białka transportujące wapń nie są równomiernie rozłożone w ER, i że w pewnych miejscach następuje ich znaczne zagęsz-



Ryc. 1. Elementy metabolizmu wapniowego w komórce.

czenie [11]. Można zatem przypuszczać, że w rozgałęzionej strukturze ER występują fragmenty odgrywające dominującą rolę w metabolizmie wapniowym. Są one nazywane kalciosomami i stanowią magazyny wapniowe komórki.

V. Szybkość dyfuzji Ca^{2+} w obrębie komórki

Wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ po pobudzeniu komórki jest wynikiem uwalniania wapnia z ER i napływu wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Jakże jest uzasadnienie tak skomplikowanego mechanizmu podwyższenia $[\text{Ca}^{2+}]_c$? Dlaczego do regulacji $[\text{Ca}^{2+}]_c$ nie wystarczają przepływy wapnia przez błonę komórkową i zewnątrzkomórkową, praktycznie niewyczerpywalny, rezerwuuar wapnia? Przyczyny tego stanu rzeczy upatruje się w bardzo wolnym dyfundowaniu wapnia w przedziałach komórkowych. Powodem tego jest występowanie w komórce wielu elementów buforujących wapń. Przypomnijmy, że w elektrycznie niepobudliwej komórce $[\text{Ca}^{2+}]_c$ waha się w granicach od 0.1 do 1 μM , podczas gdy stężenie białek wiążących wapń w cytosolu szacuje się na ok. 300 μM [12]. Oznacza to, że 99% wapnia w cytosolu jest związana [13, 14]. Wyliczono, że dyfuzja Ca^{2+} od błony do centralnych rejonów komórki zajęłaby minuty. Szybkie, trwające zaledwie kilka sekund, zmiany poziomu wapnia w obrębie komórki możliwe są jedynie dzięki uwalnianiu wapnia z głębiej położonych i rozproszonych magazynów wapniowych. Dyfuzja wapnia w tych przedziałach jest nieco szybsza niż w cytosolu, albowiem stężenie wolnego wapnia osiąga w nich wartości od kilkunastu do kilkuset μM [15], przy tylko o rząd wielkości wyższym stężeniu elementów wiążących wapń. Należy dodać, że IP_3 uwalniający wapń z tych przestrzeni dyfunduje w cytosolu 30 raz szybciej niż wapń [12].

VI. Warunki występowania oscylacji w szlaku metabolicznym

W stanie równowagi dynamicznej parametry danego szlaku metabolicznego (t.j. stężenia metabolitów pośrednich) ulegają ustaleniu w warunkach określonej szybkości przepływu przez dany szlak. W opisie równowagi dynamicznej szlaku metabolity odgrywają wyłącznie rolę reagentów reakcji. Oddziaływanie specyficznych efektorów na centra regulatorowe enzymów może zmieniać ich stałe kinetyczne. W przypadku gdy efektem jest produkt enzymu, i gdy działa on na reakcję hamująco (negatywne sprzężenie zwrotne) mamy do czynienia z **efektem stabilizującym**. Podobnie jest w przypadku gdy efektem jest substrat enzymu, i gdy jego działanie stymuluje reakcję. Działanie takich efektorów może sprawiać, że wielkość stabilizowanego parametru zmienia się stosunkowo niewiele (homeostaza) nawet przy dużych zmianach w szybkości przepływu przez szlak. Natomiast, w przypadkach: 1) gdy

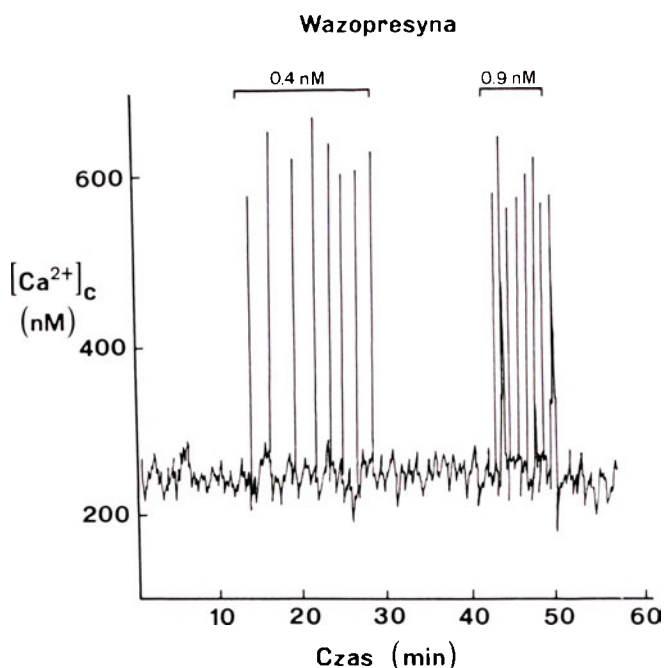
produkt enzymu jest efektem o działaniu aktywującym reakcję (pozytywne sprzężenie zwrotne) lub 2) gdy substrat jest efektem hamującym reakcję (np. kooperacja negatywna) mamy do czynienia z **efektami destabilizującymi** [16]. Efektory mogą działać na szlak metaboliczny bardzo szybko (działanie kinetyczne, którego skala czasowa to milisekundy). Z drugiej strony procesy adaptacyjne, związane z syntezą białek, mają kilkugodzinną skalę czasową. W przypadku gdy działanie efektora związane jest z kowalencyjną modyfikacją enzymów szlaku, zmiany w kinetyce enzymu następują w minutowej skali czasowej. Oscylacje związane są zazwyczaj ze współdziałaniem w szlaku metabolicznym efektorów stabilizujących (dominujących w fazie powrotu do poziomu wyjściowego) i destabilizujących (dominujących w fazie odchodzenia od poziomu wyjściowego), o różnych skalach czasowych. W metabolizmie wapniowym rolę głównych parametrów i zarazem potencjalnych efektorów odgrywają IP_3 i wapń.

VII. Oscylacje stężenia jonów wapnia w cytosolu

Zastosowanie metod umożliwiających badanie procesów zachodzących w pojedynczej komórce pozwoliło odkryć złożony charakter zmian stężenia wapnia w cytoplazmie i organellach komórkowych. Stwierdzono, że w zależności od stopnia stymulacji komórki zmiany te mogą przybierać postać stałego podwyższenia lub oscylacji, które rozprzestrzeniają się w obrębie komórki jako fale. Występowanie oscylacji jest powszechne i zostało opisane dla wielu rodzajów komórek, między innymi oocytów mysich [17], hepatocytów [18, 19], oocytów *Xenopus laevis* [20], komórek nabłonkowych [21, 22], komórek mięśniowych i astrocytów [23].

W ostatnich latach oscylacyjne zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_c$ i ich rozprzestrzenianie się w obrębie komórki oraz pomiędzy sąsiadującymi komórkami stały się jednym z głównych tematów badań w dziedzinie przekazywania sygnałów w komórce. Wraz z kolejnymi odkryciami na tym polu pojawiały się różne modele próbujące wyjaśnić mechanizm tego zjawiska oraz hipotezy dotyczące jego fizjologicznej funkcji.

Cykliczne zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_c$ polegające na powtarzającym się kilka lub więcej razy wzroście i spadku, o stałej częstotliwości i amplitudzie, pojawiają się nie tylko w następstwie pobudzenia komórki. Zaobserwowano też oscylacje $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pojawiające się spontanicznie [24, 25]. W zależności od rodzaju komórki okres ich trwania może wynosić od 1 sekundy do 10 minut. Bardzo zmienna jest też dynamika zmian stężenia wapnia podczas oscylacji. Mogą one przyjmować różne kształty, np. ostrych pików z gwałtownym wzrostem i szybkim spadkiem stężenia wapnia, łagodnych przejść o sinusoidalnym przebiegu lub wielu form pośrednich [26]. Występowanie oscylacji



Ryc. 2. Zależność częstotliwości oscylacji $[Ca^{2+}]_c$ w cytosolu od intensywności stymulacji.

$[Ca^{2+}]_c$ jest związane z intensywnością stymulacji. Proces ich wzbudzenia ma charakter „wszystko albo nic”, to znaczy, że pojawiają się one dopiero po osiągnięciu określonej, progowej siły pobudzenia komórki. Dalszy wzrost siły stymulacji powoduje zwiększenie częstotliwości oscylacji $[Ca^{2+}]_c$, nie ma jednak wpływu na ich amplitudę (Ryc. 2). Zwiększenie częstotliwości następuje przez przyspieszenie fazy spadkowej oraz skrócenie okresu latencji, czyli fazy stałego poziomu $[Ca^{2+}]_c$ pomiędzy spadkiem i kolejnym wzrostem. Powyżej określonego poziomu pobudzenia komórki oscylacje przechodzą w utrzymujące się podwyższenie stężenia wapnia w cytosolu [26, 27]. Oscylacje wapniowe występują więc tylko w określonych granicach intensywności stymulacji.

Pomimo intensywnych badań dotychczas nie stwierdzono, jaka jest fizjologiczna rola tak skomplikowanych zmian w cytosolowym stężeniu wapnia. Przypuszcza się, że kodowanie siły stymulacji w postaci częstotliwości oscylacji pozwala na przekazywanie bardziej subtelnych zmian sygnału niż byłoby to możliwe przy stałym podwyższeniu stężenia wapnia [28]. Jest też prawdopodobne, że występowanie oscylacji tylko w określonych granicach siły stymulacji umożliwia białkom przekaźnikowym sygnału wapniowego odróżnienie prawdziwego sygnału od przypadkowych wahań $[Ca^{2+}]_c$. Stwierdzono, że oscylacje $[Ca^{2+}]_c$ powodują pojawienie się analogicznych oscylacji w matryks mitochondrialnej i odpowiadających im zmian aktywności mitochondrialnych dehydrogenaz [29].

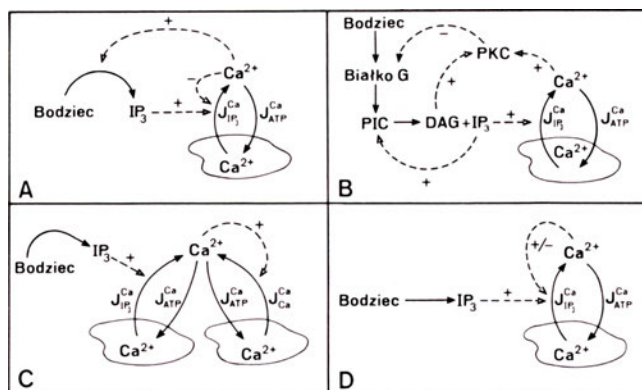
VIII. Modele opisujące oscylacje Ca^{2+} w komórce

Modele próbujące wyjaśnić zjawisko powstawania

i rozprzestrzeniania się w komórce oscylacji wapniowych są zgodne w opisie wstępnej fazy tego procesu. Przyłączenie przez receptor cząsteczki hormonu lub neurotransmitera powoduje rozpad białka G na domeny i uaktywnianie przez jedną z tych domen fosfolipazy C (PLC). Enzym ten powoduje rozpad znajdującego się w błonie komórkowej fosfatydyloinozytolo(4,5) bisfosforanu (PIP_2) na dwie cząsteczki: diacyloglicerol (DAG) oraz trisfosfoinozytol (IP_3) [30]. IP_3 jest związkiem drobnocząsteczkowym, który szybko dyfunduje w cytosolu i powoduje otwarcie IP_3 -zależnych kanałów wapniowych w błonach kalciosomów. Pociąga to za sobą wzrost stężenia jonów wapnia w cytosolu wzmocniony przez napływ wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Modele oscylacji $[Ca^{2+}]_c$ różnią się w opisie dalszej sekwencji zdarzeń. W jednej grupie modeli oscylacje były tłumaczone oscylującym stężeniem IP_3 , w drugiej cykliczną wymianą jonów wapnia pomiędzy cytosolem a magazynami wapniowymi w warunkach stałego stężenia IP_3 .

Do modeli oscylacji wapniowych opierających się na wahaniami stężenia IP_3 należy **model krzyżowego sprzężenia** (*cross-coupling model*), przedstawiony w 1988 r. przez Meyera i Stryera [31]. Zakłada on, że indukowany przez IP_3 wpływ wapnia ze zbiorników wapniowych stymuluje syntezę IP_3 (Ryc. 3A). Ponieważ „zapasy” jonów wapnia są ograniczone, po ich uwolnieniu do cytosolu następuje ponowne przeniesienie wapnia do zbiorników ER i na zewnątrz komórki, a synteza IP_3 ulega spowolnieniu. Po napełnieniu magazynów wapniowych proces może ulec powtórzeniu. W wyniku dalszych badań model ten został wzbogacony o element hamowania wpływu jonów wapnia ze zbiorników wapniowych przez zwiększone $[Ca^{2+}]_c$ [18].

Inny model oparty na cyklicznych zmianach stężenia IP_3 zaproponowali Cuthbertson i Chay w 1991 r. [32]. W tym matematycznym opisie, nazwanym **modelem agonista-receptor**, wapń wpływający ze zbiorników komórkowych oraz diacyloglicerol



Ryc. 3. Modele oscylacji wapniowych. A — model sprzężenia krzyżowego, B — model agonista-receptor, C — model dwóch rodzajów magazynów wapniowych, D — model dwufazowego działania wapnia. Ciągłe linie oznaczają przepływy wapnia (J^{Ca}) oraz szlaki metaboliczne, linie przerywane symbolizują wzmacniające (+) lub hamujące (-) działanie efektorów (Ca^{2+} i IP_3).

aktywują kinazę białkową C (PKC), która poprzez fosforylację hamuje aktywność białka G lub receptora błonowego. W efekcie następuje zahamowanie syntezy IP_3 i w dalszej konsekwencji uwalniania wapnia z magazynów komórkowych. Wpompowywanie wapnia z powrotem do zbiorników komórkowych umożliwia odbudowanie ich zasobów. Spadek stężenia wapnia w cytosolu powoduje zmniejszenie aktywności PKC, uaktywnienie syntezy IP_3 i ponowne uwolnienie jonów wapnia z magazynów komórkowych do cytosolu. Model ten (Ryc. 3B) zakłada również, że DAG lub IP_3 stymulują na zasadzie dodatniego sprzężenia zwrotnego aktywność PLC, chociaż taka zależność nie została eksperymentalnie potwierdzona.

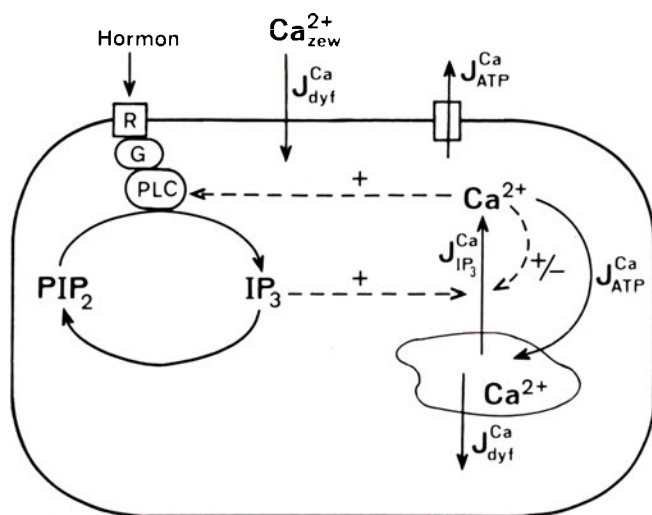
Omówione modele generowania oscylacji wapniowych opierają się na założeniu, że stężenie IP_3 w komórce ulega cyklicznym wahaniom. Dotychczas jednak nie opracowano metody pozwalającej na bezpośrednie potwierdzenie występowania takich zmian. Powszechna użyteczność tych modeli została natomiast zakwestionowana przez wyniki eksperymentów, w których zastosowano nie ulegający hydrolizie analog IP_3 , IP_3S_3 [28]. Związek ten, podobnie jak IP_3 powoduje uwolnienie jonów wapnia z magazynów komórkowych, jednak jego stężenie po podaniu do komórki utrzymuje się na stałym poziomie. W doświadczeniach na oocytach *Xenopus* wykazano, że IP_3S_3 nie ma negatywnego wpływu na pojawianie się oscylacji wapniowych, a więc przynajmniej w tych komórkach nie są one generowane przez cykliczne zmiany stężenia IP_3 [28].

Druga grupa modeli opiera się na zjawisku indukowania wypływu jonów wapnia ze zbiorników wapniowych przez podwyższone stężenie wapnia w cytosolu (CICR — *calcium-induced calcium release*). **Model dwóch rodzajów magazynów wapniowych**, zaproponowany w 1990 r. przez Goldbetera, Duponta oraz Berridge'a [33] zakłada istnienie i współdziałanie magazynów wapniowych wrażliwych i niewrażliwych na IP_3 . Pierwsze posiadają w błonie receptory IP_3 . Drugie mają inny rodzaj receptorów — receptory rianodinowe. Są one wrażliwe na stężenie jonów wapnia w cytosolu i, podobnie jak receptory IP_3 , pełnią funkcję kanałów wapniowych. Po zainicjowaniu kaskady sygnałowej dochodzi do uwolnienia wapnia ze zbiorników wrażliwych na IP_3 . Wzrost stężenia wapnia w cytosolu powoduje z kolei otwarcie kanałów w magazynach posiadających receptory rianodinowe. Po wpompowaniu wapnia z powrotem do zbiorników wapniowych cały proces ulega powtórzeniu. Omówiony model (Ryc. 3C) nie ma charakteru uniwersalnego, ponieważ w wielu rodzajach komórek nie udało się wykazać istnienia receptorów rianodinowych, między innymi nie znaleziono ich w oocytach *Xenopus* [34].

W roku 1992 ukazały się publikacje wykazujące, że aktywność IP_3 -zależnych kanałów wapniowych może być regulowana przez wapń. W zależności od stężenia wapń może aktywować lub hamować indukowane

przez IP_3 opróżnianie magazynów komórkowych [34, 35]. Odkrycie to pozwoliło na opracowanie modeli oscylacji wapniowych opierających się na udziale tylko jednego rodzaju zbiorników wapniowych. Zaproponowany przez Atri'ego i w s p. **model dwufazowego działania wapnia** [36] opiera się na założeniu, że receptor IP_3 składa się z trzech domen. Każda z nich może znajdować się w stanie nieaktywnym lub aktywnym, polegającym na przyłączeniu określonego liganda. Domena pierwsza może przyłączyć cząsteczkę IP_3 , podczas gdy domeny druga i trzecia wiążą jony wapnia. Jeśli aktywne są domeny pierwsza i druga, co ma miejsce przy określonym stężeniu IP_3 i wapnia w cytosolu, następuje wypływ jonów Ca^{2+} z magazynów komórkowych. Gdy $[Ca^{2+}]_c$ osiągnie większą wartość, przy której także domena trzecia receptora ulegnie aktywacji, wypływ ze zbiorników wapniowych zostanie zahamowany. Model ten zakłada (Ryc. 3D), że wypływ wapnia przez pojedynczy kanał ma charakter wszystko albo nic, natomiast całkowity wypływ wapnia z magazynu wapniowego zależy od ilości otwartych kanałów. Występowanie oscylacji wapniowych jest uzależnione ponadto od stosunku ilości receptorów z przyłączoną cząsteczką IP_3 do ogólnej ilości receptorów IP_3 .

Ilość opracowanych dotychczas modeli oscylacji wapniowych jest nie tylko odzwierciedleniem kolejnych odkryć na tym polu, ale być może także rzeczywistego zróżnicowania mechanizmów generowania cyklicznych zmian stężenia wapnia w komórce. Zaproponowany ostatnio przez Shena i Lartera **model uniwersalny** [37] opiera się na założeniu, że bardziej prawdopodobne jest istnienie jednego układu pozwalającego na generowanie różnego typu oscylacji niż występowanie specyficznych mechanizmów w różnych rodzajach komórek. Autorzy ci wykorzystali elementy modeli przedstawionych przez Cuthbertsona i Chay'a [32] oraz przez Atri'ego [36]. Zgodnie z tą najnowszą hipotezą (Ryc. 4) wapń uwalniany przez IP_3 w pierwszej fazie powoduje przyspieszenie opróżniania zbiornika wapniowego przez uaktywnienie wię-



Ryc. 4. Uniwersalny model oscylacji wapniowych.

kszej liczby IP_3 -zależnych kanałów wapniowych. Zwiększony poziom wapnia w cytosolu stymuluje wytwarzanie większej ilości IP_3 przez fosfolipazę C. W drugiej fazie rosnące stężenie wapnia zaczyna wywierać hamujący wpływ na kanały wapniowe i prowadzi do zahamowania wypływu wapnia ze zbiorników. Komputerowa symulacja zmian stężenia wapnia generowanych przez taki układ wykazała, że w zależności od doboru parametrów mogą powstawać oscylacje o różnych kształtach, częstotliwości i amplitudzie [37]. Być może już wkrótce pojawi się jednak kolejny model oscylacji wapniowych uwzględniający ostatnie odkrycie, że zwiększone stężenie IP_3 w cytosolu wywiera hamujący wpływ na IP_3 -zależne kanały wapniowe [38].

IX. Fale wapniowe

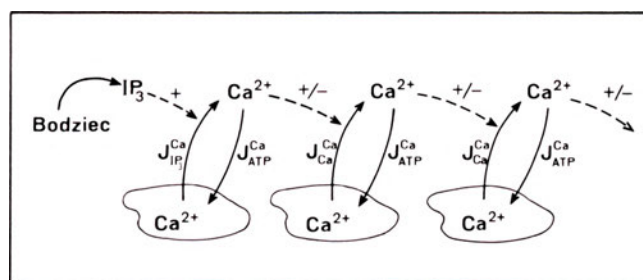
Badania przeprowadzone z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych i mikroskopii konfokalnej wykazały, że zmiany $[Ca^{2+}]_c$ nie obejmują jednocześnie całej komórki, ale rozpoczynają się w ściśle określonym miejscu i rozprzestrzeniają w cytosolu przyjmując postać fali [19, 39]. Obszar cytosolu o maksymalnym stężeniu wapnia stanowi czoło fali, które w zależności od komórki i rodzaju stymulacji może przybierać kształt spiralny, koncentryczny [26] lub płaski [40]. Miejsce, w którym rozpoczynają się oscylacje wapniowe jest charakterystyczne dla każdej komórki i nie zależy od rodzaju stymulacji [20, 39]. Dotychczasowe badania na hodowlach komórkowych wskazują, że może to być wyrazem pierwotnej polarności komórki [41, 42]. W świeżo wyizolowanych hepatocytach, w których polaryzacja jest zachowana wykazano, że fale wapniowe mają najczęściej swój początek w pobliżu błony granicznej z naczyniem krwionośnym. Wiele danych pozwala też przypuszczać, że utracona podczas izolacji polarność komórki może być odtworzona w czasie hodowli. Wiadomo, że właśnie w eksponowanej do naczynia krwionośnego części błony komórkowej znajduje się wiele receptorów i białek związanych z przekazywaniem sygnału [39].

Szybkość wzrostu stężenia wapnia oraz szybkość rozprzestrzeniania się fali w obrębie komórki są stałe i nie zależą od siły stymulacji oraz od stężenia wapnia na zewnątrz komórki [39, 43]. Taki sposób rozprzestrzeniania się fali wapniowej nasuwał przypuszczenie, że nie jest to zjawisko opierające się jedynie na dyfuzji jonów wapnia lub IP_3 , co wiązałoby się ze stopniowym zanikiem fali. Musi istnieć mechanizm odnawiający bodziec wywołujący wypływ wapnia ze zbiorników komórkowych w obejmowanych przez falę strefach komórki.

Zaproponowane dotychczas modele fal wapniowych opierają się na przedstawionych wcześniej teoriach oscylacji stężenia wapnia w komórce. W modelu Meyera i Stryera [44] wapń uwalniany z magazynów

wapniowych przez IP_3 aktywuje fosfolipazę C, co powoduje zwiększoną produkcję IP_3 i przyspieszony wypływ wapnia. Wpompowywanie wapnia do mitochondriów lub zbiorników niewrażliwych na IP_3 jest przyczyną spadku jego stężenia w cytosolu, a co za tym idzie zahamowania syntezy IP_3 i odnowienia zasobów wapnia w magazynach wrażliwych na IP_3 . Przy założeniu, że zbiorniki wapniowe wrażliwe na IP_3 oraz fosfolipaza C są rozmieszczone równomiernie w obrębie komórki, zwiększone stężenie wapnia powodowałoby inicjowanie wypływu wapnia w przylegających obszarach cytosolu. Model ten ma jednak wiele niewiadomych, na przykład nie jest pewne, czy wrażliwość PLC na stężenie wapnia jest wystarczająca do podtrzymywania opierających się na niej oscylacji [39]. Ponadto w przypadku spiralnych fal w oocytach *Xenopus* okres fali jest zbyt krótki, żeby pomiędzy kolejnymi frontami fali mogła zajść synteza wystarczającej ilości IP_3 [30]. Tak jak w przypadku modeli oscylacji opartych na cyklicznych zmianach stężenia IP_3 , także ten model został podważony przez doświadczenia z nie ulegającymi hydrolizie analogami IP_3 .

Bardziej użyteczne wydają się modele powstawania fal wapniowych oparte na procesie CICR, które są rozwiniętymi o aspekt przestrzenny modelami oscylacji. Przykładem jest tu model G i r a r d a i w s p. [20] zakładający istnienie dwóch rodzajów magazynów wapniowych (Ryc. 5). W modelu tym oscylacje wapniowe rozchodzące się w postaci spiralnej fali są generowane w oparciu o wzajemną zależność stężenia wapnia w cytosolu oraz wewnątrz zbiorników niewrażliwych na IP_3 . Wypływ wapnia ze zbiorników wrażliwych na IP_3 powoduje zwiększanie się jego stężenia w cytosolu i w zbiornikach niewrażliwych na IP_3 . Jeśli oba te stężenia są wystarczająco wysokie, rozpoczyna się gwałtowny wypływ wapnia ze zbiorników nie wrażliwych na IP_3 . Gdy stężenie wapnia wewnątrz tych zbiorników spadnie poniżej określonej wartości jego wypływ zostaje zahamowany, podczas gdy w tym samym czasie rozpoczyna się wypływ wapnia ze zbiorników w dalszej strefie cytosolu. Nowsze modele fal wapniowych zakładają istnienie jednego rodzaju zbiorników i, w zależności od stężenia, stymulujący lub hamujący wpływ $[Ca^{2+}]_c$ na IP_3 -zależny kanał wapniowy [36].

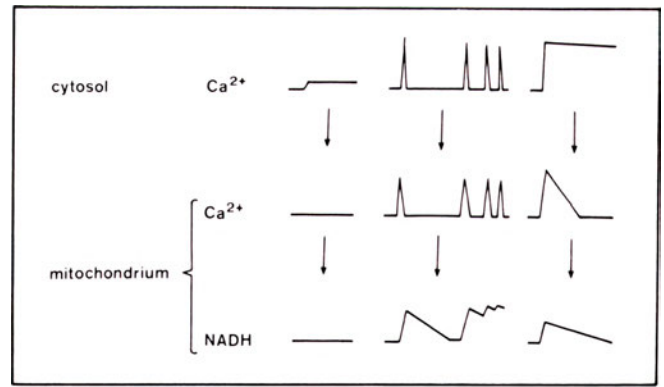


Ryc. 5. Model rozprzestrzeniania się fali wapniowej w komórce.

X. Zmiany stężenia wapnia w jądrze komórkowym i w mitochondriach

Oddzielnie badanymi zagadnieniami związanymi z oscylacjami i falami wapniowymi w komórce jest ich wpływ na stężenie wapnia wewnątrz jądra komórkowego i mitochondriów. W organellach tych jest zlokalizowanych wiele rodzajów białek wrażliwych na wapń [45, 46], wobec tego powinien istnieć mechanizm regulujący zmiany stężenia wapnia w płynie jądrowym i w matriks mitochondrialnej. Przeprowadzone dotychczas badania z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych gromadzących się w jądrze wykazały, że oscylacjom wapniowym w cytosolu towarzyszą zmiany stężenia wapnia w płynie jądrowym o podobnej dynamice [19] i amplitudzie [47, 48]. Oscylacje wapniowe rozprzestrzeniają się w nukleoplazmie w postaci fali stanowiącej przedłużenie fal wapniowych w otaczającym jądro cytosolu [19]. Pojawiło się wobec tego pytanie w jaki sposób są generowane fale wapniowe przechodzące przez jądro komórkowe. Badania przeprowadzone na hepatocytach wykluczyły istnienie wewnątrz jądra zbiorników zawierających wapń. Wykazały natomiast, że wapń jest gromadzony w otoczce jądrowej i uwalniany z niej do cytosolu pod wpływem IP_3 . Według jednej z hipotez, próbującej tłumaczyć zjawisko przemieszczania się fali wapniowej w jądrze komórkowym, IP_3 powoduje uwolnienie wapnia z otoczki jądrowej do cytosolu otaczającego jądro. Przez pory w otoczce wapń dyfunduje następnie do wnętrza jądra. Choć jądro komórkowe jest stosunkowo duże, nawet przy największej jego średnicy żadna część nukleoplazmy nie jest oddalona od otoczki jądrowej o więcej niż $5 \mu m$, czyli o tyle, ile wynosi efektywny zasięg dyfuzji Ca^{2+} w cytosolu [19].

Zmiany stężenia wapnia w matriks mitochondrialnej i ich zależność od oscylacji wapniowych w cytosolu były przedmiotem mniejszej liczby badań. W pobudzonych elektrycznie komórkach mięśnia sercowego stwierdzono proporcjonalne do częstotliwości stymulacji podwyższenie stężenia wapnia w mitochondriach [49]. Bardzo ciekawe eksperymenty w tej dziedzinie przeprowadzono z wykorzystaniem akworyny (białka pochodzącego z jamochłonu *Aequorea victoria*), której właściwości optyczne są wrażliwe na wapń [50]. Do komórek zwierząt wyższych wprowadzano gen kodujący akworynę z dołączoną sekwencją powodującą transportowanie tego białka do mitochondriów. Zdemontrowano, że wzrost $[Ca^{2+}]_c$ powoduje jednoczesny wzrost stężenia wapnia w mitochondriach. Eksperymenty z wykorzystaniem różnych barwników fluorescencyjnych wykazały, że zmiany stężenia wapnia w matriks mitochondrialnej odzwierciedlają oscylacyjny charakter zmian zachodzących w cytosolu [29]. Nie są one jednak ich dokładnym odbiciem, ponieważ przy utrzymującym się stałym podwyższeniu $[Ca^{2+}]_c$, spowodowanym wysokim poziomem hormonu, wzrost stężenia Ca^{2+} w mitochondriach jest przejściowy.



Ryc. 6. Wpływ zmian $[Ca^{2+}]_c$ na stężenia wapnia w matriks mitochondrialnej i aktywność mitochondrialnych dehydrogenaz.

Zmianom stężenia wapnia w mitochondriach towarzyszą modyfikacje aktywności dehydrogenaz mitochondrialnych wrażliwych na wapń, których miarą jest poziom NADH (Ryc. 6). Mają one również charakter oscylacji, o tej samej częstotliwości co zmiany w $[Ca^{2+}]_c$, ale ze znacznie wolniejszą fazą spadkową. Zwiększanie częstotliwości oscylacji wapniowych w matriks mitochondrialnej powoduje stopniowe skracanie się tej fazy aż do całkowitego jej zaniku i utrzymywania się stałej aktywacji enzymów. Przejściowe podwyższenie wapnia w mitochondriach na skutek wysokiego $[Ca^{2+}]_c$ powoduje krótkotrwałą i niepełną aktywację enzymów [29]. Sposób regulowania stężenia wapnia w mitochondriach przez zmiany zachodzące w cytosolu nie został ostatecznie poznany. Wiadomo jedynie, że wapń nie dyfunduje swobodnie do matriks mitochondrialnej, lecz jest aktywnie transportowany przez znajdujący się w błonie nośnik (uniport). Transport wapnia z mitochondrium do cytosolu zachodzi natomiast poprzez wymienniki zależne od Na^+ lub H^+ [29]. W błonach ER w bezpośrednim sąsiedztwie mitochondriów zaobserwowano zwiększoną ilość receptorów IP_3 [51, 52]. Pozwala to przypuszczać, że wysoka aktywność pobierania wapnia przez mitochondria jest związana z miejscowym podwyższeniem $[Ca^{2+}]_c$ [4, 53].

XI. Synchronizacja zmian stężenia wapnia w obrębie tkanki

Oscylacje i fale wapniowe są najczęściej badane w wyizolowanych komórkach lub na hodowlach komórkowych. Znaczenie zdobytych w ten sposób danych zależy od tego, czy takie same zmiany zachodzą w warunkach naturalnych. Doświadczenia przeprowadzone na wątrobie szczurzej poddanej perfuzji wykazały, że oscylacje wapniowe w nie izolowanych komórkach mają taki sam przebieg, jaki obserwowano w izolowanych hepatocytach. Fale wapniowe rozprzestrzeniają się nie tylko w obrębie pojedynczych hepatocytów, ale także poprzez połączenia w błonach komórkowych (*gap junctions*) przenoszą się do przylegających komórek i ogarniają w ten sposób cały zrazik wąt-

robowy. Podobnie jak w przypadku izolowanych hepatocytów, szybkość przemieszczania się fali w pojedynczej natywnej komórce nie zależy od dawki hormonu. Natomiast szybkość rozprzestrzeniania się fali w obrębie tkanki zależy od intensywności stymulacji, i jest to najprawdopodobniej związane z zależną od dawki hormonu długością okresu latencji. Budowa tkanki wątrobowej umożliwia rozprzestrzenianie się fal wapniowych na duże odległości, co pozwala na synchronizację odpowiedzi wapniowej w obrębie zrazików wątrobowych. Jest to przypuszczalnie sposób koordynowania procesów związanych z fizjologiczną funkcją wątroby. Ponieważ oscylacje i fale wapniowe wykazano w najróżniejszych rodzajach komórek, wydaje się, że jest to zjawisko uniwersalne, zapewniające tkankom i organom spójność niezbędną dla prawidłowego funkcjonowania organizmu [54].

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

- Calpham DE (1995) *Cell* **80**: 259-268
- Taylor CW (1995) *Biochem Soc Trans* **23**: 637-642
- Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J (1994) *Physiol Rev* **74**: 595-636
- Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) *Science* **262**: 744-746
- Himpens B, De Smedt H, Droogmans G, Casteels R (1992) *Am J Physiol* **263**: C95-C105
- Berridge MJ (1995) *Biochem J* **312**: 1-11
- Niewczas B (1995) *Post Biochem* **41**: 283-289
- Milner RE, Famulski KS, Michalak M (1992) *Mol Cell Biochem* **112**: 1-13
- Nicoterra P, Zhivotovsky B, Orrenius S (1994) *Cell Calcium* **16**: 2769-288
- Volpe P, Krause KH, Hashimoto S, Zorzato F, Pozzan T, Meldolesi J, Lew DP (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1091-1095
- Volpe P, Villa A, Damiani E, Sharp AH, Podini P, Snyder SH, Meldolesi J (1991) *EMBO J* **10**: 3183-3189
- Allbritton NL, Meyer T, Stryer L (1992) *Science* **258**: 1812-1815
- Neher E, Augustine GJ (1992) *J Physiol* **450**: 273-301
- Wagner J, Keizer J (1994) *Biophys J* **67**: 447-456
- Kendall JM, Dormer RL, Campbell AK (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1008-1016
- Reich J, Selkov EE (1981) *W: Energy Metabolism of the Cell*, Academic Press
- Lawrence YM, Cuthbertson K SR (1995) *Cell Calcium* **17**: 154-164
- Meyer T, Stryer L (1991) *Annu Rev Biophys Chem* **20**: 153-174
- Lin C, Hajnóczky G, Thomas AP (1994) *Cell Calcium* **16**: 247-258
- Girard S, Lückhoff A, Lechleiter J, Sneyd J, Clapham D (1992) *Biophys J* **61**: 509-517
- Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER (1990) *Cell Regul* **1**: 585-596
- Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ (1992) *Science (Washington DC)* **258**: 292-295
- Charles A, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) *Neuron* **6**: 983-992
- Malgaroli A, Fesce R, Meldolesi J (1990) *J Biol Chem* **265**: 3005-3008
- Missaen L, Taylor CW, Berridge MJ (1991) *Nature (Lond)* **352**: 241-244
- Dupont G, Goldbeter A (1992) *BioEssays* **14**: 485-493
- Tsien RW, Tsien RY (1990) *Annu Rev Cell Biol* **6**: 715-760
- Lechleiter JD, Clapham DE (1992) *Cell* **69**: 283-294
- Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) *Cell* **82**: 415-424
- Berridge MJ (1987) *Annu Rev Biochem* **56**: 159-193
- Meyer T, Stryer L (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5051-5055
- Cuthbertson KSR, Chay TR (1991) *Cell Calcium* **12**: 97-109
- Goldbeter A, Dupont G, Berridge MJ (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1461-1465
- Parys JB, Sernett SW, DeLisle S, Snyder PM, Welsh MJ, Campbell KP (1992) *J Biol Chem* **267**: 18776-18782
- Lino M, Endo M (1992) *Nature (Lond)* **360**: 76-78
- Atri A, Amundson J, Clapham D, Sneyd J (1993) *Biophys J* **65**: 1727-1739
- Shen P, Larter R (1995) *Cell Calcium* **17**: 225-232
- Hajnóczky G, Thomas AP (1994) *Nature (Lond)* **370**: 474-477
- Thomas AP, Renard DC, Rooney TA (1991) *Cell Calcium* **12**: 111-126
- Amundson J, Clapham D (1993) *Curr Opin Cell Biol* **3**: 375-382
- Nathanson MH, Burgstahler AD (1992) *Moll Biol Cell* **3**: 113-121
- Rooney TA, Sass EJ, Thomas AP (1990) *J Biol Chem* **265**: 10792-10796
- Rooney TA, Renard DC, Sass E, Thomas AP (1991) *J Biol Chem* **266**: 12272-12282
- Meyer T, Holowka D, Stryer L (1988) *Science* **240**: 653-656
- Bachs O, Agell N, Carafoli E (1992) *Biochim Biophys Acta* **1113**: 259-270
- Denton RM, McCormack JG (1980) *FEBS Lett* **119**: 1-8
- Waybill MM, Yelamarty RV, Zhang Y et al (1991) *Am J Physiol* **261**: E49-E57
- Al-Mohanna FA, Caddy KWT, Bolsover SR (1994) *Nature (Lond)* **367**: 745-750
- Miyata H, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG (1991) *Am J Physiol* **261**: H1123-H1134
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T (1992) *Nature (Lond)* **358**: 325-327
- Satoh T, Ross CA, Villa A, Supattapone S, Pozzan T, Snyder SH, Meldolesi J (1990) *J Cell Biol* **111**: 615-624
- Takei K, Stukenbrok H, Metcalf A, Mignery GA, Südhof TC, Volpe P, De Camilli P (1992) *J Neurosci* **12**: 489-505
- Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1994) *J Cell Biol* **126**: 1183-1194
- Thomas AP, Robb-Gaspers LD, Rooney TA, Hajnóczky G, Renard-DC, Lin C (1995) *Biochem Soc Transactions* **23**: 642-648

**Prenumerata „Postępów Biochemii”
w 1996 r.**

**Prenumerata dla instytucji — 60 zł
Indywidualna — 28 zł
50% zniżki dla członków PTBioch.**

Regulacja stopnia oksydoredukcji grup tiolowych w komórkach zwierzęcych

Regulation of thiol group redox state in animal cells

EWA LENARTOWICZ¹
JOLANTA WUDARCZYK²
GRAŻYNA DĘBSKA³

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Wymiana grup -SH i -SS- między białkami i glutationem
- III. Układ glutaredoksynowy
- IV. Układ tioredoksynowy
- V. Izomeraza białkowych disulfidów
- VI. Cytoplazmatyczne reakcje utleniające grupy -SH
- VII. Bezpośrednie utlenianie grup -SH przez reaktywne formy tlenu
- VIII. Uwagi końcowe

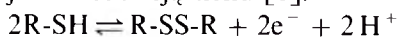
Contents:

- I. Introduction
- II. Thiol-disulfide exchange between cellular proteins and glutathione
- III. Glutaredoxin system
- IV. Thioredoxin system
- V. Protein disulfide isomerase
- VI. Cytoplasmic reactions oxidizing -SH groups
- VII. Oxidation of thiol groups by reactive oxygen species
- VIII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: GSH-glutation zredukowany; GSSG-glutation utleniony; R — stosunek [GSH]/[GSSG]; K_{ox} — stała równowagi reakcji wymiany z glutationem; PDI — izomeraza białkowych disulfidów; Pr — białko.

I. Wstęp

Znaczna część komórkowych grup tiolowych (-SH) ulega odwracalnemu utlenieniu; ditiole (sąsiadujące grupy -SH) utleniają się do wewnątrzcząsteczkowych disulfidów (-SS-), podczas gdy monotiole (pojedyncze grupy -SH) tworzą mieszane międzycząsteczkowe disulfidy (RSSR') oraz, rzadziej, utleniają się do sulfenianów (-SOH), sulfeninów (-SO₂H) lub sulfonianów (-SO₃H). Reakcja utlenienia netto grup -SH związana jest z redukcją tlenu [1]:



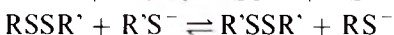
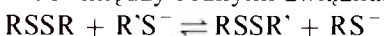
Reakcja odwrotna, redukcja disulfidów, zachodzi w komórce na koszt ekwiwalentów redukcyjnych dostarczanych przez NADPH:



Jednakże w komórce zarówno utlenienie netto białkowych grup -SH jak i redukcja grup -SS- przez

NADPH ograniczone są do nielicznych reakcji, omawianych w dalszych częściach tego artykułu.

Główną drogą utleniania i redukowania komórkowych grup -SH/SS- są reakcje wymiany spowodowane wysoką reaktywnością grup -SH [2]. Grupy -SH należą do najbardziej reaktywnych grup chemicznych w komórce. Reaktywność ich ujawnia się po dysocjacji, ponieważ formą reaktywną jest anion tiolanowy, $-S^-$: $R-SH \rightleftharpoons R-S^- + H^+$ Dysocjacja grup -SH związków alifatycznych w roztworach wodnych następuje powyżej pH fizjologicznego, pK tej reakcji wynosi 8,5 [3]. Jednakże w łańcuchach peptydowych, przy szczególnej sekwencji aminokwasów i w sąsiedztwie reszt naładowanych dodatnio, pK tych grup może ulec obniżeniu aż do 3,8 [4]. Obniżeniu temu towarzyszy spadek reaktywności anionów tiolanowych, około 3-krotny przy obniżeniu pK o jednostkę. A zatem zwiększenie ilości anionów tiolanowych związane jest z niższą ich reaktywnością. *In vitro* najwyższa szybkość reakcji z udziałem grup -SH występuje przy pH równym pK [2]. Reaktywność anionów tiolanowych polega na ataku nukleofilowym na grupy -SS-, co prowadzi do wymiany grup -SH i -SS- między różnymi związkami:



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

Aktualny kierunek tej wymiany zależy od różnicy standardowych potencjałów oksydoredukcyjnych oraz od stężeń reagentów [2].

Wiadomo, że w warunkach fizjologicznych utlenienie białkowych grup -SH w komórce może następować przez ich wymianę z grupami -SS- występującymi w GSSG i innych, niezidentyfikowanych dotychczas związkach.

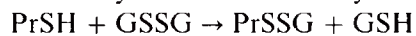
Regeneracja białkowych grup -SH po ich utlenieniu następuje drogą wymiany z grupami -SH glutaredoksyny (E.C. 1.8.4.2.) i tioredoksyny. Glutaredoksyna i tioredoksyna są małymi białkami zawierającymi w centrum aktywnym reaktywną grupę ditiolową [5]. Katalizują one odwracalną reakcję: redukcję mostka disulfidowego i utlenienie ditioli. Oba te białka są redukowane przez ekwiwalenty redukcyjne pochodzące z NADPH. W związku z tym stan oksydoredukcyjny grup -SH/-SS- ulegających utlenieniu/redukcji jest funkcją stopnia redukcji nukleotydów nikotynamidowych. Dlatego, podobnie jak NADP, białka wewnątrzkomórkowe są bardziej zredukowane niż białka przestrzeni międzykomórkowych [6].

II. Wymiana grup -SH i -SS- między białkami i glutationem

Glutation jest trójpeptydem, γ -glutamilo-cysteinylo-glicyną, rozpuszczalnym w wodzie. W typowej komórce glutation występuje w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze w wysokich stężeniach, 5-10 mM.

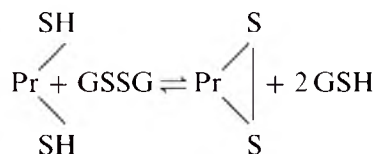
Jedynie w siateczce endoplazmatycznej stężenie jego jest znacznie niższe, sięga tylko 2 mM [7]. Glutation ulega utlenieniu w reakcji z nadtlenkami katalizowanej przez peroksydazę glutationową (E.C. 1.11.1.9.) i redukcji kosztem ekwiwalentów redukcyjnych NADPH w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową (E.C. 1.6.4.2.). Glutation uważany jest za najważniejszy komórkowy „bufor tiolowy” a stosunek stężeń jego formy zredukowanej do utlenionej $[GSH]/[GSSG]$, określany symbolem R, jest miarą stanu oksydoredukcji środowiska komórkowego [2, 8].

Glutation może bezpośrednio wpływać na stan oksydoredukcji niektórych białek komórkowych przez nieenzymatyczną wymianę grup -SH/-SS- [2]. W przypadku monotiole białkowych reakcja ta prowadzi do wytworzenia mieszanych disulfidów [9]:

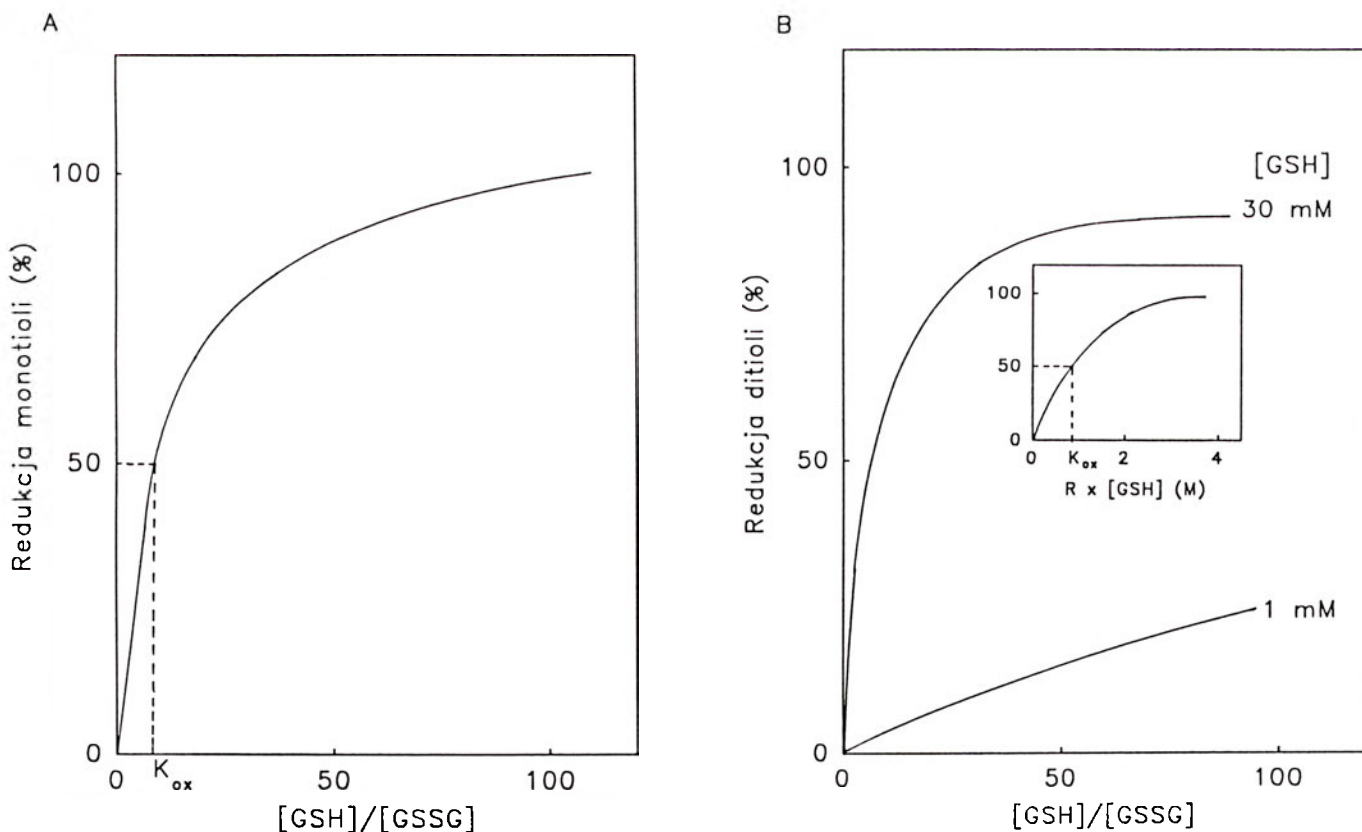


Białka komórkowe tworzą mieszane disulfidy (ulegają S-tiolacji) nie tylko z glutationem ale także, w małym stopniu, z cysteiną i cysteaminą.

W przypadku grup ditiolowych w białku (występujących częściej niż monotiole) reakcja wymiany z glutationem prowadzi do powstawania wewnątrzcząsteczkowych mostków disulfidowych [3]:



Stała równowagi tych reakcji zwana stałą utleniania,



Ryc. 1. Wpływ stosunku stężeń zredukowanego i utlenionego glutationu na redukcję grup monotiolowych i ditiolowych. Wstawka przedstawia zależność redukcji grup ditiolowych od iloczynu $[GSH]/[GSSG] \times [GSH]$. K_{ox} jest wartością R (dla monotioleli) lub $R \times [GSH]$ (dla ditioli) odpowiadającą 50% redukcji grupy -SH.

K_{ox} , jest wartością charakterystyczną dla każdego związku posiadającego grupy -SH lub -SS- [8]. Można ją wyrazić następującymi wzorami dla reagujących monotioli (a) i ditioli (b) białkowych:

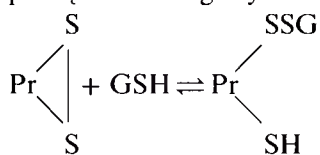
$$(a) K_{ox} = [\text{PrSSG}][\text{GSH}]/[\text{PrSH}][\text{GSSG}]$$

$$(b) K_{ox} = [\text{Pr(SS)}][\text{GSH}]^2/[\text{Pr(SH)}_2][\text{GSSG}]$$

Wartość K_{ox} jest proporcjonalna do potencjału oksydoredukcyjnego grup -SH/-SS-: 10-krotna zmiana K_{ox} odpowiada w przybliżeniu zmianie potencjału o 30 mV. Stała utleniania jest jedną z podstawowych własności każdego białka zawierającego cysteinę. Wysoka wartość K_{ox} oznacza tendencję do utrzymania grup -SS- (a zatem do redukowania otoczenia), a niska jej wartość preferencję dla grup -SH (czyli skłonność do utleniania środowiska). Stopień redukcji monotioli białkowych reagujących z glutationem zależy bezpośrednio od R (Ryc. 1A). Przy R równym K_{ox} połowa białkowych grup -SH/-SS- jest zredukowana. Jeśli R jest niższy od K_{ox} następuje nagromadzenie koniugatów PrSSG, podczas gdy przy stosunku R wyższym od K_{ox} następuje redukcja białkowych grup -SS- [2, 8, 9].

Jeśli w reakcję z glutationem wchodzi nie monotiolo, lecz ditiolo białkowe, to K_{ox} jest zależna od iloczynu $R \times [\text{GSH}]$. Zależy ona zatem nie tylko od stopnia redukcji glutationu, ale także od jego bezwzględnego stężenia i staje się wówczas liczbą wyrażoną w jednostkach molarnych [3]. Można łatwo określić eksperymentalnie czy badane białko tworzy wewnątrzcząsteczkowe grupy -SS- inkubując je przy dwóch stężeniach glutationu o tym samym stosunku R (Ryc. 1B). Jeśli w tych warunkach stopień redukcji białkowych grup -SH/-SS- pozostaje niezmienny, to białko to nie zawiera grup ditiolowych, a zatem nie może wytworzyć wewnątrzcząsteczkowych mostków -SS-. Przy wzroście stężenia GSH ditiolo białkowe, w odróżnieniu od monotioli, osiągają ten sam stopień redukcji przy niższym stosunku R. Połowiczna redukcja grup ditiolowych w białku występuje przy K_{ox} równej iloczynowi $R \times [\text{GSH}]$ [2, 8, 9].

Białkowe disulfidy nie mogą być zredukowane przez nieenzymatyczną wymianę z GSH przy jego fizjologicznych stężeniach [10]. Podczas tej reakcji białko początkowo ulega tylko częściowej redukcji:



Atak nukleofilowy grupy -SH na sąsiadującą grupę -SSG odtwarza GSH i disulfid białkowy. Na ogół dopiero przy ponadfizjologicznych stężeniach GSH następuje przyłączenie jego drugiej cząsteczki do białka i wytworzenie białkowej grupy ditiolowej.

Prawidłowy, właściwy dla danego białka stan redukcji grup -SH/-SS-, zostaje nadany mu w czasie translacji lub bezpośrednio po niej. Rozpiętość w wartościach K_{ox} różnych białek sięga dwunastu rzędów, od

10^{-5} M (E'_0 w granicach - 110 mV) dla izomerazy disulfidów białkowych i fosforylasy b do 10^7 M (około - 470 mV) dla inhibitora trypsyny [11, 12]. Na wartość tej stałej wpływa przede wszystkim położenie reszt cysteinowych w łańcuchu peptydowym. Optymalne warunki dla wytworzenia wiązań -SS- występują przy resztach cysteinowych oddzielonych czterema aminokwasami. Wówczas K_{ox} pozostaje w zakresie 0,5-1,0 M (co odpowiada E'_0 od - 260 do - 200 mV) [2]. Bezpośrednio sąsiadujące ze sobą w łańcuchu peptydowym reszty cysteinowe nie wytwarzają wiązań -SS- (wyjątkiem jest receptor acetylocholino), ze względu na zbyt duże odkształcenie łańcucha [13, 14]. Gdy reszty cysteinowe oddziela tylko jeden aminokwas, to grupy -SH pozostają zredukowane wykazując K_{ox} rzędu 10^{-3} M (E'_0 około - 180 mV) [15]. Małe peptydy charakteryzują się na ogół wartością K_{ox} poniżej 0,1 M, a w silnie pofaldowanych cząsteczkach białkowych stała ta osiąga wysokie wartości, do 10^5 M. Wartość K_{ox} dla reakcji produkujących mieszane disulfidy białkowo-glutationowe waha się w granicach 0,1-10. Dla wewnątrzkomórkowych białek wątroby stała ta wynosi średnio 3, a najwyższa obserwowana dotychczas jej wartość (dla hydroksy-metyloglutarylo-CoA reduktazy) wynosiła 27 [16].

K_{ox} nie jest wartością stałą, ulega zmianom pod wpływem czynników stabilizujących jedną z form białka, utlenioną lub zredukowaną. Jeśli grupy -SH są położone głęboko w cząsteczce białka i dlatego słabo dostępne dla glutationu, to K_{ox} ulega obniżeniu. Również jeśli białko reaguje ze związkiem zmieniającym stan utlenienia grup -SH/-SS- to K_{ox} ulega zmianie. Pod wpływem efektora wiążącego się z formą zredukowaną następuje obniżenie wartości K_{ox} , a efekторы wiążące się z formą utlenioną podwyższają wartość tej stałej. Wszystkie czynniki które ułatwiają tworzenie wiązań -SS- podwyższają wartość K_{ox} [2].

Zmiany w stopniu redukcji glutationu wpływają na redukcję tioli tylko niektórych białek o stosunkowo wąskim zakresie K_{ox} , co wynika ze znacznie większych różnic w potencjałach oksydoredukcyjnych białek komórkowych niż glutationu. Potencjał oksydoredukcyjny glutationu, ze względu na udział dwóch cząsteczek GSH w wytworzeniu jednej cząsteczki GSSG, jest zależny od stężenia GSH:

$$E_n = E_0 + 2,3 \times R_{gas} T/nF \times \lg([\text{GSSG}]/[\text{GSH}]^2)$$

W równaniu tym symbole mają następujące znaczenia: E_n — potencjał oksydoredukcyjny względem elektrody wodorowej, E_0 — standardowy potencjał glutationu (-240 mV), R_{gas} — stała gazowa (8,3 J/K x mol), T — temperatura absolutna (K), n — liczba przenoszonych elektronów (dla wymiany -SH/-SS- = 2), F — stała Faradaya (96,4 J/V). Przy R = 1 wartości potencjału oksydoredukcyjnego wynoszą, odpowiednio, 133 i 170 mV przy 1 i 8 mM stężeniu glutationu [7].

Wahania stosunku R w warunkach fizjologicznych są znaczne. Dla wątroby wynosi on 300-400 w normalnych warunkach fizjologicznych, około 150 podczas

głodu, a pod wpływem stresu oksydacyjnego może spaść aż do 2. Natomiast iloczyn $R \times [GSH]$ w normalnych warunkach fizjologicznych wynosi 3-4 M, podczas głodu 1 M, a przy stresie oksydacyjnym może się obniżyć do 10^{-3} M (5). Najczęściej obserwowane zmiany iloczynu $R \times [GSH]$, od 0,2 do 3 M, odpowiadają zmianom potencjału oksydoredukcyjnego od - 270 do - 230 mV.

Wyraźna odpowiedź na zmiany redukcji glutationu występuje w białkach wykazujących K_{ox} wyłącznie w zakresie zmian R lub $R \times [GSH]$. Jednak większość białek charakteryzuje się wyższymi lub niższymi wartościami K_{ox} , a zatem ich grupy tiolowe są stale utlenione lub zredukowane, niezależnie od zmian w redukcji glutationu. Zaledwie 10% białek wątroby tworzyło mieszane disulfidy podczas stresu oksydacyjnego [17]. Ich produkcja była proporcjonalna do stężenia GSSG [18]. W wątrobie mieszane disulfidy są tworzone głównie z anhydrazą III [18]. W sercu znane są mieszane disulfidy glutationu z fosforylazą b i kinazą kreatynową [18, 19].

Utlnienie komórkowego glutationu aktywuje glukozę-6-fosfatazę, fruktozo-1,6-difosfatazę [20], dehydrogenazę glukozę-6-fosforanu, kinazę C [20], reduktazę hydroksymetyloglutarylo-CoA [2, 4], fosforylazę b [11] i transporter glukozy [2]. Jednocześnie następuje hamowanie syntetazy glikogenu [2, 20], heksokinazy, kinazy pirogronianowej, cyklazy adenylanowej [2, 20], fosfofruktokinazy [11], dehydrogenazy aldehydu 3-fosoglicerynowego, dehydrogenazy bursztynianowej [2], dehydrogenazy izocytrynianowej (NADP) [4], transhydrogenazy nukleotydów nikotynamidowych [21] i syntetazy kwasów tłuszczowych [9, 20].

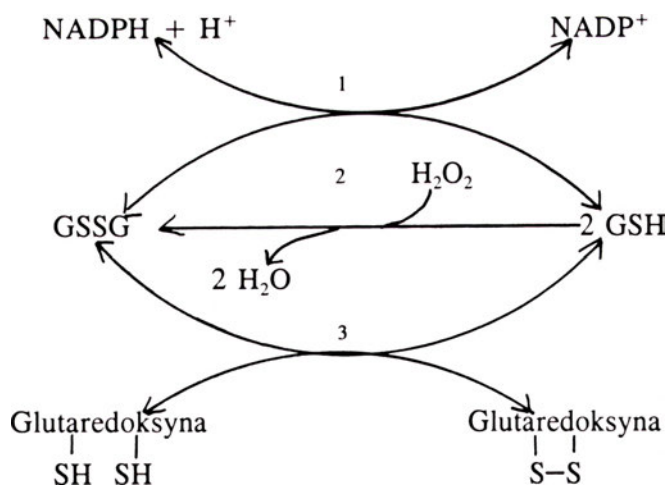
Glutation jest syntetyzowany we wszystkich komórkach eukariotycznych [22]. Ilość glutationu w wątrobie wzrasta 3-krotnie przy diecie białkowej, natomiast przy nadczynności tarczycy spada do 40% normy [23]. Stężenie glutationu w komórkach serca jest w porównaniu z wątrobą kilkakrotnie niższe, lecz bardziej stabilne, nie ulega zmianom [24]. W osoczu krwi stężenie glutationu jest bardzo niskie, około $20 \mu M$, i jest on tam w znacznym stopniu utleniony, stosunek R wynosi około 15 [2]. Krew zawiera dwukrotnie więcej cysteiny (głównie w postaci cystyny) niż glutationu, około $240 \mu M$ białkowych grup -SH i różne koniugaty glutationu [25].

III. Układ glutaredoksynowy

Spontaniczne reakcje tioli komórkowych z glutationem są reakcjami powolnymi [26]. Glutaredoksyna, zwana inaczej transferazą tiolową (EC 1.8.4.2.), specyficznie przyspiesza reakcję.



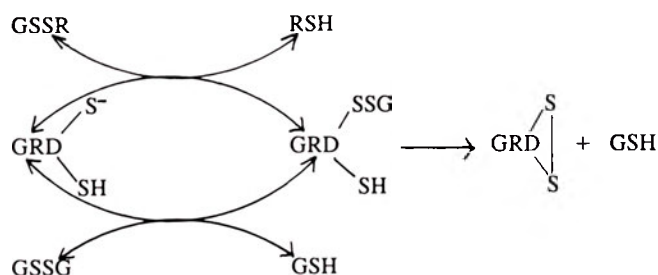
Enzym ten występuje głównie w śledzionie ($120 \mu g/g$), wątrobie i nerkach podczas gdy w mięśniach i sercu jest go wielokrotnie mniej [27]. Wątrobowa



Ryc. 2. Układ glutaredoksynowy: 1 — reduktaza glutaredoksynowa, 2 — peroksydaza glutationowa, 3 — wymiana grup SH/SS między glutationem a glutaredoksyną.

glutaredoksyna jest białkiem o masie 11 kDa, zawierającym w centrum aktywnym ditiol w sekwencji aminokwasów -Cys-Pro-Tyr-Cys-Arg-Lys- [28]. Bliskość ładunków dodatnich wpływa na drastyczne obniżenie pK grupy tiolowej Cys 22 do 3,8 i silny atak nukleofilowy anionów tiolanowych [4]. Aktywność redukcyjną glutaredoksyny determinuje stan redukcji grup -SH/-SS- w centrum aktywnym (E'_0 około - 230 mV), które są w równowadze z analogicznymi grupami glutationu [29]. W związku z tym „układ glutaredoksynowy” obejmuje NADPH, reduktazę glutationową, glutation i glutaredoksynę (Ryc. 2). Reakcja redukcji przez glutaredoksynę przebiega z wytworzeniem w centrum aktywnym enzymu kolejno mieszanego disulfidu i mostka disulfidowego, z którego grupy tiolowe są odtwarzane przy udziale ekwiwalentów redukcyjnych pochodzących z GSH (Ryc. 3) [30].

Glutaredoksyna odgrywa istotną rolę w przenoszeniu ekwiwalentów redukcyjnych między tiolami cytoplazmy. Występuje również w błonie komórkowej i siateczce endoplazmatycznej, natomiast nie znaleziono jej dotychczas w mitochondriach [4, 31]. Układ glutaredoksynowy może być donorem ekwiwalentów redukcyjnych dla redukcji rybonukleotydów [5]. Regeneracja aktywności enzymatycznej przez glutaredoksynę po utlenieniu grup -SH obserwowana była w przypadku kinazy pirogronianowej [32], trypsyny [33], dekarboksylazy ornitynowej [34], fosfofruktokinazy i dehydrogenazy aldehydu 3-fosoglicerynowego

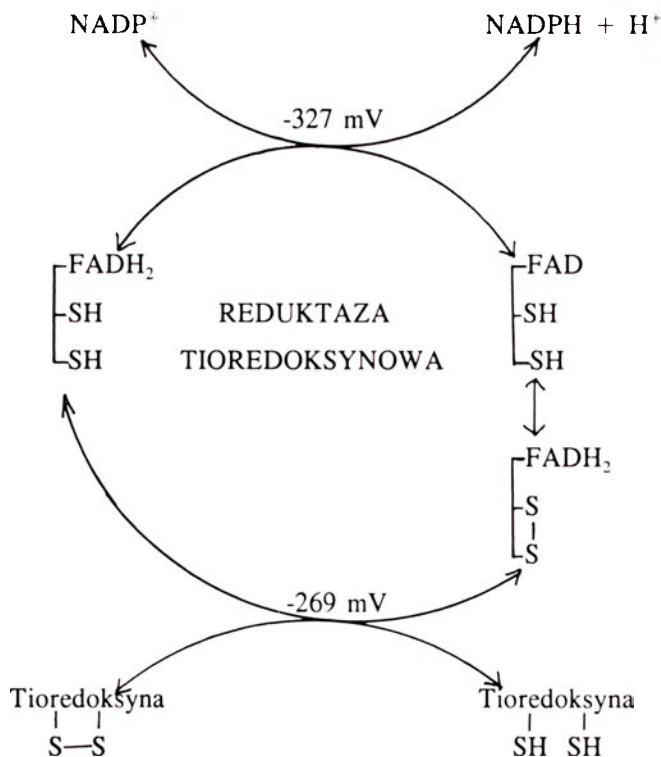


Ryc. 3. Mechanizm działania glutaredoksyny. Schemat reakcji w oparciu o dane Gravin i w sp. [30]; GRD — glutaredoksyna.

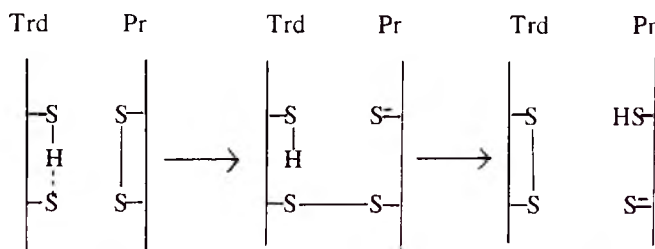
[35]. Ponadto glutaredoksyna wykazuje aktywność reduktazy dehydroaskorbinianu [36] i bierze udział w dejodynacji tyroksyny przez mikrosomalną dejodynazę [37].

IV. Układ tioredoksynowy

Utlenione formy grup -SH w białkach komórkowych są najaktywniej redukowane przez tioredoksynę. Podobnie jak w przypadku glutaredoksyny, redukcja ich zachodzi kosztem ekwiwalentów redukcyjnych NADPH (Ryc. 4) [38]. Tioredoksyna została oczyszczona po raz pierwszy z *E. coli* w roku 1964. Jest to białko o masie 12 kDa, występujące w każdej komórce świata ożywionego i we wszystkich organellach subkomórkowych. U ssaków najwięcej jej jest w wątrobie (0,7 μg w mg białka), nerkach i grasicy [39]. W cytoplazmie wątroby tioredoksyna występuje we frakcji rozpuszczalnej. Tioredoksyna posiada reaktywną grupę ditiolową w sekwencji -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys- położoną w otoczeniu hydrofobowym [39]. Jej potencjał oksydoredukcyjny jest znacznie niższy, -269 mV, niż analogicznej grupy w glutaredoksynie, -230 mV [8, 29]. Grupa tiolowa cysteiny Cys 32 w tioredoksynie charakteryzuje się pK około 6,7. Prócz ditiolu w centrum aktywnym tioredoksyna zawiera jeszcze jedną grupę ditiolową o znaczeniu regulacyjnym. Jej utlenienie inaktywuje oksydoredukcyjne działanie tioredoksyny. A zatem stopień redukcji obu grup ditiolowych tioredoksyny determinuje jej aktywność redukcyjną [38]. W stanie natywnym tioredoksyna wykazuje $K_{0,5}$ w granicach 10-16 M [8]. A zatem przy połowicznej redukcji ditiolu w centrum katalitycznym jest ona taka



Ryc. 4. Układ tioredoksynowy. Wartości w mV wyrażają potencjały standardowe wg Gilberta [8]



Ryc. 5. Mechanizm redukcji disulfidów białkowych przez tioredoksynę. Schemat w oparciu o dane Jenga i w s.p. [40].

sama jak glutationu w stężeniu 10 mM o stosunku $R > 1000$. Tioredoksyna redukuje disulfidy białek wysokocząsteczkowych z szybkością 10^4 razy wyższą niż ditiotreitól [2]. Ta ogromna aktywność redukcyjna związana jest ze szczególną strukturą centrum aktywnego i wspólnym protonem dla dwóch cystein (Ryc. 5) [39]. W przeciwieństwie do glutaredoksyny, która jest specyficzna dla mieszanych disulfidów zawierających glutation, tioredoksyna redukuje wszelkie białkowe disulfidy oraz produkty utlenienia monotioli [30, 35]. Tioredoksyna redukuje cały szereg enzymów: insulinę, reduktazę rybonukleotydów, chymotrypsynę [5], dekarboksylazę ornitynową [34], dehydrogenazę aldehydu 3-fosfoglicerynowego [34], dehydrogenazę glukozy-6-fosforanu, fosfolipazę A_2 [41], fosfoglicerokinazę [42], syntazę karbamylfosforanu [43] oraz surowiczą peroksydazę glutationową [44].

In vitro disulfid tioredoksyny można zredukować ditiotreitolem, *in vivo* redukcja ta katalizowana jest głównie przez reduktazę tioredoksynową [38]. Jest to enzym indukowany przez glukagon i kortykosteroidy i składający się z dwu podjednostek o masie po 58 kDa [43]. W centrum aktywnym zawiera dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i aktywną grupę ditiolową w sekwencji -Ala-Cys-Ala-Thr-Cys-Asp-. Ekwiwalenty redukcyjne z NADPH ($E_0' = -327$ mV) są przenoszone na FAD i następnie z $FADH_2$ na grupę disulfidową (E_0' waha się od -270 do -260 mV zależnie od redukcji FAD) [45]. Wytworzone grupy -SH w reduktazie tioredoksynowej redukują grupę -SS- w tioredoksynie ($E_0' = -269$ mV). Stała równowagi redukcji tioredoksyny przy pH 7,0 wynosi 48. Reakcja ta jest odwracalna, zredukowana tioredoksyna może za pośrednictwem reduktazy tioredoksynowej zredukować $NADP^+$. Poza tioredoksyną reduktaza tioredoksynowa redukuje szereg innych związków. Szczególnie ważną funkcją tego enzymu jest bezpośrednia redukcja toksycznych nadtlenuków kwasów tłuszczowych oraz anionorodnika ponadtlenkowego [46, 47]. Ponadto substratami są alloksan, witamina K, DTNB i selenin [48, 49]. Reduktaza tioredoksynowa ma wysokie powinowactwo do NADPH (K_m około 1 μM), podczas gdy $NADP^+$ jest jej kompetycyjnym inhibitorem. Enzym ten jest inaktywowany przez czynniki blokujące grupy ditiolowe (jak np. arsenin), jony Zn^{2+} , pochodne chinonów i kwas cis-rotinowy. Zahamowanie reduktazy tioredoksynowej obniża szybkość syntezy DNA i podziału komórek [38].

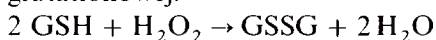
W mitochondriach tioredoksyna może być zredukowana również przez dihydrolipoamid, składnik kompleksów mitochondrialnych dehydrogenaz α -ketokwasów [50]. W wątrobie szczura szybkość redukcji disulfidów insuliny przez układ tioredoksynowy jest dwukrotnie niższa w mitochondriach niż we frakcji cytosolowej [51]. Aktywność redukcyjna układu tioredoksynowego w mitochondriach zależy od endogennej produkcji NADPH, procesu zdeterminowanego przez stopień energizacji mitochondriów [52]. Podczas stresu oksydacyjnego układ tioredoksynowy chroni mitochondrialne grupy -SH przed utlenieniem i w ten sposób przeciwdziała uszkodzeniu wewnętrznej błony mitochondrialnej [53].

V. Izomeraza białkowych disulfidów

Czynnikiem regulującym stopień oksydoredukcji tioli białkowych w cysternach siateczki endoplazmatycznej jest izomeraza białkowych disulfidów (*protein disulfide isomerase*, PDI) [54]. Enzym ten stanowi 0,5% wszystkich białek wątroby. Jest on zlokalizowany głównie w siateczce endoplazmatycznej, gdzie stanowi 10% białek a jego stężenie dochodzi do 2 mM, podczas gdy w cytoplazmie jest on zaledwie 14 μ M. PDI występuje w postaci homodimerów. Każda cząsteczka o masie 57 kDa zawiera 6 reszt cysteinowych, wśród których są aż 3 reaktywne grupy ditiolowe a dwie z nich występują w „tioredoksynowej” sekwencji aminokwasów (-Trp-Cys-Gly-His-Cys-Lys-). A zatem PDI jest członkiem rodziny tioredoksynowej [53, 54]. Najistotniejszą własnością PDI jest niezwykle wysoki potencjał oksydoredukcyjny, -110 mV, co odpowiada K_{ox} rzędu 10^{-5} M [56]. Enzym ten jest najsilniejszym utleniaczem grup -SH wśród znanych białek. Grupy -SS- w cząsteczce PDI mogą być zredukowane przez tioredoksynę, reduktazę tioredoksynową i GSH [54, 55]. W siateczce endoplazmatycznej jest 10 razy więcej PDI niż tioredoksyny. PDI spełnia tam bardzo ważną funkcję, bowiem umożliwia fałdowanie powstających białek przez wytwarzanie mostków -SS- oraz katalizuje izomeryzację grup -SH i -SS- w tych białkach (Ryc. 6) [57, 58]. Ponadto PDI, podobnie jak glutaredoksyna, wykazuje aktywność reduktazy dehydroaskorbinianu [36].

VI. Cytoplazmatyczne reakcje utleniania grup -SH

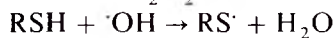
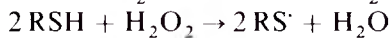
Poza siateczką endoplazmatyczną wewnątrz komórki jest środowiskiem redukującym i wiązania -SS- muszą tam powstawać na drodze reakcji enzymatycznych. Najważniejszą wśród nich jest reakcja peroksydazy glutationowej:



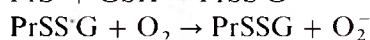
Znacznie mniejszą rolę odgrywają transsulfuraza (produkująca GSSG przy udziale merkaptopirogronianu) oraz monoooksygenaza (produkująca cystaminę z cysteaminy) [59].

VII. Bezpośrednie utlenianie grup tiolowych przez rodniki tlenowe

W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do utlenienia komórkowych grup -SH bezpośrednio przez reaktywne formy tlenu: rodnik ponadtlenkowy (O_2^-), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodnik wodorotlenkowy ($\cdot\text{OH}$) [60]. Produktem utlenienia grup -SH są wówczas rodniki tiylowe S^\cdot , które ulegają dimeryzacji do disulfidów. Reakcje te zachodzą według następujących wzorów:



Oprócz związków niskocząsteczkowych również białka w obecności metali przejściowych, żelaza i miedzi, mogą wytwarzać rodniki tiylowe [61, 62]. Ratunkiem przed nieodwracalnym uszkodzeniem białkowych grup -SH jest tiolacja rodników S^\cdot przez GSH:

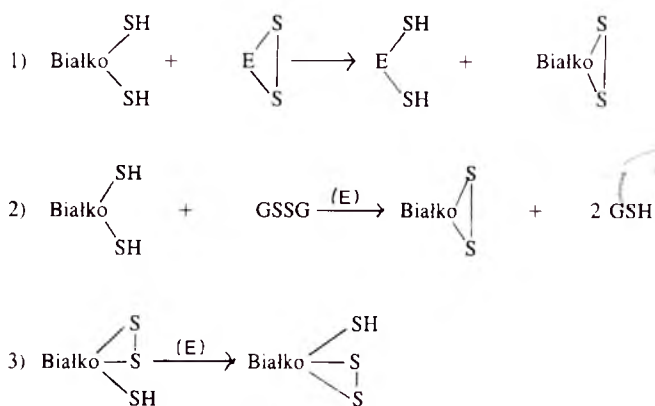


Dlatego uszkodzenie białek przez reaktywne formy tlenu jest szczególnie niebezpieczne przy obniżonym poziomie GSH [19].

VIII. Uwagi końcowe

Stres oksydacyjny w komórce występuje przy podwyższonym stężeniu tlenu cząsteczkowego lub jego form reaktywnych (nie w pełni zredukowanych). W tych warunkach następuje utlenienie komórkowych grup -SH, które prowadzi do zaburzeń działania wielu transporterów i enzymów oraz narusza homeostazę wapniową. Utlenienie grup -SH następuje wówczas we wszystkich grupach związków. W sercu reperfundowanym po ischemii w najwyższym stopniu zostały utlenione grupy -SH związków niskocząsteczkowych, do których należą cysteina, cysteamina, CoA, acetylo-CoA i ergotioneina [63]. Związki te utraciły ponad 60% grup -SH, podczas gdy glutation utracił ich ponad 50% a białkowe grupy -SH uległy utlenieniu w 10-15% [63].

Najgroźniejszym zagrożeniem dla życia komórek w warunkach utleniających jest utlenienie białkowych grup -SH w błonach. Może ono prowadzić do dezintegracji błon i uprzepuszczalnienia ich dla białek. Utlenienie to jest na ogół związane z działaniem rodnika nadtlenkowego (ROO^\cdot) powstającego przy peroksydacji fosfolipidów błonowych [64]. Niemniej jednak utlenienie krytycznych grup ditiolowych w błonie mitochondrialnej indukujące jej niespecyficzne uprzepuszczalnienie i deenergizację mitochondriów następuje drogą niezależną od peroksydacji lipidów [65]. Wytwarzanie białkowych disulfidów podczas stresu oksydacyjnego w hydrofobowym wnętrzu błony jest szczególnie szkodliwe, ponieważ mogą one być zredukowane jedynie przez tioredoksynę, która wy-



Ryc. 6. Reakcje katalizowane przez izomeryzy disulfidów białkowych.

stępuje głównie we frakcjach rozpuszczalnych [39]. Czynniki chroniącymi przed utlenieniem białkowych grup -SH w błonach są biologiczne antyoksydanty: witamina E i kwas dihydroliponowy [66, 67].

We frakcjach hydrofilnych białkowe grupy -SH ochraniane są głównie przez GSH. Są one bardziej narażone na utlenienie przy obniżonym poziomie GSH (w obecności inhibitorów jego syntezy) a wzrost stężenia GSH (w obecności jego egzogennych prekursorów) podwyższa ich zawartość [68]. Jest to związane z usuwaniem nadtlenków przez peroksydazę glutationową i tiolację rodników tylowych przez GSH. Ponadto glutation wytwarzając mieszane disulfidy z monotiolami białkowymi pozwala na ich regenerację przez glutaredoksynę po powrocie do normalnych warunków fizjologicznych [19].

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

- Ahmed AK, Schaffer WW, Wetlaufer DB (1975) *J Biol Chem* **250**: 8477-8482
- Gilbert HF (1990) *Adv Enzymol* **63**: 69-172
- Szajewski RP, Whitesides GM (1980) *J Am Chem Soc* **102**: 2011-2026
- Wells WW, Yang Y, Deits TL (1993) *Adv Enzymol* **66**: 149-201
- Holmgren A (1989) *J Biol Chem* **264**: 13963-13966
- Meister A (1984) *Fed Proc* **43**: 3031-3042
- Hawang C, Sinskey AJ, Lidish HF (1992) *Science* **257**: 1496-1502
- Gilbert HF (1995) *Meth Enzymol* **251**: 8-28
- Walters DW, Gilbert HF (1986) *J Biol Chem* **261**: 13135-13143
- Gitler C, Mogyoros M, Kalef E (1994) *Meth Enzymol* **233**: 403-416
- Cappel RE, Gilbert HF (1986) *J Biol Chem* **261**: 15378-15384
- Creighton TE (1983) W: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Chemical Aspects, Larson A, Orrenius S, Holmgren A, Mannervik B., Eds. Raven Press, New York, pp. 205-213
- Thornton JM (1981) *J Mol Biol* **151**: 261-287
- Mosckovitz R, Gershoni JM (1988) *J Biol Chem* **263**: 1017-1022
- Zhang R, Snyder GH (1988) *Biochemistry* **27**: 3785-3794
- Cappel RE, Gilbert HF (1989) *J Biol Chem* **264**: 9180-9187

- DiMonte D, Bellomo G, Thor H, Nicotera P, Orrenius S (1984) *Arch Biochem Biophys* **235**: 343-350
- Chai YC, Hendrich J (1994) *Arch Biochem Biophys* **310**: 264-272
- Thomas J, Poland B, Hanzatko R (1995) *Arch Biochem Biophys* **319**: 1-9
- Gilbert HF (1984) *Meth Enzymol* **107**: 330-351
- Persson B, Rydstrom J (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **142**: 573-578
- Bartosz G (1993) *Post Biochem* **39**: 32-38
- Morini P, Casalino E, Sblano C, Landriscina C (1991) *Int J Biochem* **23**: 1025-1030
- Ishikawa T, Sies H (1984) *J Biol Chem* **259**: 3838-3843
- Lash LH, Jones DP (1986) *Arch Biochem Biophys* **247**: 120-130
- Mannervik B (1980) W: Tioltransferases, in Enzymatic Basis of Detoxication vol. 2, Jakoby WB, Ed. Academic Press, New York, pp. 229-244
- Martinez-Galisteo E, Padilla CA, Holmgren A, Barcena JA (1995) *Comp Biochem Physiol* **111B**: 17-25
- Hatakayama M, Tanimoto Y, Mizoguchi T (1984) *J Biochem* **95**: 1811-1818
- Siedler F, Rudolph-Böhner S, Doi M, Musiol HJ, Morder L (1993) *Biochemistry* **32**: 7488-7495
- Gravina SA, Micyal JJ (1993) *Biochemistry* **32**: 3368-3376
- Hatakeyama M, Tanimoto Y, Mizoguchi T (1984) *J Biochem* **95**: 1811-1818
- Axelsson K, Mannervik B (1983) *FEBS Lett* **152**: 114-118
- Mannervik B, Axelsson K, Sundewall AC, Holmgren A (1983) *Biochem J* **213**: 519-523
- Flamigni F, Maririoli S, Caldarella CM, Guarnier C (1989) *Biochem J* **259**: 111-115
- Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR, Minakami S (1994) *J Biochem* **116**: 42-46
- Wells WW, Xu DP, Yang Y, Rocque PA (1990) *J Biol Chem* **265**: 15361-15364
- Goswami A, Rosenberg IN (1985) *Endocrinology* **212**: 1937-1945
- Holmgren A (1985) *Ann Rev Biochem* **54**: 237-271
- Holmgren A, Luthman M (1978) *Biochemistry* **17**: 4074-4078
- Jeng MF, Holmgren A, Dyson HJ (1995) *Biochemistry* **34**: 10101-10105
- Buchanan BB, Schürmann P, Decottignies P, Lozano RM (1994) *Arch Biochem Biophys* **314**: 257-260
- Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagata-Kuno K, Minakami S (1992) *Eur J Biochem* **209**: 917-922
- Demarquoy J, Fairand A, Vailant R, Gautier C (1990) *Experientia* **47**: 497-500
- Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A (1994) *J Biol Chem* **269**: 29382-29384
- Martinez-Galisteo E, Garcia-Alfonso C, Padilla CA, Barcena A, Lopez-Barea J (1992) *Mol Cell Biochem* **109**: 61-69
- Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A (1995) *J Biol Chem* **270**: 11761-11764
- Schallreuter KU, Wood JM (1986) *Biochem Biophys Res Commun* **136**: 630-637
- Arner ESJ, Björnstedt M, Holmgren A (1995) *J Biol Chem* **270**: 3479-3482
- Kumar S, Björnstedt M, Holmgren A (1992) *Eur J Biochem* **207**: 435-439
- Bunik V, Follmann RB (1993) *FEBS Lett* **336**: 197-200
- Lenartowicz E, Wudarczyk J (1995) *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 831-837
- Lenartowicz E (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **184**: 1088-1093
- Wudarczyk J, Dębska G, Lenartowicz E (1996) *Arch Biochem Biophys* **327**: 215-221
- Lundström J, Holmgren A (1990) *Biochem J* **256**: 9114-9120
- Lundström J, Holmgren A (1993) *Biochemistry* **32**: 6649-6655
- Hawkins HC, Freedman RB (1991) *Biochem J* **275**: 335-339
- Freedman RB, Hirst TR, Tuite MF (1994) *Trends*

58. Lundström J, Krause G, Holmgren A (1992) *J Biol Chem* 267: 9047-9052
59. Poulsen LL, Hyslop RM, Ziegler DM (1974) *Biochem Pharm* 23: 3431-3436
60. Bartosz G (1995) W: Druga Twarz Tłenu, PWN, pp. 61-63
61. Schöneich C (1995) *Meth Enzymol* 251: 45-55
62. Hunt JV, Yiang ZY, Wolff SP (1992) *Free Radical Biol Med* 13: 319-323
63. Lesnefsky EJ, Dauber IM, Horowitz LD (1991) *Circ Res* 68: 605-613
64. Pompella A, Romani A, Benedetti A, Comporti M (1991) *Biochem Pharmacol* 41: 1255-1259
65. Broekemeier KM, Carpenter-Deyo L, Reed DJ, Pfeiffer DR (1992) *FEBS Lett* 304: 192-194
66. Pascoe GA, Olafsdottir K, Reed D (1987) *Arch Biochem Biophys* 256: 150-158
67. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L (1992) *Biochem Pharmacol* 44: 1637-1649
68. Christie NA, Slutsky AS, Freeman BA, Tanswell AK (1994) *Arch Biochem Biophys* 313: 131-138

Pani Profesor Zofii Zielńskiej z okazji 80-tych urodzin z wyrazami uznania za wieloletnie prowadzenie „Postępów Biochemii”

Transport wody przez błony biologiczne

Transport of water through biological membranes

KATARZYNA A. NAŁĘCZ*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Określenie przepuszczalności błon biologicznych dla wody
- III. Przepuszczalność dyfuzyjna wody w naturalnych błonach biologicznych
- IV. Kanaly wodne

Wykaz stosowanych skrótów: AQP1-AQP5 — geny kodujące akwaporyny; AQP-CD — akwaporyna 2 (ang. *aquaporin-collecting duct*); BiB — białko z mózgu *Drosophila* (regulowane w czasie ontogenezy); CFTR — regulator przewodnictwa w mukowiscydozie (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*); CHIP — kanał wodny, akwaporyna (ang. *channel forming integral protein*); CIC — kanał wodny z układu trawienego *Cicadella viridis*; GLIP — białko transportujące glicerol (ang. *glycerol intrinsic protein*); MIP — białko integralne z soczewki oka (ang. *major intrinsic protein*); MIWC — kanał wodny niewrażliwy na odczynniki reagujące z grupami SH (ang. *mercurials insensitive water channel*); NOD26 — białko z brodawek symbiotycznych korzenia soi (ang. *nodulin26*); nS — nanosimans; P_d — współczynnik przepuszczalności dyfuzyjnej; P_f — współczynnik przepuszczalności osmotycznej; γ TIP — roślinny kanał wodny; VAMP — synaprobrewina b (ang. *vesicle associated membrane protein 2*); WCH-CD — akwaporyna 2 (ang. *water channel collecting duct*).

Contents:

- I. Introduction
- II. Estimation of water permeability through biological membranes
- III. Diffusional permeability of water in natural biological membranes
- IV. Water channels

I. Wstęp

Głównym składnikiem komórek zwierzęcych jest woda. Błony biologiczne, zarówno oddzielające komórkę od świata zewnętrznego, jak i membrany wewnątrzkomórkowe uważa się za błony selektywnie przepuszczalne. Cechę tę, według wielu podręczników, można scharakteryzować jako zdolność do przepuszczania wody, podczas gdy dwuwarstwa lipidowa stanowi przegrodę dla licznych substancji w wodzie rozpuszczonych, a transportowanych dzięki specyficznym układom białkowym, którymi mogą być kanały, nośniki lub pompy [1].

Uważa się, że przechodzenie wody przez błony biologiczne może zachodzić drogą dyfuzji przez dwuwarstwę lipidową lub przez specyficzne kanały, chociaż dwuwarstwa lipidowa charakteryzuje się względnie niską przepuszczalnością dla wody.

Pewne tkanki, jak np. nabłonek kanalików nerkowych [2], czy erytrocyty [3, 4] wykazują znacznie wyższą zdolność do przepuszczania wody, niż by to wynikało z przechodzenia wody przez dwuwarstwę

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

lipidową, co sugerowało występowanie w błonach tych komórek kanałów wyspecjalizowanych w transporcie wody.

II. Określenie przepuszczalności błon biologicznych dla wody

Analiza procesu transportu opiera się na zasadach klasycznej termodynamiki. Wynika z tego, że w układzie charakteryzującym się tylko jednym przepływem (np. substancji, ładunku itp.) przepływ jest liniowo związany z siłą, jeżeli cały układ nie jest zbyt odległy od równowagi. Dla takiego ogólnego układu zachodzi zależność:

$$J = PX \quad (\text{Równ. 1})$$

gdzie J oznacza wielkość przepływu, X siły termodynamiczne odpowiedzialne za przepływ, a P jest współczynnikiem proporcjonalności. W przypadku zastosowania lub zaistnienia gradientu osmotycznego można wyliczyć współczynnik przepuszczalności wody z pomiaru jej przepływu. Zakładając równowagę temperatury i ciśnienia w wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych środowiskach przepływ wody J_w można opisać następującym równaniem:

$$J_w = -P\Delta\pi_{np} - \sigma P\Delta\gamma\pi_p \quad (\text{Równ. 2})$$

gdzie podpisy np i p dotyczą substancji nieprzepuszczalnych i przepuszczalnych przez błonę, P jest współczynnikiem przepuszczalności wody, a $\Delta\pi$ przedstawia różnicę ciśnień osmotycznych [5].

Ilościowe określenie przepuszczalności dla wody błon biologicznych i błon sztucznych (np. liposomów z wbudowanymi do dwuwarstwy lipidowej kanałami) wymaga pomiaru następujących parametrów:

P_f — współczynnika przepuszczalności osmotycznej,

P_d — współczynnika przepuszczalności dyfuzyjnej.

P_f można wyznaczyć z pomiarów kinetyki zmiany objętości komórki lub pęcherzyków w odpowiedzi na wytworzony gradient osmotyczny. Zmiany objętości można wyznaczyć mierząc w czasie intensywność światła rozproszonego przepuszczalnego przez komórki [6, 7] lub pomiar fluorescencji zamkniętego w komórce fluoroforu, który podlega samowygaszaniu w sposób zależny od stężenia [8]. P_f (cm/s) można wyznaczyć ze zmian w czasie intensywności rozproszonego światła $[I(t)]$ przez dopasowanie trzech parametrów (P_f , A , B) do następującego równania [9]:

$$\frac{dI(t)}{dt} = \frac{P_f(S/V)v_w}{A} \left(C_o - \frac{C_i}{AI(t)+B} \right) \quad (\text{Równ. 3})$$

gdzie S/V jest stosunkiem powierzchni do objętości (wielkość ta może przyjąć wartość $2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ dla liposomów o średnicy $0.3 \mu\text{m}$ i $2,5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}$ dla pęcherzyków z błon erytrocytów [9]), v_w jest objętością molową wody ($18 \text{ cm}^3/\text{mol}$), C_o i C_i są odpowiednio wartościami zewnętrzną i wewnętrzną osmomolarności, A i B są stałymi parametrami związanymi z wydajnością używanego aparatu.

Ze względu na szybką wymianę wody drogą dyfuzji ($< 10 \text{ ms}$) o wiele trudniej jest wyznaczyć współczynnik przepuszczalności dyfuzyjnej P_d . Aby wyznaczyć ten parametr stosuje się metody jądrowego rezonansu magnetycznego [10] lub pomiar zmian w czasie fluorescencji związku, którego fluorescencja jest wrażliwa na skład $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$. Substancją taką jest na przykład 6-karboksyfluoresceina, której kwantowa wydajność fluorescencji rośnie ponad dwukrotnie jeśli skład rozpuszczalnika ze 100% H_2O zostaje zmieniony na 100% D_2O [11], ponadto fluorescencja rośnie niemal liniowo wraz ze wzrastającą zawartością D_2O . Inkubując komórki w środowisku o różnym stosunku $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ można wyznaczyć P_d (cm/s) z wykładniczej stałej czasowej (τ_{ex} , czas wymiany) dopasowanej do zmian w czasie fluorescencji, wykorzystując następującą zależność:

$$P_d = l/[\tau_{ex}(S/V)] \quad (\text{Równ. 4})$$

Warto tu podkreślić, iż przekształcenie równań (3) i (4) pozwala na wyznaczenie stosunku P_f/P_d bez znajomości geometrii komórek po wyeliminowaniu stosunku S/V . Współczynnik przepuszczalności dyfuzyjnej wielu błon jest bardzo niski ($< 0.01 \text{ cm/s}$). Proces dyfuzji charakteryzuje się ponadto wysoką energią aktywacji ($E_a > 2,4 \text{ kJ/mol}$).

Tymi metodami, stosując 25 i 100 milimolarne gradienty stężeń sacharozy, wyznaczono dla preparatów błon erytrocytów współczynniki przepuszczalności osmotycznej P_f i dyfuzyjnej P_d , otrzymano wartość $P_f/P_d = 4,1 \pm 0,9$ [9]. Dodanie $0,5 \text{ mM HgCl}_2$ spowodowało zmniejszenie wartości P_f w 90% i w 45% obniżenie P_d . Analogiczne pomiary wykonane dla liposomów utworzonych w 90% z fosfatydylocholin i 10% dodatkiem cholesterolu charakteryzują się o wiele niższą przepuszczalnością osmotyczną, bowiem stosunek P_f/P_d wynosi $0,8 \pm 0,1$, jest więc bliski jedności. W dodatku nie zaobserwowano żadnego efektu HgCl_2 ani na P_f , ani na P_d , a więc na każdy z tych współczynników z osobna. Ta ostatnia obserwacja wskazuje na fakt, iż część przepuszczalności dyfuzyjnej w błonach natywnych zależy od występujących białek kanałowych zawierających grupy SH, a wysoka przepuszczalność wody (wysoka wartość P_f i niska, $< 5 \text{ kcal/mol}$ energia aktywacji) charakterystyczna dla błon erytrocytów związana jest z obecnością układu specyficznego transportującego wodę.

III. Przepuszczalność dyfuzyjna wody w natywnych błonach biologicznych

W przypadku liposomów stosunek P_f/P_d jest bliski jedności. Wbudowanie do warstwy lipidowej jonoforu gramicydyny powoduje wzrost wartości tego stosunku do $2,3 \pm 0,8$. Gramicydyna jest klasycznym przykładem kanału mającego zdolność transportu metali alkalicznych, talu czy protonu [12, 13]. Forma aktywna jest dimerem złożonym z dwu 15-aminokwasowych

peptydów [12-16]. Kanał ten dzięki wiązaniom wodorowym przyjmuje strukturę α -heliks, gdzie grupy polarne wypełniają światło kanału, a hydrofobowe stanowią część zewnętrzną oddziałując z lipidami. Transportowany jon ulega częściowej dehydratacji i jest kompleksowany przez grupy polarne światła kanału. To właśnie energia dehydratacji odpowiada energii aktywacji procesu transportu, wartość ta jest związana z selektywnością w stosunku do transportowanych jonów [17]. Zastąpienie jednej lub dwu cząsteczek wody w wyniku dehydratacji transportowanego jonu jest skompensowane przez oddziaływanie elektrostatyczne lub poprzez siły van der Waalsa między jonem a polarnymi grupami kanału. Kanał utworzony przez gramicydynę najlepiej opisuje model zakładający istnienie 2 miejsc wiążących [18], choć sam proces transportu jest wieloetapowy, najlepiej opisany ruchami Browna [19]. Taki kanał może „uwięzić” cząsteczki wody. Ponieważ jego wewnętrzna średnica wynosi 0,4 nm cząsteczki wody mogą poprzedzać transportowany jon, a także przechodzić za nim. W ten sposób nie jest konieczne uwolnienie jonu z całej otoczki hydratacyjnej (niższa energia aktywacji). Proces taki powoduje jednocześnie przeniesienie cząsteczek wody wraz z transportowanym jonem [20].

W przypadku gramicydyny cylindryczny kanał występuje w obrębie światła struktury helikalnej, w kanałach białkowych światło kanału występuje jednak zwykle pomiędzy strukturami α -heliks, czasem β -zgięciami [21], a czasem wręcz pomiędzy podjednostkami oligomerycznego białka [22, 23]. Tak więc utworzone pory są większe, a więc woda może przechodzić przez błonę przez naturalnie występujące kanały białkowe, zwłaszcza, że stała dielektryczna ($\epsilon \approx 80$) w roztworze i w wypełnionym wodą kanale jonowym jest wielokrotnie wyższa niż stała dielektryczna ($\epsilon \approx 2$) fazy lipidowej błony [24]. Istnieje wręcz pogląd, że „kanał jest miniaturową masą wody otoczoną przez ścianki peptydowe” [25].

Zakłócenia w transporcie wody przez błony biologiczne mogą być spowodowane przez wady genetyczne związane z ekspresją białek kanałowych. Jednym z najdrastyczniejszych przykładów jest mukowiscydoza, schorzenie dziedziczne, w którym mutacje w genie kodującym regulowany przez cAMP kanał chlorkowy — CFTR (regulator przewodnictwa w mukowiscydozie, ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) powodują zakłócenia w transporcie Cl^- [26, 27]. Ekspresja CFTR w oocytach *Xenopus* pozwoliła na pomiar zwiększonego przewodnictwa wody (4×10^4 cm/s), zahamowanego przez związki blokujące kanał chlorkowy [28]. Ta obserwacja wskazuje, że CFTR może transportować aniony, wodę, a także związki o małej masie cząsteczkowej (np. mocznik, ale nie sacharozę). Zakłócenia w transporcie wody w przypadku mutacji CFTR prowadzą do nagromadzenia śluzu w okolicach nabłonka dróg oddechowych, co z kolei ułatwia pojawienie się kolonii bakteryjnych i

w konsekwencji, w wyniku poważnych infekcji do zagrożenia życia [26-28].

IV. Kanały wodne

Mimo, że wszystkie błony biologiczne charakteryzują się pewną przepuszczalnością dla wody, to w przypadku czerwonych krwinek, kanalików nerkowych i pewnych tkanek nabłonkowych zaobserwowano o wiele wyższą zdolność transportu wody, co wyraża się wysokim stosunkiem P_i/P_d ($P_i > P_d$). Wykazano, że hydrofilowe alkohole o krótkim, nierozgałęzionym łańcuchu węglowym mogą być transportowane przez błonę erytrocytów w sposób zależny od stężenia, np. K_m dla glikolu etylowego wynosi 220 ± 50 mM. Związek ten może zahamować transport wody przez błonę erytrocytów ($K_i = 570 \pm 140$ mM) [5]. Badając współzawodnictwo stwierdzono, iż związki z grupy mocznika i glikolu etylowego oraz woda przenikają błonę przez te same wypełnione wodą pory. Transport wody był ponadto hamowany przez odczynniki reagujące z grupami SH, np. β -merkaptetanol ($K_i = 160 \pm 40$ mM [26]). Wszystkie te obserwacje prowadzące do wyznaczenia parametrów kinetycznych i ukazujące możliwość zahamowania procesu transportu wody wskazywały na udział białka w tym procesie.

W 1988 r. Denker i wsp. [29] oczyścili kanał wodny CHIP (od angielskiej nazwy *channel forming integral protein*). Okazało się, iż to tetrameryczne białko jest podobne do białka z soczewki oka, tzw. MIP [30]. W 1991 r. ze szpiku kostnego wyizolowano cDNA [31], które pozwoliło na funkcjonalną ekspresję kanału wodnego w oocytach *Xenopus* [32]. Funkcję tego białka potwierdzono dodatkowo wbudowując oczyszczone białko CHIP do liposomów [33] uzyskując P_i 50-krotnie wyższy niż dla liposomów. P_i proteoliposomów zawierających CHIP28 z błon erytrocytów ulega w sposób odwracalny obniżeniu po zastosowaniu odczynników reagujących z grupami SH [33]. Także w innych tkankach zwierzęcych i w roślinach [34, 35] wykazano obecność podobnych białek, które okazały się być produktami różnych genów. Białka te, charakteryzujące się zdolnością transportu wody zostały nazwane akwaporynami (ang. *Aquaporins*), a gen kodujący CHIP został nazwany AQP1 [36]. Gen ten ulega ekspresji w erytrocytach ssaków i nerkowych cewkach krętych bliższych [29, 37, 38], a także w choroid plexus mózgu szczura [39], podczas gdy geny AQP2 i AQP3 ulegają ekspresji w cewkach zbiorczych [34, 40-42], AQP4 w mózgu szczura [43, 44], AQP5 w śliniankach [45] i nabłonku płuc. Ekspresję CHIP katalizującego transport wody stwierdzono także w cholangiocytach wyścielających przewody żółciowe [45]. Obecność białek homologicznych w 77-78% ze szczurzym lub ludzkim CHIP stwierdzono w pęcherzyku żółciowym, skórze i płucach płazów [46].

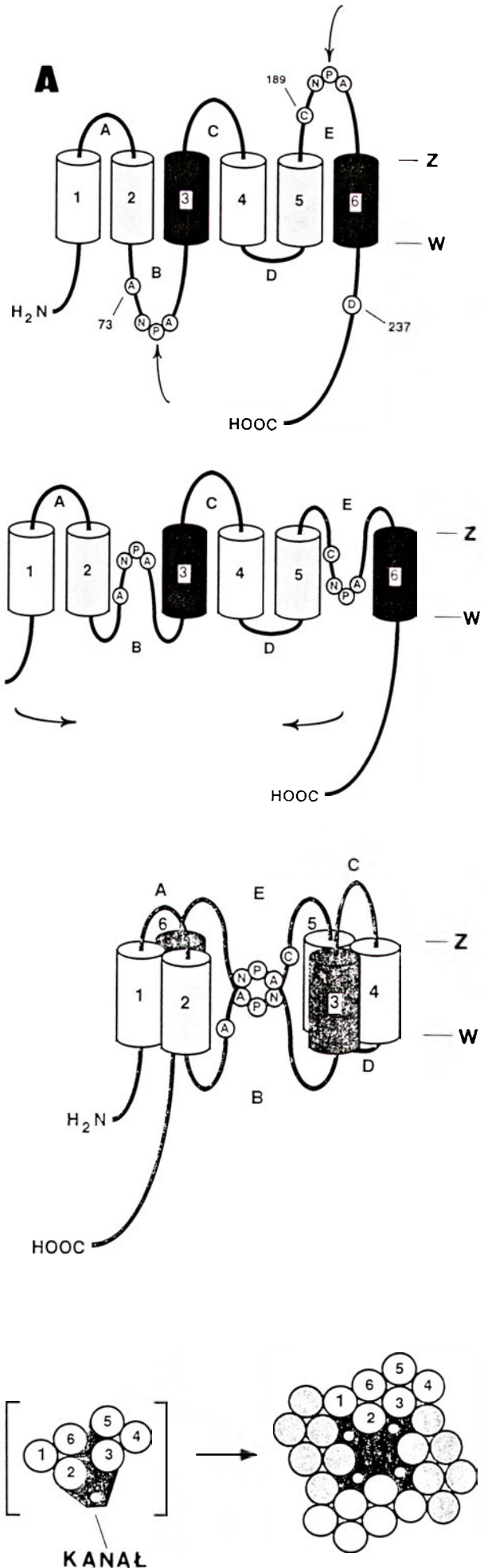
Akwaporyny należą do rodziny pojawiających się

wcześnie w ewolucji białek, zwanych białkami MIP. Nazwa ta pochodzi od białka MIP26 głównego białka integralnego (ang. *major intrinsic protein*) z soczewek oczu wołu [47]. Analiza sekwencji aminokwasów białka MIP pozwala na stworzenie modelu białka, którego C i N końce znajdowałyby się po stronie cytoplazmatycznej i białko to tworzyłoby 6 domen przenikających dwuwarstwę lipidową. Białka z rodziny, składającej się już z ponad 20 członków, charakteryzują się unikalną strukturą, N i C koniec łańcucha polipeptydowego są bowiem powtórzeniami sekwencji, ale obie połówki są jakby lustrzanym odbiciem, ich sekwencje są odwrócone o 180° w stosunku do siebie.

Do rodziny białek MIP należą, poza CHIP, m.in. takie białka jak NOD-26 (ang. *Nodulin-26*) białko z błony brodawek symbiotycznych korzenia soi, białko ułatwiające transport glicerolu w komórkach *Escherichia coli* i innych bakterii, supresor defektu wzrostu u *Sacharomyces cerevisiae*, regulowane w czasie ontogenezy białko z mózgu *Drosophila* (BiB), integralne białka tonoplastu w roślinach [48] i γ TIP — roślinny kanał wodny w *Arabidopsis thaliana* [35], czy CIC — kanał wodny z układu trawiennego *Cicadella viridis* [49]. W wielu przypadkach funkcja białek z rodziny MIP nie jest znana, ale w przypadku wielu z nich wykazano, iż mogą być kanałami wyspecjalizowanymi w transporcie wody.

Samo białko MIP po rekonstytucji do liposomów wykazuje własności zależnego od napięcia kanału, zdolnego do transportu jonów i małych cząsteczek. Kanał ten może być zamknięty przez Ca^{2+} i kalmodulinę [50-52]. Po rekonstytucji w układzie do badania aktywności w czarnych błonach lipidowych [53] MIP tworzy pojedyncze kanały o różnym przewodnictwie (1,6 nS, 3,7 nS i dwa stany mniej stabilne 1,2 nS i 3,1 nS, w zakresie napięć 20-100 mV) wykazując słabą selektywność w stosunku do anionów [54]. Ekspresja w oocytach *Xenopus* powoduje 4-5-krotny wzrost przepuszczalności osmotycznej wody (P_w), podczas gdy P_f w oocytach, w których dokonano ekspresji CHIP wzrasta ponad 30-krotnie [55], co sugeruje, że MIP może spełniać funkcję akwaporyny w soczewkach, ale nie można także wykluczyć innej funkcji tego białka.

CHIP, podobnie jak MIP, jest funkcjonalnym tetramerem, który, jak wykazano analizując dwuwymiarowe kryształy tego białka, zajmuje powierzchnię $\approx 3320 \text{ \AA}^2$ [56]. CHIP28 występuje w formie niezmodyfikowanej lub z dużą cząsteczką glikanu przyłączoną do jednej z podjednostek, zawierającą głównie



Ryc. 1. Model akwaporyny CHIP przypominający klepsydę. A. Proponowany schemat białka CHIP przedstawiający 6 domen transbłonowych, dwie pętle B i E zawierające motyw NPA; strzałki wskazują możliwość „wnicowania” pętli B i E do dwuwarstwy lipidowej, w takiej sytuacji topologia białka przypominałaby klepsydę (z — strona błony znajdująca się na zewnątrz komórki, w — strona cytoplazmatyczna). B. Oligomeryzacja 4 podjednostek białka dająca w efekcie 4 pory kanału wodnego, wg [59].

oligosacharydy polilaktozoaminyłowe [57]. Wbudowany do sztucznych błon CHIP28 wykazuje wrażliwość na Hg^{2+} . W sekwencji aminokwasowej tego białka, wydedukowanej z sekwencji cDNA, wiadomo było, iż CHIP28 zawiera 4 cysteiny. Drogą zamiany poszczególnych reszt cystylinowych na seryny wykazano, iż istotna, jeśli chodzi o wrażliwość na merkuriale jest cysteina w pozycji 189 [58]. W doświadczeniach, w których dokonywano w oocytach ekspresji wrażliwych i niewrażliwych na merkuriale form CHIP, wykazano, iż każda z podjednostek zawiera funkcjonalny kanał [58]. Obie połówki białka CHIP zawierają motyw asparagina-prolina-alanina (NPA) w pozycji 76-78 (w pętli B, cytoplazmatycznej) i 192-194 (w pętli E, pozakomórkowej). Motywy NPA są odwrócone w stosunku do siebie o 180° , ponadto w pobliżu drugiego z nich znajduje się cysteina 189. Jung i w s p. [59] zaproponowali model kanału wodnego przypominający klepsydrę. Tak jak przedstawiono na rycinie 1, motywy NPA zagłębione w błonie i zbliżone do siebie stanowiłyby wąski, pojedynczy kanał. Taka struktura przypominałaby pętle H5 występujące w wielu kanałach jonowych i odpowiedzialne za selektywność i przewodzenie jonów [60]. Pętla B jest bardziej hydrofobowa niż E i mutacje w obrębie pętli B powodują mniejszy efekt na obniżenie P_f niż mutacje w pętli E [59]. Jung i w s p. [59] proponują, że średnica kanału w obrębie pętli E jest węższa.

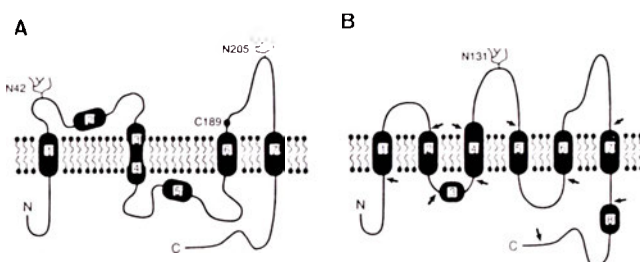
Jednym z istotnych procesów regulujących aktywność kanałów jest fosforylacja. Zjawisko to obejmuje także białka z rodziny MIP. Kinaza białkowa zależna od cAMP fosforyluje MIP prawdopodobnie na Ser-243 [61, 62], podczas, gdy nodulina-26 jest fosforylowana przez kinazę białkową zależną od Ca^{2+} , niezależną od kalmoduliny [63, 64]. Transportujące wodę białko z błony wodniczki jest fosforylowane na serynie w pozycji 7 (po stronie cytoplazmatycznej) i proces ten reguluje funkcję transportu wody [65]. Akwaporyny z nerek to AQP1-CHIP, AQP2 (zwana też AQP-CD, od *aquaporin collecting duct*, a także WCH-CD, od *water channel-collecting duct*) i AQP3. Jedynie AQP-CD zawiera fragment sekwencji Arg-Arg-Gln-Ser uznany za potencjalne miejsce fosforylacji przez kinazę A. Kuwahara i w s p. [66] wykazali, że cAMP stymuluje przepuszczalność wody i fosforylację akwaporyny AQP-CD. Należy tu podkreślić, iż białko to stanowi kanał wodny regulowany przez wazopresynę, która powoduje wzrost cAMP w cewkach zbiorczych nerek. Co ciekawsze, wykazano ponadto, że wazopresyna indukuje translokację wewnątrzkomórkowych pęcherzyków zawierających tę akwaporynę do części apikalnej błony komórkowej [67], a potraktowanie kolchicyną powodującą zakłócenie struktury cytoszkieletu powoduje pozostanie AQP-CD w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych [68]. Fuzja pęcherzyków zawierających tę akwaporynę z błoną cytoplazmatyczną wymaga, jak wykazano [69, 70], udziału synaptobreviny b (zwanej też VAMP-2, od *vesicle*

associated membrane protein 2), a więc białka pośredniczącego w zjawisku egzocytozy w mózgu. Przedstawione powyżej informacje, jak również fakt wykrycia kanałów wodnych w opłaszczonych klatryną [71], powstających w wyniku endocytozy pęcherzykach z nerki (ale nie z mózgu) potwierdzają hipotezę o wahadlowym ruchu kanałów wodnych ulegających naprzemiennym procesom egzo- i endocytozy, procesom regulowanym ponadto przez poziom wazopresyny.

Istnieje także kanał wodny niewrażliwy na odczynniki reagujące z grupami SH, MIWC (ang. *mercurial-insensitive channel*) [43]. Białko to wykazuje 41% indentyczności z sekwencją CHIP 28 i transportuje wodę w kanałkach zbiorczych, tchawicy, ciałkach rzęskowych, kosmkach jelitowych, komórkach wyściółki mózgu. Białko to także posiada 6 domen przenikających błonę, podlega N-glikozylacji. Ekspresja CHIP i MIWC wykluczają się wzajemnie, ponadto biogeneza obu białek zachodzi według innego mechanizmu [72]. Badając wrażliwość obu białek na proteazy zaproponowano nieco inną ich topologię, w przypadku CHIP tylko 4 i 6 hydrofobowych domen miałyby przechodzić przez dwuwarstwę lipidową, podczas gdy w przypadku MIWC 6 z 8 takich domen (Ryc. 2).

Posługując się metodami biologii molekularnej stwierdzono obecność RNA kodującego białko należące do rodziny MIP, które w przeciwieństwie do kanałów wodnych transportuje inny niż woda rozpuszczalnik, mianowicie glicerol (GLIP — *Glycerol Intrinsic Protein*) [42]. Sekwencja aminokwasowa tego białka wykazuje 36% identyczności z sekwencją bakteryjnego transportera glicerolu. U ssaków GLIP ulega ekspresji w nerce, mózgu, płucach, oczach, jelicie prostym, żołądku i mięśniach szkieletowych (ale nie w sercu, wątrobie czy śledzionie). Fizjologiczna rola tego białka nie jest jednak na razie znana.

Coraz bardziej zaawansowane badania nad białkami z rodziny MIP, a w szczególności kanałami wodnymi mogą być może przynieść wyjaśnienie pewnych stanów patologicznych jak hemoliza, oedema mózgu czy moczówka prosta. W przypadku tego ostatniego schorzenia opisano heterozygotycznego pacjenta, u którego 2 allele genu kodującego WCH-CD (czyli AQP2) były zmodyfikowane w różnych miejscach



Ryc. 2. Topologia kanałów wodnych.

A. Proponowana inna topologia białka CHIP28 z zaznaczoną N-glikozylacją na reszcie aminokwasowej w pozycji 42 oraz wrażliwą na merkuriale cysteiną 189. B. MIWC — z zaznaczonym miejscem glikozylacji N-131, zmodyfikowane wg [72].

[73], co w konsekwencji doprowadziło do nieprawidłowego transportu wody i uzewnętrznienia się choroby.

Niezależnie od tempa gromadzenia dalszej wiedzy na temat kanałów wodnych i jej zastosowania w diagnostyce należy w pierwszym rzędzie zmienić nasze spojrzenie na mechanizm przechodzenia wody przez błony biologiczne. W chwili obecnej należy już chyba zmodyfikować podręcznikowe stwierdzenia, iż za przechodzenie wody przez błony biologiczne odpowiedzialny jest proces dyfuzji przez dwuwarstwę lipidową, a uwypuklić proces przechodzenia wody zarówno przez kanały białkowe transportujące różne jony, jak i możliwość, w pewnych komórkach, przechodzenia wody przez specyficzne kanały wodne.

Artykuł otrzymano 15 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Nałęcz K A (1995) W: Konarska L (red) Molekularne Mechanizmy Przekazywania Sygnałów w Komórce, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa str 32-44
2. Chevalier J, Bourguet J, Hugon J S (1994) *Cell Tissue Res* **152**: 129-140
3. Solomon A K, Chasan B, Dix J A, Lukacovic M F, Toon M R, Verkman A S (1983) *Ann NY Acad Sci* **414**: 97-124
4. Macey R I (1984) *Am J Physiol* **246**: C195-C203
5. Toon M R, Solomon A K (1990) *Biochim Biophys Acta* **1022**: 57-71
6. Terwilliger T C, Solomon A K (1981) *J Gen Physiol* **77**: 549-570
7. Verkman A S, Dix J A, Seifter J L (1985) *Am J Physiol* **248**: F650-F655
8. Chen P Y, Pearce D, Verkman A S (1988) *Biochemistry* **27**: 5713-5718
9. Ye R, Verkman A S (1989) *Biochemistry* **28**: 824-829
10. Verkman A S, Wong K R (1987) *Biophys J* **51**: 717-723
11. Kuwahara M, Verkman A S (1988) *Biophys J* **54**: 587-593
12. Neher E (1975) *Biochim Biophys Acta* **401**: 540-544
13. Nałęcz K A (1989) *Post Biochem* **35**: 437-467
14. Pressman B C, Harris E J, Jagger W S, Johnson J H (1967) *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 1949-1956
15. Veatch W R, Blout E R (1974) *Biochemistry* **13**: 5257-5264
16. Urry D W, Goodall M C, Glickson J D, Mayers D F (1971) *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 1907-1911
17. Eisenman G, Horn R (1983) *J Membrane Biol* **76**: 197-225
18. Busath D D (1993) *Annu Rev Physiol* **55**: 473-501
19. Heinemann S H, Sigworth F J (1989) *Biochim Biophys Acta* **987**: 8-14
20. Läger P (1980) *J Membrane Biol* **57**: 163-178
21. Manella C A, Forte M, Colombini M (1992) *J Bioenerg Biomembr* **24**: 7-19
22. Eisenman G, Alvarez O (1991) *J Membrane Biol* **119**: 109-132
23. Klingenberg M (1981) *Nature (Lond)* **290**: 449-454
24. Levitt D G (1985) *Biophys J* **48**: 19-31
25. Gutman M, Tsfadia Y, Masad A, Nachliel E (1992) *Biochim Biophys Acta* **1109**: 141-148
26. Miller C (1993) *Nature (Lond)* **362**: 106
27. Riordan J R (1989) *Science* **245**: 1066-1073
28. Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag M C, Lingappa V, Verkman A S (1992) *Science* **258**: 1477-1479
29. Denker B M, Smith B L, Kuhajda F P, Agre P (1988) *J Biol Chem* **263**: 15634-15642
30. Smith B L, Agre P (1991) *J Biol Chem* **266**: 6407-6415
31. Preston G M, Agre P (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11110-11114
32. Preston G M, Carroll T P, Guggino W B, Agre P (1992) *Science* **256**: 385-387
33. Zeidel M L, Ambudkar S V, Smith B L, Agre P (1992) *Biochemistry* **31**: 7436-7440
34. Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S (1993) *Nature (Lond)* **361**: 549-552
35. Maurel C, Reizer J, Schroeder J I, Chrispeels M J (1993) *EMBO J* **12**: 2241-2247
36. Agre P, Sasaki S, Chrispeels M J (1993) *Am J Physiol* **265**: F461
37. Sabolic I, Valenti G, Verbavatz J M, van Hoek A N, Verkman A S, Ausiello D A, Brown D (1992) *Am J Physiol* **263**: C1225-C1233
38. Nielsen S, Smith B L, Christensen E I, Knepper M A, Agre P (1993) *J Cell Biol* **120**: 371-383
39. Nielsen S, Smith B L, Christensen E I, Agre P (1993) *J Cell Biol* **120**: 725-7279
40. Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Ushida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Marumo F (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6269-6273
41. Echevarria M, Windhager E E, Tate S S, Frindt G (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10997-11001
42. Ma T, Frigeri A, Hasegawa H, Verkman A S (1994) *J Biol Chem* **269**: 21845-21849
43. Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay M A, Verkman A S (1994) *J Biol Chem* **269**: 5497-5500
44. Jung J S, Bhat R V, Preston G P, Guggino W B, Baraban J M, Agre P (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 13052-13056
45. Raina S, Preston G M, Guggino W B, Agre P (1995) *J Biol Chem* **270**: 1908-1912
46. Abrami L, Capurro C, Ibarra C, Parisi M, Buhler J - M, Ripoche P (1995) *J Membrane Biol* **143**: 199-205
47. Gorin M B, Yancey S B, Cline J, Ravel J - P, Horowitz J (1984) *Cell* **39**: 49-59
48. Chrispeels M J, Agre P (1994) *Trends Biochem Sci* **19**: 421-425
49. Beuron F, Caherec F L, Guillam M - T, Cavalier A, Garret A, Tassan J - P, Delamarque C, Schultz P, Mallouh V, Rolland J - P, Hubert J - F, Gouranton J, Thomas D (1995) *J Biol Chem* **270**: 17414-17422
50. Nikaido H, Rosenberg E Y (1985) *J Membrane Biol* **85**: 87-92
51. Girsch S J, Peracchia C (1985) *J Membrane Biol* **83**: 217-225
52. Shen L, Shrager P, Donaldson P J, Peracchia C (1991) *J Membrane Biol* **124**: 21-32
53. Läger P (1972) *Science* **178**: 24-30
54. Ehring G R, Zampighi G, Horwitz J, Bok D, Hall J E (1990) *J Gen Physiol* **96**: 631-664
55. Mulders S M, Preston G M, Deen P M T, Guggino W B, van Os C H, Agre P (1995) *J Biol Chem* **270**: 9010-9016
56. Mitra A K, Yeager M, van Hoek A N, Wiener M C, Verkman A S (1994) *Biochemistry* **33**: 12735-12740
57. van Hoek A N, Wiener M C, Verbavatz J - M, Brown D, Lipniunas P H, Townsend R R, Verkman A S (1995) *Biochemistry* **34**: 2212-2219
58. Preston G M, Jung J S, Guggino W B, Agre P (1993) *J Biol Chem* **268**: 17-20
59. Jung J S, Preston G M, Smith B L, Guggino W B, Agre P (1994) *J Biol Chem* **269**: 14648-14654
60. Caterall W A (1993) *Trends Neurosci* **16**: 500-506
61. Ehring G R, Lagos N, Zampighi G A, Hall J E (1991) *J Membrane Biol* **126**: 75-88
62. Lampe P D, Johnson R G (1990) *Eur J Biochem* **194**: 541-547
63. Weaver C D, Roberts D M (1992) *Biochemistry* **31**: 8954-8959
64. Miao G - H, Hong Z, Verma D P S (1992) *J Cell Biol* **118**: 481-490
65. Maurel C, Kado R T, Guern J, Chrispeels M J (1995) *EMBO J* **14**: 3028-3035
66. Kuwahara M, Fushimi K, Terada Y, Bai L, Marumo F, Sasaki S (1995) *J Biol Chem* **270**: 10384-10387
67. Nielsen S, Chou C - L, Marples D, Christensen E I, Kishore B K, Knepper M A (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1013-1017

68. Sabolić I, Katsura T, Verbavatz J-M, Brown D (1995) *J Membrane Biol* **143**: 165-175
69. Jo I, Harris HW, Amendt-Raduege AM, Majewski R, Hammond TG (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1876-1880
70. Liebenhoff U, Rosenthal W (1995) *FEBS Lett* **365**: 209-213

71. Verkman AS, Weyer P, Brown D, Ausiello DA (1989) *J Biol Chem* **264**: 20608-20613
72. Shi L, Skach WR, Ma T, Verkman AS (1995) *Biochemistry* **34**: 8250-8256
73. Deen PM, Verdij MA, Knoers NV, Wieringa B, Monnens LA, van Os CH, van Oost BA (1994) *Science* **264**: 92-95

Szanownej Pani Profesor *Zofii Zielińskiej*
z Wyrazami Szacunku – autorzy

Osmolity i osmoregulacja w komórkach nerek

Osmolytes and osmoregulation in renal cells

MARIUSZ R. WIĘCKOWSKI¹,
KRZYSZTOF ZABŁOCKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Strategie adaptacyjne komórek do wysokiej osmotyczności
- III. Osmolity w nerce
 - III-1. Kultury komórkowe w badaniach osmoregulacji w nerkach
 - III-2. Mioinozytol
 - III-3. Betaina
 - III-4. Tauryna
 - III-5. Sorbitol
 - III-6. Glicerofosfocholina
- IV. Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia osmolitów w warunkach obniżonej osmotyczności
- V. Podsumowanie

Wykaz stosowanych skrótów: GPC — glicerofosfocholina (ang. *glycerophosphocholine*); MDCK — Madin-Darby canine kidney (epitelium nerki psa), (ang. *epithelium of dog kidney*); PAP-HT25 — komórki brodawki nerkowej królika (ang. *rabbit kidney papillary cells*); TMAO — N-tlenek trójmetyloaminy (ang. *trimethylamine-N-oxide*).

I. Wstęp

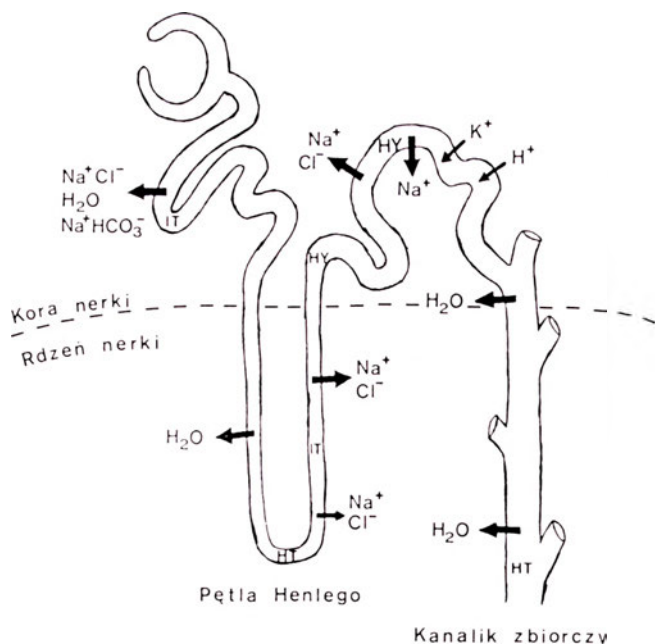
Jednym z podstawowych praw fizjologii ssaków jest zachowanie stałości składu płynów tkankowych, a zatem środowiska zewnętrznego komórek organizmu. Zgodnie z tą zasadą zewnątrzkomórkowy chlorek sodu, który jest głównym elementem osmotycznym, musi być utrzymywany na względnie stałym poziomie. Ssaki, będące w znakomitej większości zwierzętami lądowymi są narażone na duże wahania podaży wody,

Contents:

- I. Introduction
- II. Cellular strategies in adaptation to high osmolality
- III. Osmolytes in kidney
 - III-1. Cell culture in the study of the renal osmoregulation
 - III-2. *Myo*-inositol
 - III-3. Betaine
 - III-4. Taurine
 - III-5. Sorbitol
 - III-6. Glycerophosphocholine
- IV. Regulation of the intracellular level of osmolytes under decreased osmolality
- V. Summary

a zatem ich gospodarka elektrolitowa, a szczególnie utrzymywanie stężenia sodu na właściwym poziomie musi być skorelowane z zachowaniem prawidłowego uwodnienia organizmu [1]. Spełnione jest to poprzez wydalniczą aktywność nerek polegającą na tworzeniu i usuwaniu moczu. Proces ten zachodzi w nefronach stanowiących funkcjonalne jednostki budujące nerkę (Ryc. 1). Nefrony, zwane też kanalikami nerkowymi, zbudowane są z kilku typów komórek zróżnicowanych funkcjonalnie. Z punktu widzenia utrzymywania równowagi wodno-elektrolitowej organizmu (podlegającej m.in. kontroli hormonalnej), szczególne znaczenie mają odcinki nefronu położone głęboko w nerce, w warstwie zwanej rdzeniem nerki. Odbywa się tam selektywny, uwarunkowany podażą transport jonów sodowych przez błonę komórkową, oraz podlegająca ścisłej regulacji reabsorbcja wody. Wydajność tych procesów, prowadzących do zatężania moczu, jest wzmacniana efektem przeciwpądowym wynikającym z równoległego ułożenia ramienia zstępującego i wstę-

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



Ryc. 1. Schemat nefronu z zaznaczeniem obszarów o wysokiej i niskiej osmotyczności
 HT — hiperosmotyczny
 HY — hipoosmotyczny
 IT — izoosmotyczny

pującego pętli nefronu, zwanej pętlą Henlego, a także dodatkowo spotęgowanym przenikaniem wody i elektrolitów oraz mocznika przez ściany naczyń krwionośnych prostych, przebiegających blisko i równolegle w stosunku do nefronów. Te wszystkie czynniki sprawiają, że osmotyczność płynu znajdującego się w kanalikule nerkowym w rdzeniu nerki oraz osmotyczność płynów śródtkankowych w tej warstwie są znacznie wyższe niż osmotyczność osocza. A zatem komórki nerki (jako jedyne komórki ssaków, w warunkach normy), funkcjonują w środowisku o wysokiej i co ważniejsze, zmiennej, zależnej od podaży wody osmotyczności. Ponadto, wydalanie przez nerki mocznika i jego zateżnienie związane z oszczędną gospodarką wodną sprawia, że komórki nerek narażone są na działanie wysokich jego stężeń. Mocznik przenika przez błony komórkowe komórek rdzenia nerki, a zatem nie generuje różnic w osmotyczności środowiska zewnątrz- i wewnątrzkomórkowego, natomiast wywiera ujemny wpływ na struktury makromolekuł, w tym głównie białek, co prowadzić może do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu komórek [2, 3].

II. Strategie adaptacyjne komórek do wysokiej osmotyczności

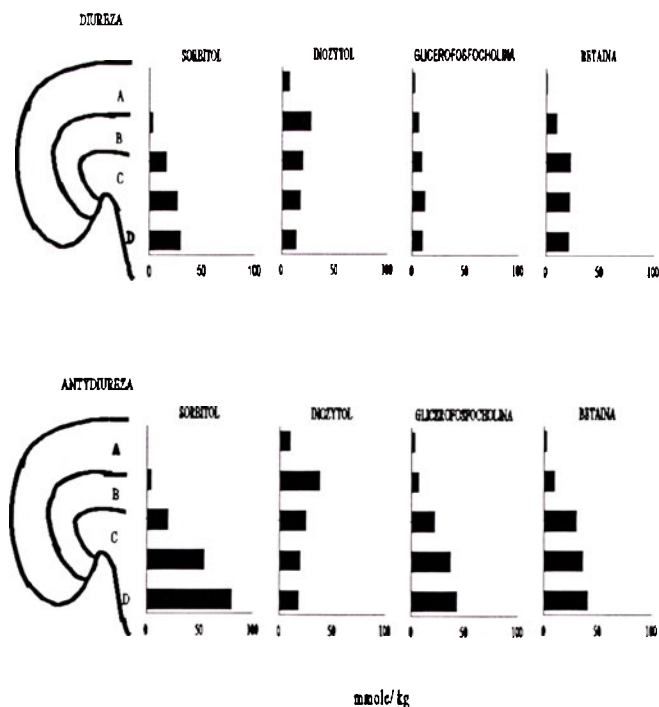
Komórki rdzenia nerki nie są unikalne pod względem przeżywalności w warunkach stresu hiperosmotycznego lub wysokiego stężenia mocznika. Innymi znanymi przykładami są: bakterie słonolubne, halofity, kserofity, organizmy znoszące zamarzanie, cysty, nasiona i inne formy przetrwalnikowe o niskiej zawartości wody oraz komórki ciała licznych morskich bezkręgowców i morskich ryb spodoustych. U tych ostat-

nich wysoka osmotyczność wody morskiej jest równoważona dużym stężeniem mocznika w osoczu i płynach tkankowych [3]. Błona komórkowa nie stanowi sztywnej bariery oddzielającej ośrodki różniące się osmotycznością, a zatem zmiana toniczności środowiska prowadzi do zmian objętości komórki, co w konsekwencji zmienia wewnątrzkomórkowe stężenia jonów, metabolitów i enzymów oraz powoduje zmiany parametrów środowiska wewnątrzkomórkowego np. jego lepkości. Proces ten może prowadzić do poważnych zakłóceń w funkcjonowaniu komórki [3]. Długotrwały stan hiper- (a także hipo-) toniczności środowiska musi spowodować wzrost (lub spadek) stężenia wewnątrzkomórkowych elementów osmotycznych (zwaných osmolitami), umożliwiając przywrócenie właściwej objętości wody w komórce. Kompensacja różnic toniczności między środowiskiem a wnętrzem komórki jest możliwa dzięki dwóm mechanizmom adaptacyjnym. Pierwszy z nich, obserwowany jedynie u słonolubnych bakterii *Halobacterium* żyjących w solankach, sprowadza się do nagromadzenia w komórkach KCl w stężeniu przekraczającym 7 M. W konsekwencji u tych organizmów występują unikalne białka, wymagające dla swojej aktywności wysokiego stężenia KCl w komórce [4, 5]. W związku z tym bakterie te mogą żyć jedynie w roztworze NaCl o wysokim stężeniu i wszelkie obniżenie osmotyczności środowiska, a w efekcie stężenia jonów potasu w cytoplazmie prowadzi do niekorzystnych zmian w aktywności szeregu ich enzymów. Drugi mechanizm występujący powszechnie w przyrodzie, pozwalający na adaptację do zmiennej osmotyczności jest także udziałem komórek rdzenia nerki. Polega on na akumulowaniu w cytoplazmie substancji organicznych, stosunkowo obojętnych metabolicznie, które kompensują wysoką toniczność środowiska, a zmiany ich stężenia umożliwiają adaptację komórek do zmiennej osmotyczności [3]. Związki te nie wykazują ujemnego wpływu na białka komórkowe, a zatem mogą być bezkarnie nagromadzone do dużych stężeń, co pozwala na utrzymanie stałego stężenia składników cytoplazmy, w tym elektrolitów. Dzięki temu nazywa się je kompatybilnymi osmolitami czyli „przyjaznymi” dla komórki [4-6]. Należą do nich alkohole wielowodorotlenowe (sorbitol, mannitol, glicerol, arabitol, sacharoza itp.), aminokwasy i ich pochodne (alanina, glicyna, betaina, tauryna) oraz polimetyloaminy (TMAO, betaina, sarkozyna, glicerofosfocholina) i mocznik [3]. Akumulacja organicznych, kompatybilnych osmolitów jest obserwowana praktycznie we wszystkich typach komórek zmuszonych do przeciwdziałania presji osmotycznej. Wśród tych substancji na szczególną uwagę zasługują polimetyloaminy, które pełnią dwoistą funkcję w sytuacjach, gdy stężenie mocznika osiąga wartości niebezpieczne dla komórki np. u morskich ryb chrzęstnoszkieletowych oraz w komórkach rdzenia nerki, w których stężenie mocznika osiąga 0.4 M. Związki te, oprócz swojej aktywności

osmotycznej wykazują zdolność do neutralizowania toksycznego działania mocznika w znacznym zakresie jego stężeń. Pełnią one nie tylko rolę osmolitów kompatybilnych, lecz także protekcyjnych, działających przeciwnie w stosunku do mocznika [3, 7, 8]. Ten efekt, potwierdzony na licznych przykładach *in vitro*, pozwala na podtrzymanie natywnych właściwości białek enzymatycznych przy stężeniu trójmetyloamin dwukrotnie niższym niż stężenie mocznika. Z drugiej jednak strony nadmierny wzrost stężenia metyloamin w nieobecności mocznika może, przynajmniej *in vitro*, prowadzić do niepożądanego aktywacji niektórych enzymów [9].

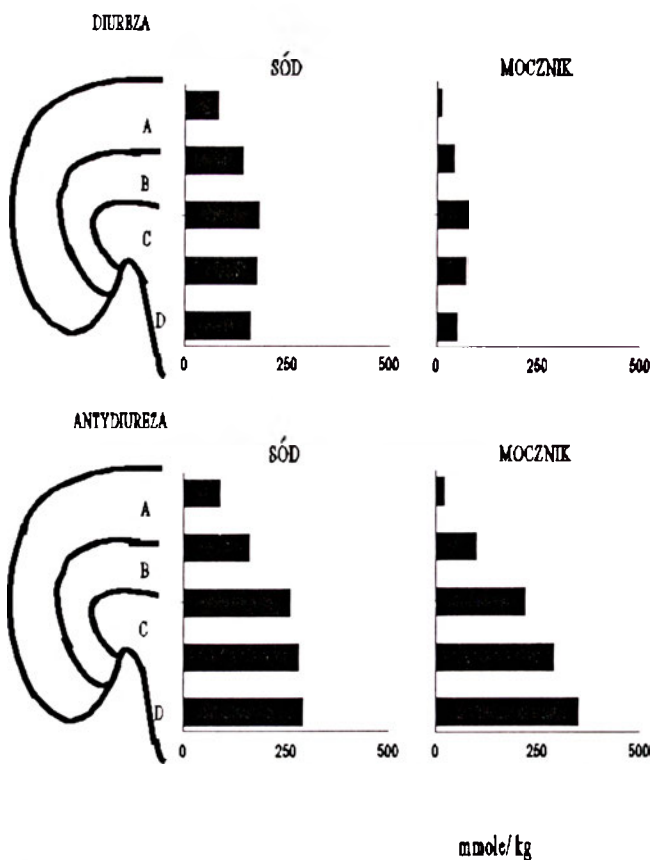
III. Osmolity w nerce

W komórkach rdzenia nerki spotyka się cztery główne osmolity: sorbitol i mioinozytol będące polialkoholami, betainę jako pochodną aminokwasów a jednocześnie polimetyloaminę, oraz glicerofosfocholinę zaliczaną do polimetyloamin [10]. Do tej grupy dołącza tauryna, będąca pochodną aminokwasu. Jednakże jej rola jako osmolitu w nerce nie jest scharakteryzowana tak dokładnie jak wcześniej wymienionych. Rozmieszczenie osmolitów w nerce, ustalone dla szczura, królika, psa, człowieka i innych gatunków jest bardzo podobne i generalnie pokrywa się z gradientem stężeń sodu i mocznika (Ryc. 2a i b), [11]. Oznacza to, że stężenia osmolitów, nieznaczne w korze nerki, wzrastają w sposób ciągły uzyskując maksimum w brodawce nerkowej. Wyjątek stanowi mioinozytol



Ryc. 2a. Poziom osmolitów w komórkach nerki w warunkach diurezy i antydiurezy (Rysunek wykonano na podstawie danych uzyskanych z pracy Yancey i Burg, 1989)

- A — kora nerki
- B — zewnętrzna część rdzenia nerki
- C — wewnętrzna część rdzenia nerki
- D — brodawka nerkowa



Ryc. 2b. Poziom sodu i mocznika w komórkach nerki w warunkach diurezy i antydiurezy (Rysunek wykonano na podstawie danych uzyskanych z pracy Yancey i Burg, 1989)

- A — kora nerki
- B — zewnętrzna część rdzenia nerki
- C — wewnętrzna część rdzenia nerki
- D — brodawka nerkowa

osiągający maksymalne stężenie w zewnętrznej warstwie rdzenia nerki, obniżające się w pobliżu brodawki. Przyczyna tego odstępstwa od ogólnej zasady nie jest znana, być może mioinozytol pełni jeszcze inne, do tej pory nie poznane funkcje w nerce. Zgodnie z przewidywaniami wynikającymi z przyjęcia hipotezy kompatybilnych i protekcyjnie działających osmolitów, która głosi, że polialkohole, pewne aminokwasy oraz ich pochodne, a także metyloaminy w połączeniu z mocznikiem mogą być bezpiecznie akumulowane w komórkach poddanych stresowi hiperosmotycznemu, wywołanie stanu antydiurezy poprzez ograniczanie zwierzęciu dostępu do wody, powodujące w konsekwencji wzrost stężenia pozakomórkowego sodu i poza- i wewnątrzkomórkowego mocznika, prowadzi do wzrostu cytosolowego stężenia sorbitolu, mioinozytlu, GPC i betainy. Przyrost stężeń nie jest jednakowy dla wszystkich osmolitów i trudno przewidywalny dla różnych gatunków zwierząt [2, 12]. Istotne jest to, że w niezmiennych warunkach osmotycznych suma stężeń wszystkich osmolitów jest stała i równoważąca zewnątrzkomórkowe ciśnienie osmotyczne. W tym sensie kompatybilność osmolitów można rozumieć jako ich uzupełnianie się i ewentualnie zastępowanie jednych drugimi. Analogicznie, nadmiernemu wzrostowi diurezy spowodowanemu dużym spoży-

ciem wody, prowadzącemu do wzmożonego wydalania sodu i mocznika, towarzyszy obniżenie zawartości kompatybilnych osmolitów w komórkach [13, 14]. Modelowym przykładem ukazującym te zależności są szczury linii Brattleboro, z wrodzoną moczówką prostą. W normalnych warunkach zwierzęta te piją duże ilości wody i wydalają bardzo rozcieńczony mocz. Podanie hormonu antydiuretycznego powoduje gwałtowne ograniczenie objętości wydalanego moczu oraz wzrost jego stężenia, a także istotną, lecz rozciągniętą w czasie akumulację osmolitów w komórkach rdzenia nerki [15]. Wyjątek w opisywanych prawidłowościach stanowi znów mioinozytol, którego stężenie w komórkach nie zależy w sposób absolutnie jednoznaczny od stopnia diurezy [15, 16]. Ponadto, stężenie GPC zmienia się równoległe ze zmianami stężenia mocznika, co potwierdza fizjologiczną rolę tej trójmetyloaminy jako osmolitu znoszącego toksyczne dla komórek działanie mocznika [16, 17].

III. Kultury komórkowe w badaniach osmoregulacji w nerkach

Badania nad mechanizmami regulacji osmotycznej w nerkach początkowo prowadzone *in vivo* ustąpiły miejsca badaniom w których wykorzystywano izolowane, rdzeniowe fragmenty nefronów. Umożliwiło to dokładne kontrolowanie osmotyczności środowiska doświadczalnego, a zatem łatwiejszą interpretację uzyskanych wyników, lecz nie pozwalało, ze względu na przeżywalność preparatu, na prowadzenie długotrwałych eksperymentów [18]. Zastosowanie kultur komórkowych znosi tę niedogodność i umożliwia często wielomiesięczne badania adaptacji komórek nerki do zmienionej osmotyczności środowiska hodowlanego, którego skład może być w pełni kontrolowany [11]. Z drugiej jednak strony komórki w hodowlach *in vitro* często wykazują różnice w aktywnościach enzymów w stosunku do ich odpowiedników *in vivo*, co może mieć znaczenie w interpretacji wyników i utrudniać porównywanie tych dwóch sytuacji. W niniejszym opracowaniu większość przedstawionych wyników pochodzi z doświadczeń przeprowadzonych na kulturach komórkowych linii MDCK lub PAP-HT25, oraz czasami z wykorzystaniem izolowanych kanalików nerkowych stanowiących rdzeniowy odcinek kanalik zbiorczego nerki szczura [19, 20]. Wzrost stężenia NaCl i mocznika w pożywce hodowlanej powoduje istotne nagromadzenie się wszystkich czterech osmolitów w komórkach PAP-HT25, podczas gdy komórki MDCK pozbawione są zdolności akumulacji sorbitolu [10, 21, 22]. Mechanizmy nagromadzenia się osmolitów w komórkach, w hodowlach *in vitro* a także *in vivo* polegają albo na aktywacji ich transportu przez błonę komórkową ze środowiska, jak to ma miejsce w przypadku betainy i mioinozytolu, albo na modyfikacji szybkości ich metabolizmu w przypadku sorbitolu i glicerofosfocholiny.

III-1. Mioinozytol

Ten cykliczny polialkohol jest normalnie obecny w diecie. Ponadto, szereg komórek (w tym w nerkach), wytwarza mioinozytol z glukozy lub też jako produkt degradacji fosfolipidów inozytowych [23, 24]. Nerki są jedynym narządem u ssaków, w którym zachodzi intensywny katabolizm mioinozytolu, aż do dwutlenku węgla, przy czym proces ten przebiega w korze i zewnętrznych warstwach rdzenia, ale nie w komórkach wewnętrznej części rdzenia [25]. Ponadto szereg typów komórek, wliczając w to komórki z różnych obszarów nerki jest w stanie pobierać mioinozytol ze środowiska na drodze transportu zależnego od sodu [26]. Proces ten jest hamowany przez strofantynę i florydzynę a także w obecności wysokich stężeń glukozy [26, 27]. Stężenie mioinozytolu w komórkach rdzenia nerki może być 1000-krotnie wyższe niż w osoczu, co wskazuje na znaczny koszt energetyczny jaki ponoszą komórki w celu utrzymania tak wysokiego gradientu. Nie ma obecnie przekonujących dowodów na to, czy synteza wewnątrzkomórkowa czy też transport mioinozytolu ze środowiska podlegają aktywacji w czasie adaptacji komórek nerki *in vivo* do stanu antydiurezy. Jedyne precyzyjne wyniki pochodzą z doświadczeń na kulturach komórkowych. Komórki MDCK i PAP-HT25 a także LLC-PK₁, LLC-PK₃ i szereg innych nagromadzają w odpowiedzi na wzrost osmotyczności medium hodowlanego mioinozytol obecny w pożywce w stężeniu podobnym do spotykanego w osoczu (ok. 0.1 mM) [28-31]. Transport tego osmolitu do komórek MDCK odbywa się tylko przez błonę bazolateralną [32]. W komórkach tych, poddanych stresowi hiperosmotycznemu spowodowanemu zwiększeniem ilości NaCl do ok. 500 mOsm/kg, stężenie osmolitu osiąga maksimum (ok. trzykrotnie przewyższające wartość kontrolną dla komórek hodowlanych w warunkach niezmienionej, niskiej osmotyczności wynoszącej ok. 300 mOsm/kg) dopiero po 7 dniach. Podobny efekt uzyskuje się gdy chlorek sodu zastąpiony jest rafinozą lub sorbitolem, natomiast wzrost osmotyczności medium hodowlanego spowodowany dodaniem mocznika lub glicerolu, ale bez obecności zwiększonego stężenia NaCl, nie wpływa na wewnątrzkomórkowe stężenie mioinozytolu [32, 33]. A zatem, czynnikiem koniecznym do wywołania akumulacji mioinozytolu wydaje się być powstanie potencjału osmotycznego w poprzek błony, co następuje w przypadku podniesienia osmotyczności pożywki przez dodanie substancji nieprzenikających przez błonę komórkową, (a nie tylko wzrost osmotyczności roztworu bez wytworzenia gradientu, a więc bez zmian objętości komórek). Ponadto stymulujący wpływ rafinozy czy sorbitolu na akumulację mioinozytolu w komórkach MDCK lub PAP-HT25 wskazuje, że mechanizm aktywacji transportu tego osmolitu w obecności wysokiego stężenia NaCl nie polega na bezpośredniej stymulacji szybkości działania transportera błonowe-

go wymagającego istnienia gradientu sodowego do swojej aktywności. Pomiar kinetyki transportu mioinozytolu do komórek MDCK i PAP-HT25 poddanych zarówno długotrwałemu (kilkumiesięcznemu) jak i kilkudniowemu działaniu podwyższonego stężenia chlorku sodu i mocznika wskazują na wzrost szybkości maksymalnej tego procesu, a nie powinowactwa transportera do tego osmolitu. Wydaje się, że jest to efektem zwiększonej liczby cząsteczek transportera w błonie komórkowej. Maksymalną stymulację transportu w przypadku szybkiej odpowiedzi obserwuje się po jednym dniu, a następnie, prawdopodobnie na skutek wzrostu stężenia mioinozytolu w komórce, dochodzi do zmniejszenia tego efektu [30, 32]. Istnieje możliwość, że mioinozytol w wysokim stężeniu jest inhibitorem swojego transportera. Potwierdza to przedłużony stan wysokiej aktywności transportu tego osmolitu w komórkach poddanych stresowi osmotycznemu w nieobecności mioinozytolu w pożywce. Co więcej, obserwacja ta wskazuje, że komórki MDCK nie są w stanie pokryć zapotrzebowania na mioinozytol w warunkach stresu hiperosmotycznego poprzez jego syntezę ze znajdującej się w pożywce glukozy. Niewykluczone jest także, że stopniowe przywracanie pierwotnej objętości komórki jest sygnałem do spowolnienia procesów adaptacyjnych. Przyrost liczby cząsteczek przenośnika mioinozytolu w komórkach rdzenia nerki potwierdzony jest doświadczalnie. Obecność cykloheximidu [34] znosi stymulację transportu mioinozytolu do komórek izolowanych z wewnątrzrdzeniowych odcinków kanalików zbiorczych, a ponadto podanie do oocytu *Xenopus laevis*, normalnie nie pobierającego mioinozytolu ze środowiska, mRNA izolowanego z komórek MDCK rosnących w pożywce hiperosmotycznej, powoduje ujawnienie się transportu przez oocyty. Efektu tego nie uzyskuje się gdy podawany mRNA pochodzi z komórek MDCK rosnących w pożywce izoosmotycznej [35].

III-2. Betaina

Betaina podobnie jak mioinozytol jest stałym składnikiem diety. Ponadto, wiele komórek, w tym również komórki rdzenia nerki, jest w stanie wytwarzać betainę na drodze utleniania powszechnie dostępnej w diecie cholicy. Ten proces wymaga aktywności dwóch enzymów: mitochondrialnej dehydrogenazy cholicy [EC 1.1.99.1] i cytosolowej dehydrogenazy aldehydu betainy [EC 1.2.1.8] [36]. Katabolizm betainy, zachodzący również w nerkach, odbywa się z udziałem S-metylotransferazy betaina:homocysteina [EC 2.1.1.5], której aktywność jest pozytywnie regulowana przez wysokie stężenia betainy [37]. Reakcje wytwarzania betainy potencjalnie stanowią regulatorowy etap w procesie nagromadzenia tego osmolitu. Jednakże akumulacji betainy w komórkach rdzenia nerki szczura *in vivo*, w odpowiedzi na gwałtowny wzrost stężenia jonów sodowych we krwi nie towarzy-

szy wzrost aktywności żadnego z enzymów syntezy betainy z cholicy [38]. Betaina, tak jak mioinozytol jest aktywnie transportowana przez błonę luminalną kanalików nerkowych w odpowiedzi na wzrost osmotyczności środowiska okołokomórkowego [39]. Komórki MDCK, PAP-HT25, a także innych linii pochodzących z nerek, poddane stresowi hiperosmotycznemu, podobnie jak komórki rdzenia nerki *in vivo* w warunkach antydiurezy (Ryc. 2), akumulują znaczne ilości betainy [29]. Proces ten osiąga plateau po ok. tygodniu od zmiany osmotyczności z 315 do 500 mOsm/kg, uzyskanej przez wzrost stężenia chlorku sodu czy rafinozy ale nie mocznika czy glicerolu w pożywce i wymaga obecności betainy w środowisku [33]. Paradoksalnie, mocznik w wysokim stężeniu obniża szybkość transportu tego osmolitu przez błonę komórkową. Przy braku betainy w środowisku, nawet w obecności cholicy, nie obserwuje się jej nagromadzenia w komórkach. Zależny od jonów sodu transporter betainy, podobnie jak w komórkach nerek *in vivo* znajduje się w bazolateralnej błonie komórek MDCK [32, 33]. Mechanizm aktywacji transportu betainy jest zasadniczo podobny do opisanego dla mioinozytolu. Komórki MDCK rosnące w środowisku izoosmotycznym mają dwa, różniące się wartością K_m sodozależne nośniki betainy. W wyniku długotrwałej (wielomiesięcznej) adaptacji komórek do podwyższonego stężenia chlorku sodu w pożywce wzrasta dziesięciokrotnie szybkość maksymalna transportu, natomiast wartości stałych Michaelisa pozostają niezmiennione. Podobnie jak w przypadku mioinozytolu, szybka odpowiedź na nagły wzrost osmotyczności spowodowany dodaniem chlorku sodu do pożywki osiąga maksimum po 1 dniu, a następnie ulega samoograniczeniu [32, 33]. Stymulacja transportu betainy do komórek MDCK obserwowana w obecności rafinozy zamiast chlorku sodu w pożywce wyklucza aktywację tego procesu jedynie przez zwiększenie gradientu sodowego. Podobnie jak w przypadku badania transportu mioinozytolu, podanie do oocytu *Xenopus laevis* mRNA izolowanego z komórek MDCK poddanych uprzednio 24-godzinnej ekspozycji na zwiększone stężenia chlorku sodu (615 mOsm/kg) sprawia, że oocyty zaczynają pobierać betainę ze środowiska mimo, że normalnie nie zawierają one w błonie żadnego zależnego od sodu systemu transportu tego związku. Efektu tego nie uzyskuje się z mRNA izolowanym z komórek MDCK hodowanych w warunkach niskiej (315 mOsm/kg) osmotyczności lub w obecności wysokich stężeń mocznika lub glicerolu w pożywce [40]. Doświadczenie to udowadnia, że podobnie jak przy transporcie mioinozytolu, w warunkach podwyższonej osmotyczności środowiska, wywołanej obecnością substancji nie przechodzących przez błonę komórkową, a zatem prowadzącej wstępnie do zmniejszenia się objętości komórek, następuje wzmożenie ekspresji genów kodujących białka odpowiednich transporterów, co objawia się zwiększeniem szybkości maksymalnej transportu. Nie-

stety nie ma dotychczas przekonujących danych potwierdzających regulatorowe znaczenie transportu betainy do komórek rdzenia nerki w warunkach antydiurezy *in vivo*.

III-3. Tauryna

Dane dotyczące jej akumulacji w komórkach nerek w warunkach stresu osmotycznego są znacznie bardziej fragmentaryczne tak, że tauryna nie bywa wymieniana w grupie powszechnie uznanych osmolitów. Niemniej, błona bazolateralna komórek MDCK zawiera zależny od sodu transporter tego związku. Prawdopodobnie jest to nośnik β -aminokwasów [41, 42]. Co więcej, szybkość maksymalna transportu, ale nie powinowactwo tego transportera w stosunku do tauryny, jest zwiększona gdy komórki rosną w środowisku hiperosmotycznym. Podobnie jak w przypadku mioinozytolu i betainy, mRNA izolowany z komórek MDCK adaptowanych do wysokiej osmotyczności i wstrzyknięty do oocyty żaby wydaje się stymulować szybkość pobierania tauryny. Wskazuje to na duże podobieństwo mechanizmów nagromadzania się tauryny, betainy i mioinozytolu w czasie adaptacji komórek nerki do podwyższonej osmotyczności [43].

III-3. Sorbitol

Jest polihydroksylowym alkoholem powstającym poprzez redukcję glukozy w reakcji katalizowanej przez reduktazę aldozową [EC 1.1.1.21] cytosolowy enzym, którego aktywność stwierdzono w wielu różnych tkankach i narządach jak: soczewka oka, mięśnie szkieletowe, nadnercza, mózg, ślinianki, wątroba, erytrocyty czy wreszcie nerki [44]. W tych ostatnich obserwuje się nierównomierne rozmieszczenie reduktazy, której największa aktywność wydaje się być zlokalizowana w komórkach kanalików położonych w rdzeniu, a znacznie niższa w pozostałych fragmentach nefronu [45, 46]. Ten rozkład jest zgodny z gradientem stężenia sorbitolu w poprzecznym przekroju nerki (Ryc. 2). Drugim istotnym enzymem metabolizmu sorbitolu jest dehydrogenaza sorbitolu [EC 1.1.1.14] występująca u ssaków głównie w wątrobie, lecz również w nerkach, głównie w ich części korowej ale także, chociaż, w dużo mniejszym stopniu w rdzeniu [47]. Podobnie jak w nerkach *in vivo* w warunkach antydiurezy [10, 21, 44, 48], komórki linii PAP-HT25 akumulują sorbitol w odpowiedzi na wzrost stężenia chlorku sodu w środowisku hodowlanym, przy czym proces ten nie jest natychmiastowy, a stężenie sorbitolu osiąga maksimum po 4 dniach [33]. Podobny rezultat przynosi podniesienie osmotyczności środowiska przy pomocy rafinozy ale nie mocznika lub glicerolu [49]. A zatem, tak jak w przypadku mioinozytolu i betainy czynnikiem koniecznym dla aktywacji procesu nagromadzania sorbitolu w komórce jest stworzenie ciśnienia osmotycznego w po-

przek błony komórkowej i w konsekwencji zmniejszenie się objętości komórki i wzrost siły jonowej w cytosolu. Wzrost ciśnienia osmotycznego powoduje podniesienie aktywności reduktazy aldozowej [49-51]. Zmiany te są obserwowane dopiero po 6 godzinach trwania stresu hiperosmotycznego, co wskazuje na ich adaptacyjny charakter [49]. Jednocześnie nie zauważa się żadnych istotnych zmian aktywności dehydrogenazy sorbitolu, której aktywność jest poniżej granicy oznaczalności [51]. Wzrost aktywności reduktazy aldozowej w odpowiedzi na wzrost ciśnienia osmotycznego niezależnie od tego, czy został on spowodowany chlorkiem sodu, czy rafinozą wskazuje, że sygnałem dla aktywacji tego enzymu nie jest podniesienie stężenia soli w środowisku ale raczej wzrost stężenia któregoś ze składników cytoplazmy będący konsekwencją zmniejszenia się objętości wody w komórce. Doświadczenia z użyciem strofantyny, która powoduje wzrost objętości komórki oraz wewnątrzkomórkowego stężenia sodu, a obniżenie stężenia potasu w cytosolu, wykazały dobrą zależność między wewnątrzkomórkowym stężeniem potasu albo raczej sumy stężeń potasu i sodu, a aktywacją reduktazy aldozowej [49]. Wydaje się także, że nie sam fakt wzrostu tych stężeń, a raczej osiągnięcie krytycznego poziomu jest konieczne dla indukcji enzymu. Wzrostowi aktywności reduktazy aldozowej towarzyszy wzrost zawartości mRNA będący rezultatem wzmożonej ekspresji jej genu [46]. Pomiar dynamiki tej aktywacji wskazują, że poziom mRNA zaczyna wzrastać w ciągu pierwszej godziny po podniesieniu osmotyczności, osiąga maksimum po kilkunastu godzinach i po upływie doby zaczyna się zmniejszać przy jednoczesnym wzroście stężenia sorbitolu w komórce. W ciągu następnych kilku dni utrzymuje się stan równowagi, w którym ilość komórkowego mRNA reduktazy aldozowej jest pięciokrotnie wyższa od stwierdzanej w komórkach kontrolnych [52]. Wzrost stężenia sorbitolu w cytoplazmie prowadzi do zahamowania ekspresji genu kodującego ten enzym. Inhibitor aktywności reduktazy aldozowej (Tolrestat) ogranicza syntezę sorbitolu i w efekcie wydłuża okres wzrostu zawartości odpowiedniego mRNA w komórkach PAP-HT25 w stosunku do obserwowanego w nieobecności tego inhibitora [53]. Czas półtrwania białka reduktazy aldozowej jest taki sam w komórkach rosnących w środowisku izo- i hiperosmotycznym i wynosi ok. 6 dni, co wskazuje, że degradacja tego enzymu nie ma znaczenia regulacyjnego w kontekście adaptacji do podwyższonej osmotyczności [51]. W komórkach PAP-HT25 rosnących w obecności wysokiego stężenia chlorku sodu i mocznika reduktaza aldozy może stanowić aż 10% wszystkich rozpuszczalnych białek w komórce. Gwałtowne obniżenie osmotyczności medium hodowlanego z 600 do 320 mOsm/kg powoduje stopniowe zmniejszanie się zawartości w komórce białka reduktazy aldozowej bez zmiany jej czasu półtrwania, oraz szybki zanik (w ciągu 1 dnia) mRNA tego enzymu [46].

Wnioski wyciągnięte na podstawie doświadczeń na kulturach komórkowych przedstawione powyżej w znacznym stopniu są potwierdzone w układach *in vivo*. (i) Ograniczenie dostępu do wody przez 24 godziny prowadzi do wzrostu ilości białka enzymatycznego reduktazy aldozowej w nerce psa [54] (ii) podanie szczurom linii Brattleboro wazopresyny powoduje znaczne ograniczenie ilości wydalanej wody, wzrost stężenia jonów sodowych w moczu i w przestrzeniach okołokomórkowych, oraz znaczne podwyższenie zawartości reduktazowego mRNA, a także aktywności reduktazy aldozowej i zawartości sorbitolu w komórkach rdzenia nerki [15] (iii) wywołanie stanu diurezy u szczurów pierwotnie antydiuretycznych powoduje obniżenie się zawartości mRNA reduktazy aldozowej w ciągu pierwszego dnia, natomiast poziom i aktywność samego enzymu utrzymuje się kilka dni, co wynika prawdopodobnie ze stosunkowo długiego czasu półtrwania tego białka, jak to stwierdzono w komórkach PAP-HT25 [55].

III-4. Glicerofosfocholina

Ten fosfodiester powstaje, jak się powszechnie uważa w wyniku hydrolizy fosfatydylocholiny, w reakcji katalizowanej przez fosfolipazę A2 i/lub A1 a następnie lizofosfolipazę i w wielu tkankach np. w wątrobie jest traktowany jako metabolit pośredni w katabolizmie lecytyny [56]. Ponadto, postuluje się istnienie alternatywnych dróg wytwarzania GPC, z których pierwsza polega na przeniesieniu reszty choliny z fosfatydylocholiny na glicero-3-fosforan, zaś druga na bezpośredniej syntezie tego osmolitu z CDP-choliny i glicero-3-fosforanu [57-59]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy wszystkie z wymienionych reakcji zachodzą w nerkach, chociaż udział dwóch ostatnich nie jest jeszcze do końca udowodniony. Powstała GPC jest degradowana przy udziale fosfodiesterazy, z wytworzeniem glicero-3-fosforanu i choliny. Enzym ten jest obecny w wielu tkankach szczura i jest zlokalizowany w błonach siateczki endoplazmatycznej, przy czym najwyższą jego aktywność obserwuje się w korze nerki [60]. Aktywność ta obniża się zdecydowanie w miarę zbliżania się do wewnętrznej części rdzenia, a zatem jej rozkład w przekroju poprzecznym nerki jest odwrotny w stosunku do rozmieszczenia GPC (Ryc. 2). Ograniczenie dostępu do wody powoduje wzrost stężenia GPC w komórkach rdzenia nerki szczura, królika, psa, świni i człowieka [61, 62]. Już w latach 50-tych Ulrich [63] zaproponował, że regulacja aktywności GPC-fosfodiesterazy stanowi podstawę mechanizmu nagromadzania się GPC w nerkach. Ponieważ wyniki badań *in vivo* są często niejednoznaczne i trudne do interpretacji, obecnie proponowany model regulacji nagromadzania się GPC w komórkach nerek ustalony został głównie na podstawie badań prowadzonych przy użyciu kultur komórkowych. Podstawową cechą wyróżniającą ten osmolit spośród wcześniej

omówionych jest to, że nagromadza się on w komórkach MDCK lub PAP-HT25 zarówno w warunkach wysokiego stężenia chlorku sodu jak i wysokiego stężenia mocznika, przy czym wpływ obu czynników stosowanych jednocześnie nie jest całkowicie addytywny [28, 56, 64]. Wskazuje to, że akumulacja GPC może być spowodowana zarówno wzrostem gradientu osmotycznego w przypadku NaCl (lub rafinozy), jak i wzrostu stężenia mocznika, który nie stwarza różnic osmotyczności po obu stronach błony komórkowej, a zatem nie powoduje zmniejszenia się objętości komórki i wzrostu siły jonowej jej wnętrza, co jest sygnałem do indukcji ekspresji genu reduktazy aldozowej i nagromadzania się sorbitolu, a także warunkiem indukcji transportu betainy i mioinozytolu (pkt III-1 i III-2). A zatem, możliwe jest istnienie dwóch różnych mechanizmów uruchamiających nagromadzanie się glicerofosfocholiny w komórkach, przy czym przynajmniej jeden z nich jest inny niż zaangażowany w indukcję nagromadzania mioinozytolu, betainy czy sorbitolu. Pozostaje to w zgodzie z hipotezą ochronnie działających osmolitów i o szczególnej roli GPC jako metyloaminy w znoszeniu toksycznego dla komórek działania mocznika [56].

Wzrost stężenia GPC w obu badanych liniach komórkowych jest stosunkowo powolny, wymagający ok. jednego tygodnia do osiągnięcia plateau, a jego szybkość nie zależy od tego czy osmotyczność pożywki podwyższono dodatkiem NaCl, mocznika czy obu substancji jednocześnie [56, 64]. Niezależnie od sposobu wytwarzania GPC w komórce, cholina jest zawsze prekursorem tego związku. Spowodowanie stresu hiperosmotycznego przy pomocy medium pozbawionego choliny powoduje jedynie przejściowy i niewielki wzrost stężenia osmolitu w komórce, możliwy prawdopodobnie dzięki rezerwom choliny zmagazynowanej w postaci fosfatydylocholiny w błonach plazmatycznych. Jednakże w warunkach prawidłowej hodowli dostępność choliny lub szybkość jej pobierania przez komórki nie ogranicza syntezy GPC i nie podlega regulacji zależnej od osmotyczności środowiska [56]. Wiele informacji dotyczących nagromadzania się glicerofosfocholiny w komórkach MDCK dostarczyły pomiary szybkości włączania radioaktywnej choliny do tego osmolitu (a zatem pomiary szybkości jego syntezy), w różnych warunkach osmotycznych [65]. W obecności mocznika, samego lub z NaCl, następuje utrzymujące się co najmniej przez kilka dni obniżenie szybkości syntezy GPC spowodowane spadkiem aktywności fosfolipazy A2 [65] lub, według innych autorów, nie obserwuje się istotnej zmiany ani w szybkości włączania choliny, ani w aktywności fosfolipazy [66]. Niezależnie od tego, która obserwacja jest bliższa prawdy, obie wskazują, że proces wytwarzania GPC nie podlega aktywacji w warunkach podniesionego stężenia mocznika. Badania szybkości zaniku GPC znakowanego izotopem węgla lub trytem, wprowadzonego uprzednio do komórek, wykazały znaczne

zmniejszenie intensywności tego procesu w komórkach eksponowanych na wysokie stężenie mocznika lub mocznika plus NaCl [65, 67]. Istotnie, w warunkach tych następuje dramatyczny spadek aktywności GPC-fosfodiesterazy utrzymujący się co najmniej przez 7 dni trwania warunków hiperosmotycznych, co tłumaczy wzrost stężenia komórkowego GPC. A zatem, w obecności wysokiego stężenia mocznika w środowisku, nagromadzenie się GPC jest efektem spowolnienia jego degradacji, a nie przyspieszenia syntezy. W warunkach kiedy wzrost osmotyczności uzyskano za pomocą chlorku sodu bez dodatku mocznika aktywność GPC fosfodiesterazy ulega obniżeniu tylko w pierwszej fazie adaptacji komórek. Po dwóch dniach rozpoczyna się stopniowy powrót aktywności tego enzymu do stanu wyjściowego, który jest osiągany po ok. tygodniu [67]. Mimo stopniowego wzrostu aktywności GPC-fosfodiesterazy (a zatem przyspieszenia degradacji glicerofosfocholiny), następuje stały przyrost zawartości GPC w komórkach MDCK. Pomiarzy szybkości włączania radioaktywnej choliny lub szybkości przekształcania podanej komórkom lizofosfatydylocholine (która w pierwszym etapie zostaje w komórkach acylowana tzn. przekształcana w fosfatydylocholinę), do GPC wskazują, że po dwóch dniach hiperosmolalności (w obecności NaCl, ale nie mocznika), szybkość wytwarzania GPC jest wyższa niż w komórkach kontrolnych [66]. Sugeruje to, że po upływie 2 dni następuje aktywacja wytwarzania glicerofosfocholiny. Stwierdzony po upływie tego samego czasu istotny wzrost aktywności fosfolipazy A2 potwierdza tę sugestię [66, 68]. Dotyczy on przede wszystkim izoenzymów związanych z frakcją błonową i przynajmniej w przypadku komórek MDCK, nie wykorzystujących jako substratu egzogennej fosfatydylocholine zawierającej w pozycji drugiej resztę kwasu arachidonowego [66]. Potwierdzenie tej obserwacji *in vivo* nie jest łatwe ze względu na trudność uzyskania powtarzalnego stopnia antydiurezy u poszczególnych osobników. Niemniej istnieją dane wskazujące na aktywację fosfolipazy A2 we frakcjach: mitochondrialnej i mikrosomalnej izolowanych z homogenatu rdzenia nerki królików pozbawionych przez 2 doby dostępu do wody [68]. Na podstawie tych informacji można stworzyć model, w którym pierwsza faza adaptacji polega na zahamowaniu degradacji GPC niezależnie od sposobu podniesienia osmotyczności, natomiast faza późniejsza zależy od tego czy w środowisku znajduje się mocznik. Jeżeli nie, następuje aktywacja fosfolipazy A2, czyli wytwarzania GPC, a jego degradacja przestaje odgrywać kluczową rolę. W warunkach *in vivo* nagromadzenie się GPC jest prawdopodobnie wynikiem wypadkowego udziału aktywacji syntezy i inhibicji degradacji tego osmolitu w stopniu zależnym od aktualnego stężenia mocznika i NaCl w nerce, co może zależeć od gatunku zwierzęcia, rodzaju pożywienia itp. Obecnie nie ma zgody co do roli fosfolipazy A2 w warunkach antydiurezy

[19, 20, 68].

Badania regulacji nagromadzania się GPC w komórkach nerek *in vitro* pozwoliły także na weryfikację hipotezy kompatybilnych osmolitów według której, suma stężeń wszystkich osmolitów w danych warunkach osmotycznych środowiska powinna być stała, a zatem nadmiar jednego z nich powinien ograniczać nagromadzenie pozostałych, zaś niedomiar wzmacniać ten proces. Stwierdzono, że w warunkach wysokiego stężenia betainy lub/i mioinozytolu w środowisku, następuje ograniczenie akumulacji GPC w komórkach MDCK. Jest to wynikiem aktywującego wpływu betainy i mioinozytolu na GPC-fosfodiesterazę. Tej współzależności nie obserwuje się w przypadku podniesionego stężenia mocznika w środowisku. W tych warunkach zawartość GPC w komórkach MDCK jest trwale utrzymywana na wysokim poziomie, co potwierdza szczególną rolę tego osmolitu jako czynnika znoszącego toksyczne działanie mocznika [69].

Udział pozostałych dwóch reakcji metabolicznych prowadzących do powstawania GPC nie jest dotychczas poznany. Wydaje się, że reakcja przeniesienia reszty choliny z fosfatydylocholine na glicero-3-fosforan może mieć znaczenie, przynajmniej w komórkach MDCK, w pierwszej fazie gromadzenia się GPC, rozpoczynającej się natychmiast po podniesieniu osmotyczności środowiska i trwającej kilkanaście godzin. Istnieją bowiem dowody na to, że wzrost stężenia chlorku sodu powoduje stymulację włączania radioaktywnego glicero-3-fosforanu do GPC w warunkach gdy jedynym źródłem choliny jest endogenna, zawarta w błonach mitochondrialnych fosfatydylocholina. Stymulacja ta jest stwierdzana już po 15 min. i trwa 16 godz. od wzrostu osmotyczności. Towarzyszy temu wzrost aktywności odpowiedniej transferazy choliny [70]. Na temat regulacji osmotycznej drugiej reakcji syntezy GPC z CDP-choliny i glicero-3-fosforanu brak jest jakichkolwiek danych.

IV. Regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia osmolitów w warunkach obniżonej osmotyczności

Podanie wody zwierzętom z uprzednio wywołaną antydiurezą powoduje szybkie rozcieńczenie dotychczas stężonego moczu, oraz obniżenie się osmotyczności płynów śródtkankowych [71]. Podobny efekt uzyskuje się po podaniu normalnie nawodnionym zwierzętom diuretycznie działającego furosemidu lub w przypadku szczurów Brattleboro po zaprzestaniu podawania wazopresyny. W tych warunkach obserwuje się spadek wewnątrzkomórkowego stężenia osmolitów. W układzie *in vitro* poddanie szokowi hiposmotycznemu izolowanych z zachowaniem naturalnej, wysokiej osmotyczności, rdzeniowych odcinków kanalika zbiorczego nerki szczura powoduje natychmiastowe uwalnianie osmolitów do środowiska [13, 14]. Ten sam efekt obserwuje się w przypadku komórek

MDCK, oraz PAP-HT25 adaptowanych do wysokiej osmotyczności, a następnie gwałtownie obniżonej. Wpływ osmolitów i w konsekwencji spadek ich stężenia w komórce może być powstrzymany przez ponowne podniesienie osmotyczności środowiska. Przedłużenie czasu ekspozycji komórek MDCK lub PAP-HT25 na warunki hipoosmotyczne powoduje stopniowe obniżanie się aktywności mechanizmów akumulacji osmolitów. W przypadku betainy szok hipoosmotyczny powoduje wypływ tego osmolitu z komórek, w wyniku którego dochodzi do nagłego obniżenia się jego stężenia w cytoplazmie osiagającego w komórkach PAP-HT25 70% wyjściowej ilości betainy w ciągu 10 minut [64, 72]. Obniżenie się aktywności transportera betainy następuje powoli i całkowity powrót do stanu sprzed adaptacji do warunków hiperosmotycznych, osiagany jest po około dwóch dniach. Podobny wpływ szoku hipoosmotycznego obserwuje się w przypadku mioinozytolu, przy czym wypływ tego osmolitu z komórek jest mniej gwałtowny niż betainy, zaś aktywność transportu mioinozytolu do komórek obniża się do stanu wyjściowego po około 12 godz. Obserwacje te są zasadniczo podobne do komórek MDCK oraz PAP-HT25 [64, 72]. Zarówno w przypadku betainy, jak mioinozytolu molekularny mechanizm aktywacji ich uwalniania nie jest opisany. Nieco więcej wiadomo o hipoosmotycznej aktywacji wyciekania sorbitolu z komórek rdzenia nerki [73]. Szok hipoosmotyczny powoduje natychmiastowy, przejściowy wypływ tego osmolitu z komórek PAP-HT25. Obserwuje się to nie tylko przy zmianie osmotyczności środowiska z podwyższonej (600 mOsm/kg) na normalną (300 mOsm/kg), ale również z normalnej na obniżoną (180 mOsm/kg). Szybkość wychodzenia sorbitolu z komórek PAP-HT25 podlega 80-cio krotnej stymulacji w ciągu pierwszych dziesięciu min., przy zmianie osmotyczności z podwyższonej na normalną i praktycznie nie zależy od obecności w komórkach innych osmolitów. Podobny efekt obserwowano w izolowanych fragmentach rdzeniowych części kanalików zbiorczych nerki szczura i królika [73]. Wykazano, że wypływ sorbitolu z komórek PAP-HT25, oraz z komórek kanalików nerkowych w warunkach szoku hipoosmotycznego odbywa się jedynie przez błonę antyluminalną [74], jest aktywowany specyficznie w stosunku do sorbitolu, nie ulega zjawisku wysycenia sorbitolem aż do stężenia 315 mM i nie podlega hamowaniu współzawodniczemu w obecności innych cyklicznych polialkoholi [73, 74]. Jest natomiast hamowany w obecności inhibitorów cytochromu P-450 (SKF-525A), oraz inhibitorów metabolizmu kwasu arachidonowego (tetraacetylenowe pochodne kwasu arachidonowego) [75]. Nie obserwuje się natomiast wpływu inhibitorów cyklooksygenaz na ten proces. Wskazuje to na udział pochodnych kwasu arachidonowego będących produktem jego utleniania przez cytochrom P-450, w aktywacji wypływu sorbitolu. Badania prowadzone przy użyciu izolowanych

fragmentów rdzeniowej części kanalika zbiorczego nerki ujawniły, że aktywacja transportu sorbitolu wymaga obecności jonów wapnia w środowisku inkubacyjnym [76]. Podanie jonoforu A231187 w obecności jonów wapnia powoduje wypływ sorbitolu z komórek bez zmiany osmotyczności środowiska. Sugeruje to, że to nie tylko początkowe pęcznienie komórek w następstwie obniżenia osmotyczności, lecz wejście wapnia do komórek jest ważne dla aktywacji transportu sorbitolu. Być może w wyniku szoku hipoosmotycznego pobieranie wapnia przez komórki odbywa się poprzez kanały aktywowane mechanicznie w związku ze wzrostem objętości cytoplazmy. Ponadto wypływ sorbitolu jest hamowany przez inhibitory kalmoduliny. Jednakże obserwacje te nie są całkowicie spójne z uzyskanymi dla komórek PAP-HT25, w których wpływ jonoforu wapniowego, czy inhibitorów kalmoduliny na uwalnianie sorbitolu był poddany w wątpliwość [73, 75].

Podobnie jak w przypadku akumulacji GPC, obniżanie jego stężenia w komórkach rdzenia nerki odbywa się w sposób podkreślający znaczenie tego związku nie tylko jako osmolitu komaptybilnego, ale także znoszącego toksyczny wpływ mocznika. Jeżeli komórki PAP-HT25 adaptowane do wysokiego stężenia NaCl zostaną poddane działaniu obniżonej osmotyczności następuje wzrost aktywności GPC-fosfodiesterazy i GPC ulega hydrolizie. W przypadku komórek adaptowanych do wysokiego stężenia NaCl i mocznika obniżenie osmotyczności nie przywraca natychmiast aktywności GPC-fosfodiesterazy i osmolit ten jest usuwany z komórki w postaci niezmienionej [33, 56]. Szybkość wypływu GPC z komórek PAP-HT25 jest znacznie niższa niż pozostałych osmolitów, a proces ten podobnie jak w przypadku sorbitolu, mioinozytolu czy betainy zachodzi w ciągu pierwszych minut po obniżeniu osmotyczności środowiska [33]. W przeciwieństwie do tego, wypływ GPC z komórek izolowanych kanalików rdzenia nerki szczura odbywa się ze stałą szybkością w ciągu 2 godzin [14].

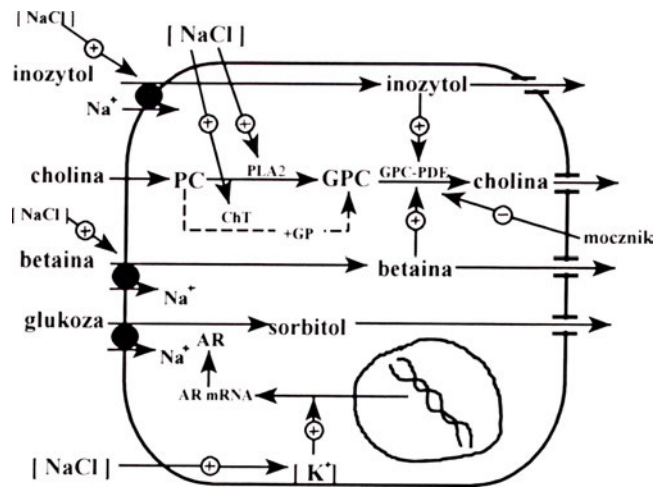
Intensywność uwalniania osmolitów przez komórki izolowanych kanalików rdzenia nerki królika jest niejednakowa i wskazuje na istnienie wartości progowych osmotyczności, przy których uruchamiany jest mechanizm transportu. Sekwencyjność pozbywania się osmolitów przez komórki pozwala im na zachowanie rezerwy umożliwiającej przetrwanie w przypadku ponownego wzrostu osmotyczności, zanim zostaną uruchomione mechanizmy akumulacji osmolitów [13].

Niezależnie od mechanizmów odpowiedzialnych za nagromadzenie się i usuwanie organicznych osmolitów z komórek nerek, oraz mimo różnic między komórkami hodowanymi *in vitro*, a izolowanymi kanalikami nerkowymi, dynamika zmian stężenia osmolitów w cytoplazmie jest bardzo podobna dla każdego z tych związków i daje się ująć w stwierdzeniu, że aktywacja procesów akumulacji osmolitów jest powolna, a stężenie każdego z nich osiaga maksimum po

kilku dniach trwania stresu hiperosmotycznego, natomiast usuwanie tych związków na skutek spadku osmotyczności środowiska jest natychmiastowe, chociaż aparat enzymatyczny lub system przenośników błonowych zaangażowane w procesy akumulacji osmolitów pozostają aktywne przez dłuższy czas. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, że warunki normy dla komórek rdzenia nerki *in vivo* oznaczają stan, w którym osmotyczność zarówno moczu w części rdzeniowej nerki, jak i osmotyczność płynów śródtkankowych jest znacznie wyższa niż osocza, a zatem komórki te są stale pod presją osmotyczną i muszą utrzymywać wysokie stężenie osmolitów. Dla komórek tych odstępstwem od normy nie jest wzrost osmotyczności na skutek antydiurezy, a raczej stan nadmiernej diurezy osiągniany doświadczalnie przez podanie furosemidu lub wazopresyny, albo będący następstwem patologii. Dlatego dla przeżycia tych komórek jest istotna zdolność do natychmiastowego reagowania na spadek osmotyczności środowiska, a jednocześnie stała gotowość do funkcjonowania w warunkach normy. Dopiero patologicznie wydłużony czas trwania stanu diurezy prowadzi do spadku wewnątrzkomórkowej aktywności systemu nagromadzenia osmolitów np. reduktazy aldozowej czy transportera betainy.

V. Podsumowanie

Hipoteza kompatybilnych osmolitów wyjaśnia szereg zjawisk związanych ze zdolnością komórek rdzenia nerki do przeżywania w warunkach wysokiej osmotyczności. Opiera się ona na obserwacji, że istnieją związki organiczne, stosunkowo obojętne dla komórek, które mogą nagromadzać się w cytoplazmie w znacznych stężeniach, a tym samym zapobiegać tworzeniu się ciśnienia osmotycznego w poprzek błony komórkowej i w konsekwencji patologicznemu wzrostowi stężenia elektrolitów. Hipoteza ta głosi, że suma stężeń wszystkich osmolitów w warunkach nie zmieniającej się osmotyczności środowiska jest stała, a zatem istnieje mechanizm pozwalający na dostosowanie stężenia każdego z osmolitów do rzeczywistego poziomu pozostałych. Przykładem tego jest wzmocnienie akumulacji betainy w wyniku zahamowania aktywności reduktazy aldozowej i spadku stężenia sorbitolu w komórkach lub odwrotnie obniżenie zawartości GPC w komórkach MDCK poddanych działaniu wysokiego stężenia NaCl w warunkach nadmiernej akumulacji betainy. Sednem tego mechanizmu są prawdopodobnie zmiany stężenia jonów potasu i sodu w cytosolu. Wzrost jest sygnałem aktywującym dla systemu adaptacji komórek do wysokiej osmotyczności prowadzącym do akumulacji osmolitów tak długo, aż nastąpi pełna kompensacja. Dodatkowym elementem w adaptacji komórek nerki do wysokiej osmotyczności jest ich zdolność do gromadzenia metyloamin i ochrony przed działaniem wysokiego stężenia mocznika. Zastanawiająca jest jednak preferencyjna aku-



Ryc. 3. Hipotetyczny schemat procesów adaptacyjnych zachodzących w komórkach rdzenia nerki podczas szoku hiperosmotycznego, uwzględniający dotychczas poznane lub postulowane mechanizmy regulacji nagromadzenia osmolitów, sporządzony na podstawie badań z wykorzystaniem komórek nerkowych linii MDCK i PAP-HT25

AR — reduktaza aldozowa
 ChT — cholinotransferaza PC:GP
 GP — glicero-3-fosforan
 GPC — glicerofosfocholina
 GPC-PDE — fosfodiesteraza glicerofosfocholiny
 PC — fosfatydylocholina
 PLA2 — fosfolipaza A2

mulacja GPC, a nie betainy jako protekcyjnego osmolitu w warunkach wysokiego stężenia mocznika, a tym bardziej hamujący wpływ mocznika na pobieranie betainy. Przyczyna tego odstępstwa nie jest znana.

Podsumowanie stanu dzisiejszej wiedzy o sposobach regulacji stężenia kompatybilnych, organicznych osmolitów w komórkach nerek adaptujących się do rosnącej lub malejącej osmotyczności środowiska przedstawia (Ryc. 3).

Artykuł otrzymano 17 stycznia 1996 r.
 Zaakceptowano do druku 9 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Heinz Penzrien (1989) Lehrbuch der Tier Physiologie Gustaf Fisher Verlag, Stuttgart, New York, str 348-367
2. Jamison R L, Kriz W (1992) Urinary Concentrating Mechanism. Structure and Function. Oxford UK, Oxford Univ Press
3. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero G N (1992) *Science* **217**: 1214-1222
4. Brown AD, Simpson JR (1972) *J Gen Microbiol* **72**: 589-591
5. Brown AD (1974) *Bacterial Rev* **40**: 803-807
6. Borowitzka LJ, Brown AD (1974) *Arch Microbiol* **96**: 37-40
7. Yancey PH (1985) W: Gilles-Baillien M (red) Transport Processes, Iono- and Osmoregulation. Berlin, Springer-Verlag, str 424-436
8. Somero G (1986) *Am J Physiol* **251**: 197-213
9. Yancey PH, Somero G N (1979) *Biochem J* **183**: 317-323
10. Bagnasco S, Balaban R, Fales H, Yang Y-M, Burg M (1986) *J Biol Chem* **261**: 5872-5877
11. Yancey PH, Burg M (1989) *Am J Physiol* **257**: 602-607
12. Beck F, Dorge A, Rick R, Thurau K (1984) *Kidney Int* **25**: 397-403
13. Grunewald R W, Kine R K H (1989) *Pflugers Arch* **414**: 178-184

14. Wirthensohn G, LeFrank S, Schmolke M, Guder WG (1989) *Am J Physiol* **256**: 128-135
15. Blumenfeld J, Herbrt S, Heilig C, Balschi J, Stromski M, Gullans S (1989) *Am J Physiol* **256**: 916-922
16. Schmolke M, Beck F, Guder W (1989) *Am J Physiol* **257**: 732-737
17. Yancey PH (1988) **158**: 369-380
18. Wirthensohn G, Guder WG (1987) *Pflügers Arch* **409**: 411-415
19. Bauernschmitt HG, Kinne RK H (1993) *Biochim Biophys Acta* **1148**: 331-341
20. Bauernschmitt HG, Kinne RK H (1993) *Biochim Biophys Acta* **1150**: 25-34
21. Balaban RS, Burg MB (1987) *Kidney Int* **31**: 562-564
22. Nakanishi T, Balaban RS, Burg MB (1989) *Am J Physiol* **257**: 964-970
23. Eisenberg F (1967) *J Biol Chem* **242**: 1375-1382
24. Sherman WRL, Munsell Y, Gish BG, Honchar MP (1985) *J Neurochem* **44**: 798-807
25. Howard CF, Anderson L (1967) *Arch Biochem Biophys* **118**: 332-339
26. Hammerman MR, Sacktor B, Daughaday WH (1980) *Am J Physiol* **239**: 113-120
27. Hotta N, Kakuta H, Fukasawa H, Kimura M, Koh N, Matsumae H, Fujimaki M, Sakamoto N (1988) *Horm Metab Res* **20**: 387-390
28. Heilig CW, Brenner RM, YU ASL, Kone BC (1990) *Am J Physiol* **259**: 653-659
29. Nakanishi T, Balaban RS, Burg MB (1988) *Am J Physiol* **255**: 181-191
30. Nakanishi T, Turner RJ, Burg MB (1989) *Proc Natl Acad Sci* **86**: 6002-6006
31. Moriyama T, Garcia-Perez A, Burg MB (1990) *Am J Physiol* **259**: 847-858
32. Yamauchi A, Kwon HM, Uchida S, Preston AP, Handler JS (1991) *Am J Physiol* **261**: F197-F202
33. Nakanishi T, Turner RJ, Burg MB (1990) *Am J Physiol* **258**: 1061-1067
34. Veis J, Molitoris B, Teitelbaum I, Mansour J, Berl T (1991) *Am J Physiol* **260**: 619-625
35. Kwon HM, Yamauchi A, Uchida S, Robey RB, Garcia-Perez A, Burg MB, Handler JS (1991) *Am J Physiol* **260**: 258-303
36. Koivula T, Koivulosalo M (1975) *Biochim Biophys Acta* **397**: 9-23
37. Skiba WE, Wells MS, Mangum JH, Awad WH Jr (1987) W: Colocwick SP, Kaplan NO (red) *Meth Enzymol* **143**: 384-388
38. Grossman EB, Hebert SC (1989) *Am J Physiol* **256**: F107-F112
39. Sung CP, Johnstone RM (1969) *Biochim Biophys Acta* **173**: 548-543
40. Robey R, Kwon M, Handler J, Garcia-Perez A, Burg M (1991) *J Biol Chem* **266**: 10400-10405
41. Jones DP, Miller LA, Chesney RW (1990) *Kidney Int* **38**: 219-226
42. Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 8230-8234
43. Uchida S, Kwon M, Preston A, Handler J (1991) *J Biol Chem* **266**: 9605-9609
44. Burg MB (1988) *Kidney Int* **33**: 635-641
45. Kern TS, Engerman ARL (1982) *Histochem J* **14**: 507-515
46. Garcia-Perez A, Martin B, Murphy HR, Uchida S, Murer H, Cowley BD, Handler JS, Burg MB (1989) *J Biol Chem* **264**: 16815-16821
47. Jeffery J, Jörnvall H (1988) *Adv Enzymol* **61**: 47-106
48. Burg MB, Kador EF (1988) *J Clin Invest* **81**: 635-640
49. Uchida S, Garcia-Perez A, Murphy H, Burg MB (1989) *Am J Physiol* **256**: C614-C620
50. Bagnasco S, Uchida S, Balaban R, Kador P, Burg M (1987) *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 1718-1720
51. Bagnasco SM, Helen HR, Bedford JJ, Burg MB (1988) *Am J Physiol* **254**: C788-C792
52. Smardo FM Jr, Burg MB, Garcia-Perez A (1990) *FASEB J* **4**: A2096
53. Moriyama T, Garcia-Perez A, Burg MB (1989) *J Biol Chem* **264**: 16810-16814
54. Boulanger Y, Legault P, Tejedor A, Vinay P, Theriault Y (1988) *Can J Physiol Pharmacol* **66**: 1282-1290
55. Cowley BD Jr, Ferraris JD, Carper D, Burg MB (1990) *Am J Physiol* **258**: F145-F161
56. Nakanishi T, Burg MB (1989) *Am J Physiol* **257**: C795-C801
57. Infante JP (1985) *FEBS Lett* **186**: 205-210
58. Infante JP (1984) *FEBS Lett* **170**: 1-14
59. Infante JP (1987) *FEBS Lett* **214**: 149-152
60. Baldwin JJ, Cornatzer WE (1968) *Biochim Biophys Acta* **164**: 195-204
61. Guder WG, Beck FX, Schmolke M (1990) *Klin Wochenschr* **68**: 1091-1095
62. Sizeland PCB, Chambers ST, Leeve M, Bason LM, Robson RA (1993) *Kidney Int* **43**: 448-453
63. Ullrich KJ (1959) *Biochem Z* **331**: 98-102
64. Moriyama T, Garcia-Perez A, Burg MB (1990) *Am J Physiol* **259**: F847-F858
65. Zabłocki K, Miller SPF, Garcia-Perez A, Burg MB (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7820-7824
66. Kwon ED, Jung KY, Edsall LC, Kim H-Y, Garcia-Perez A, Burg MB (1995) *Am J Physiol* **268**: C402-C412
67. Kwon ED, Zabłocki K, Jung K, Peters E, Garcia-Perez A, Burg MB (1995) *Am J Physiol* **269**: C35-C41
68. Zabłocki K (1995) *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 1055-1063
69. Kwon ED, Zabłocki K, Peters EM, Jung KY, Garcia-Perez A, Burg MB (1996) *Am J Physiol* w druku
70. Zabłocki K, Więckowski MR (1996) praca zgłoszona
71. Atherton JC, Hai MA, Thomas S (1968) *J Physiol* **197**: 429-443
72. Nakanishi T, Burg MB (1989) *Am J Physiol* **257**: C964-C970
73. Siebens A, Spring K (1989) *Am J Physiol* **257**: F937-F946
74. Garty H, Furlong TJ, Ellis DE, Spring KR (1991) *Am J Physiol* **260**: F650-F656
75. Furlong TJ, Moriyama T, Spring KR (1991) *J Membr Biol* **123**: 269-277
76. Bevan C, Theiss C, Kinne RK H (1990) *Biochim Biophys Res Commun* **170**: 563-568



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”.

Homeostaza jonów magnezu w komórkach zwierzęcych

Magnesium ions homeostasis in animal cells

KRYSTYNA BOGUĆKA*

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Właściwości chemiczne magnezu oraz wypływające z nich implikacje
- III. Transport Mg^{2+} przez błony komórkowe
 - III-1. Wymiana $Na^+ - Mg^{2+}$
 - III-2. ATPazy transportujące Mg^{2+}
- IV. Regulacja hormonalna przepływów Mg^{2+} w komórce
 - IV-1. Regulacja procesu ekstruzji Mg^{2+} z komórki
 - IV-2. Regulacja procesu pobierania Mg^{2+} przez komórki
 - IV-3. Hipoteza homeostazy jonów Mg^{2+} w hepatocytach i miocytach
- V. Uwagi końcowe

I. Wprowadzenie

Magnez obok potasu jest jednym z kationów najliczniej występujących w komórkach. Jest on niezbędny do prawidłowego przebiegu podstawowych funkcji komórki. Aktywuje bowiem znaczną liczbę enzymów pośrednio lub przez tworzenie kompleksów z substratami, utrzymuje prawidłową konformację kwasów nukleinowych i białek, reguluje mechanizmy operowania kanałów i receptorów, oksydacyjną fosforylację, skurcz mięśni oraz pobudzanie komórek nerwowych. Jest także niezbędny dla wzrostu komórek oraz kontrolowania cyklu komórkowego. Odgrywa istotną rolę w aktywności pomp Na^+ i Ca^{2+} . Stanowi zatem ważne ogniwo łączące transport jonów i metabolizm. Tabelę zawierającą najważniejsze enzymy, kanały i receptory modulowane przez jony magnezu znajdzie czytelnik w obszernym artykule przeglądowym Romaniego i Scarpy [1]. Tabela zawiera odnośniki do prac oryginalnych. Obecnie może zdumiewać, jak mało wiadomo o homeostazie tego kationu w komórce i jej regulacji. Dane zawarte w piśmiennictwie są w znacznej mierze fragmentaryczne. Często oparte na badaniach wysoce wyspecjalizowanych komórek nerwowych, mięśniowych lub zbyt prostych, bo posiadają-

Contents:

- I. Introduction
- II. Chemical properties of magnesium and implications
- III. Plasma membranes magnesium transport
 - III-1. $Na^+ - Mg^{2+}$ exchange
 - III-2. Mg transporting ATPases
- IV. Hormonal regulation of Mg^{2+} fluxes
 - IV-1. Regulation of Mg^{2+} efflux
 - IV-2. Regulation of Mg^{2+} influx
 - IV-3. Hypothesis of Mg^{2+} homeostasis in hepatocytes and miocytes
- V. Concluding remarks

cych jeden kompartment komórek, jakimi są erytrocyty. Główną przyczyną tak znacznego opóźnienia badań (w stosunku do badań homeostazy Ca^{2+}) nad homeostazą jonów Mg^{2+} dotychczas był brak precyzyjnych metod pomiaru zjonizowanego Mg^{2+} w komórce. Stosowana metoda absorpcji atomowej, precyzyjna i wygodna do oznaczania całkowitego stężenia Mg, nie pozwala na śledzenie przepływów tego kationu między poszczególnymi kompartmentami komórki. Stosowanie w badaniach izotopu promieniotwórczego $^{28}Mg^{2+}$ jest utrudnione przez krótki okres jego trwania. Pojawienie się sond fluorescencyjnych typu Fura — mag-fura 2 oraz mag-fura 5, specyficznych dla Mg^{2+} spowodowało wzmożone zainteresowanie tym problemem w ostatnich latach i zaowocowało znaczną liczbą publikacji.

II. Właściwości chemiczne magnezu oraz wpływające z nich implikacje

Jon magnezowy pozbawiony powłoki hydratacyjnej jest mały. Jest on obdarzony znaczną gęstością ładunku na powierzchni. W komórce, jak i w roztworach wodnych, występuje w postaci wysoce uwodnionego kationu (stabilnego hydratu) $Mg(H_2O)_6^{2+}$ o dużym promieniu cząsteczki. Jon ten jest około 400 razy większy od jonu nieuwodnionego (dla porównania kationy Ca^{2+} , Na^+ i K^+ tylko 35 razy) [2]. Cząsteczki wody tego hydratu wymieniają się wolno z cząstecz-

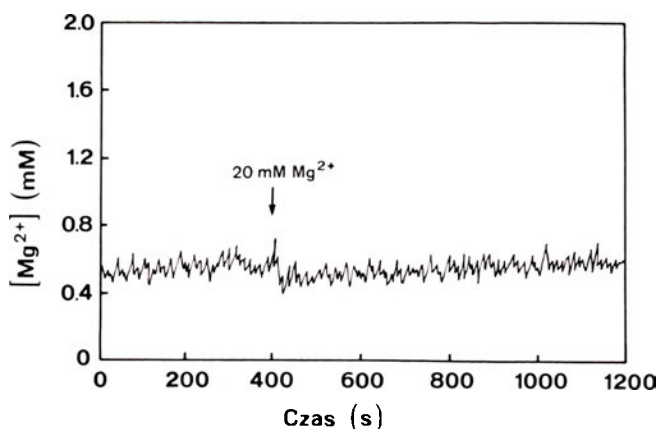
* Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

kami głębi fazy wodnej. Szybkość tej wymiany jest o trzy rzędy wielkości mniejsza od szybkości wymiany powłok hydratacyjnych jonów Ca^{2+} , Na^+ i K^+ . Tak wielki jon może przechodzić swobodnie jedynie przez megakanal w błonie mitochondrialnej, średnica którego wynosi 2-3 nm. Przejście przez inne kanały znanych typów lub wiązanie się z cząsteczkami nośnika, wymagałoby wymiany lub pozbycia się co najmniej części powłoki hydratacyjnej przed wejściem do kanału lub przed wiązaniem się z grupami chemicznymi nośnika (2). Aczkolwiek proces wymiany cząsteczek wody zachodzi szybciej w kanale niż w roztworze wodnym, to jednak usuwanie cząsteczek wody z powłoki hydratacyjnej Mg^{2+} jest znacznie wolniejsze od jej usuwania z powłok hydratacyjnych wymienionych kationów. Jest to głównym czynnikiem ograniczającym zdolność Mg^{2+} do reagowania z błonowymi systemami transportowymi znanego typu. Wolne przepływy magnezu w komórce mogą stwarzać zasadnicze trudności w różnieniu między „kanałowym” a „nośnikowym” zachowaniem transportu tego kationu. Transporter Mg^{2+} powinien zatem mieć niezwykle właściwości, odmienne od właściwości znanych transporterów kationów. Powinien rozpoznawać i koordynować wiązanie uwodnionego jonu o długości promienia siedmiokrotnie przewyższającej długość promienia jonu nieuwodnionego oraz być przystosowanym do wolnego wiązania ligandów podczas transportu. Pierwsze wiążące jon magnezowy miejsce na takim hipotetycznym transporterze powinno być większe i obdarzone znacznie większym ładunkiem od odpowiedniego miejsca dla jonu Ca^{2+} na jego transporterze. Natomiast średnica pory może być mniejsza. Zważywszy wymienione właściwości jonu magnezowego, a zwłaszcza wolny przebieg hydratacji i dehydratacji, staje się zrozumiałe, że kation ten nie mógł być postrzegany jako „szybki” (short term) regulator, jakim niewątpliwie jest jon Ca^{2+} , który może oscylować, wiązać się z białkami oraz modyfikować specyficzne białka. Grubbs i Maguire [3] zaproponowali dla Mg^{2+} nazwę „chroniczny regulator” (long term). Mnogość procesów regulowanych przez Mg^{2+} prowadzi do wniosku, że stężenie wolnego kationu w cytosolu oraz w organellach komórki powinno się zmieniać. Należy zatem oczekiwać przepływów Mg^{2+} między organelami a cytosolem oraz między cytosolem a środowiskiem pozakomórkowym. Stężenie wolnego Mg^{2+} w cytosolu wynosi 0.2-1.0 mM (5-10) w zależności od rodzaju komórki. Stanowi to około 10% całkowitego Mg w komórce. Z równowagi elektrochemicznej, jaka istnieje między 1.0 mM stężeniem Mg^{2+} w środowisku pozakomórkowym a stężeniem jego w cytosolu, przy potencjale na błonie plazmatycznej wynoszącym 40-80 mV, wynika, że stężenie zjonizowanego Mg^{2+} powinno wynosić 20-180 mM. Zatem obok układów buforowych o dużej pojemności powinien operować w komórce wydajny mechanizm ekstruzji Mg^{2+} skierowany przeciwko jego elektrochemicznemu gradien-

towi. W piśmiennictwie ostatnich lat przybywa danych, że komórka podobnie, jak w przypadku jonów Ca^{2+} , dysponuje także łatwymi do uruchamiania rezerwuarami Mg^{2+} [4, 10-16]. Obecnie pojawiają się nawet doniesienia o szybkiej mobilizacji Mg^{2+} w cytosolu w odpowiedzi na stymulację receptorów. Na przykład wyniki doświadczeń opublikowanych przez Ishijamę i Tatabanę [4] nad stymulacją pojedynczych komórek transformowanych fibroblastów Swiss 3T3 przez mitogen bombesynę wskazują, że mobilizacja Mg^{2+} w komórce przebiega szybciej niż mobilizacja Ca^{2+} . Potwierdzenie regulacyjnej roli Mg w komórce wymaga wykazania, że: a) w błonie plazmatycznej istnieją transportery Mg^{2+} zdolne do zwiększania i obniżania stężenia wolnego Mg^{2+} w cytosolu; b) w komórce działają mechanizmy akumulacji i usuwania Mg^{2+} przez kompartmenty subkomórkowe; c) zachodzące na skutek tego zmiany stężenia Mg^{2+} mogą mieć znaczący wpływ na aktywność enzymów, kanałów etc.

III. Transport Mg przez błony komórkowe

Inkubowanie komórek przez dłuższy czas w środowisku zawierającym wysokie stężenie Mg^{2+} lub jego chelatory nie wpływa w sposób znaczący na stężenie kationu w cytosolu komórki. Na rycinie 1 [11] przedstawiono doświadczenie, w którym komórki BC3H-1 inkubowano w środowisku o wysokim stężeniu Mg^{2+} . Stężenie Mg w cytosolu mierzono przy pomocy sondy fluorescencyjnej mag-fura-2. Jak widać z danych ryciny 1, podczas siedmiominutowej inkubacji komórek w 0.8 mM Mg^{2+} nie zmienia się jego stężenie w cytosolu. Po dodaniu 30 mM Mg^{2+} do środowiska inkubacyjnego i dalszej około 14 minutowej inkubacji, stężenie Mg^{2+} w cytosolu nieznacznie wzrasta. Doświadczenia z zastosowaniem izotopu $^{28}\text{Mg}^{2+}$ wskazują także na bardzo wolny przepływ kationu przez błonę plazmatyczną [17]. Tego rodzaju obserwacje mogą sugerować, że błony plazmatyczne nie zawierają specyficznych transporterów Mg^{2+} , a wolny przepływ Mg^{2+} przez błonę komórkową jest związany ze specy-



Ryc. 1. Wpływ Mg^{2+} pozakomórkowego na jego stężenie w cytosolu komórek BC₃H-1 naładowanych mag-fura-2

ficznymi właściwościami kationu omówionymi wyżej oraz właściwościami błony.

III-1. Wymiana Na^+ - Mg^{2+}

Badania aksonów kałamarnicy, mięśni kraba, synapsosomów oraz erytrocytów różnych gatunków zwierząt wskazują, że w błonach komórkowych operuje zależny od jonów Na^+ mechanizm ekstruzji Mg^{2+} , który jest prawdopodobnie pierwotnym systemem transportu Mg^{2+} służącym do zachowania jego równowagi elektrochemicznej. Ekstruzja jonów Mg^{2+} z aksonów jest w 95% hamowana przez zubożenie ich w ATP oraz w 75% przez usuwanie jonów Na^+ ze środowiska pozakomórkowego. Zmiany potencjału błonowego nie wpływają na usuwanie Mg^{2+} . Pełna depolaryzacja błony plazmatycznej wywołana przez inkubację aksonów w środowisku o wysokim stężeniu jonów K^+ lub przez zastosowanie „voltage clamp” [18] nie wpływa na transport jonów Mg^{2+} . Dane te świadczą o funkcjonowaniu w komórkach elektro-neutralnej wymiany Na^+ - Mg^{2+} odpowiedzialnej za ekstruzję jonu Mg^{2+} przeciwko jego elektrochemicznemu gradientowi [19, 20]. Aktywny transport przez błonę może być zasilany energią ATP lub energią zmagazynowaną w gradiencie jonu kotransportowanego. Transport Mg^{2+} zależny od jonów Na^+ wymaga obecności ATP. Pochodna ATP adenozylo 5,0-(3 tiofosforan), która może być substratem kinaz, nie będąc substratem ATPaz, aktywuje także ekstruzję jonów Mg^{2+} . Oznacza to, że aktywacja transportu Mg^{2+} przez ATP polega na fosforylowaniu transportera, które może zmieniać jego powinowactwo do związanego jonu. Alternatywnym źródłem energii zasilającym transport Mg^{2+} może być gradient jonów Na^+ powstały na skutek napływu tego kationu do cytosolu zgodnie z jego gradientem stężeń. Odwrócenie gradientu Na^+ w aksonach wywołane doświadczalnie, powoduje pobieranie jonów Mg^{2+} przez komórkę zależne od stężenia Na^+ w cytosolu [21] oraz ekstruzję jonów Na^+ zależną od stężenia jonów Mg^{2+} w środowisku pozakomórkowym [22]. Istnieje zatem zależność stężenia jonów Mg^{2+} od Na^+ . Przepływy jonów Mg^{2+} mogą być modulowane przez stężenia jonów Na^+ po obu stronach błony plazmatycznej. Stwierdzenie ekstruzji jonów Na^+ towarzyszącej transportowi Mg^{2+} jest ważne. Stanowi bowiem dowód na istnienie mechanizmu antyportu Na^+ - Mg^{2+} w błonie plazmatycznej.

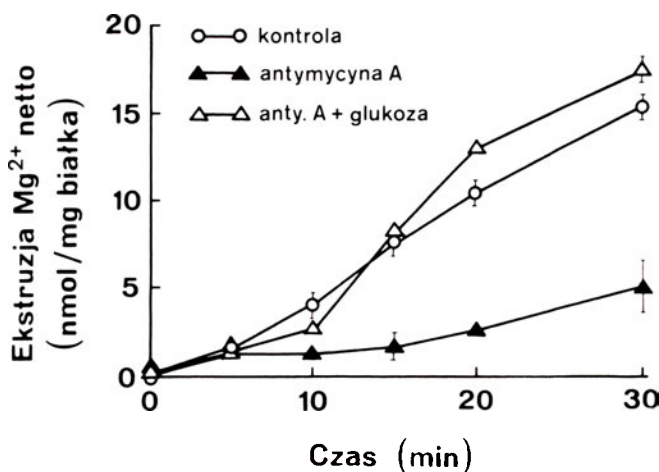
Transport Mg^{2+} zależny od jonów Na^+ w komórkach innych zwierząt niższych (na przykład mięśni kraba) wykazuje znaczne podobieństwo do opisanego. Manipulowanie stężeniami Mg^{2+} w cytosolu oraz w środowisku pozakomórkowym powoduje podobne jak w przypadku aksonów zachowanie transportu jonów Mg^{2+} . Nie ulega wątpliwości, że pierwotnym mechanizmem pozwalającym na zachowanie stężenia Mg^{2+} zjonozowanego w cytosolu poniżej równowagi

elektrochemicznej jest wymiana Na^+ - Mg^{2+} . Jednakże w komórkach organizmów wyższych, jak miocyty mięśnia sercowego lub hepatocyty, mechanizm ten jest bardziej skomplikowany, a udział w nim wymiany Na^+ - Mg^{2+} nie jest oczywisty.

W komórkach posiadających receptory stymulowane przez hormony wymiana Na^+ - Mg^{2+} może stanowić część bardziej złożonego mechanizmu. Na przykład w erytrocytach [21] ekstruzja Mg^{2+} zachodzi z udziałem dwóch mechanizmów — zależnego i niezależnego od jonów Na^+ . Mechanizm niezależny odgrywa rolę nadrzędną [19, 23]. Natomiast istnienie mechanizmu wymiany Na^+ - Mg^{2+} w miocytach serca wzbudza kontrowersje [20].

Badania przepływów jonów Mg^{2+} w komórkach nowotworowych zasługują na szczególną uwagę ponieważ jon ten bierze udział w regulacji proliferacji komórek oraz metabolizmu energetycznego, które w komórkach neoplastycznych ulegają deformacji. Badania na komórkach raka wosłkowego Ehrlicha prowadzone przez grupę C i t t a d i n i e g o [8] wskazują, że głównym mechanizmem ekstruzji Mg^{2+} w tych komórkach jest wymiana Na^+ - Mg^{2+} . Jest ona niezależna od obecności jonów Ca^{2+} w środowisku pozakomórkowym. Obecność w środowisku jonów Mg^{2+} nie wpływa na jej przebieg. Wymiana ta jest hamowana przez oubainę, amyloryd, imipraminę oraz chindynę. Inhibitory oddechowe, jak rotenon i antimycyna oraz czynniki rozprzegające oksydacyjną fosforylację powodują także zahamowanie ekstruzji Mg^{2+} zależnej od jonów Na^+ . Aktywowanie glikolizy przez glukozę w tych warunkach przywraca komórkom zdolność do ekstruzji Mg^{2+} . Prawdopodobnie przez dostarczenie ATP do podtrzymania gradientu jonów Na^+ oraz być może przez aktywowanie antyportera Na^+ - Mg^{2+} drogą jego fosforylowania.

Jak widać z danych przedstawionych na rycinie 2 ekstruzja Mg^{2+} w obecności glukozy przebiega nawet szybciej i jest bardziej wydajna niż w doświadczeniu kontrolnym. Sugeruje to, że hamowanie od-



Ryc. 2. Ekstruzja Mg^{2+} z komórek raka wosłkowego Ehrlicha zawieszonych w środowisku Na-K w temperaturze 30. Wpływ antymycyny A (2 $\mu\text{g/ml}$) oraz antymycyny + glukozy (10 mM). Antymycyna A hamuje ekstruzję Mg^{2+} z komórek. Dodanie glukozy przywraca ekstruzję.

dychania może powodować usuwanie Mg^{2+} z puli mitochondrialnej do cytosolu i zwiększyć tym sposobem jego pulę ulegającą ekstruzji. Mechanizm wymiany Na^+-Mg^{2+} w komórkach raka Ehrlicha może działać w kierunku odwrotnym. Przeniesienie perfundowanych w środowisku Na^+ komórek do środowiska sacharozy nie zawierającego jonów Na^+ powoduje pobieranie jonów Mg^{2+} przez komórki.

Oprócz opisanej wymiany Na^+-Mg^{2+} w komórkach raka Ehrlicha zachodzi usuwanie jonów Mg^{2+} z udziałem mechanizmu niezależnego od ATP i gradientu Na^+ . Podobny transport jonów Mg^{2+} był opisany w erytrocytach jako sprzężony z jonami $Cl^- - Mg^{2+} / Cl$ [7].

Wymiana Na^+-Mg^{2+} jest także podstawowym mechanizmem regulującym stężenie wolnego Mg^{2+} w cytosolu komórek gruczołów podjęzykowych. Wyniki opublikowanej niedawno pracy Zhanga i Melvina [5] wskazują, że ekstruzja Mg^{2+} z komórek tych gruczołów naładowanych uprzednio jonami Mg^{2+} o stężeniu trzykrotnie przekraczającym fizjologiczne, zachodzi ze znaczną szybkością do czasu osiągnięcia stężenia fizjologicznego w cytosolu. Następnie usuwanie jonów Mg^{2+} niemal ustaje.

Podobne obserwacje poczynili Gunther i wsp. [24]. Można zatem przypuszczać, że przekroczenie poziomu fizjologicznego stężenia wolnego Mg^{2+} w cytosolu jest sygnałem do uruchamiania mechanizmu ekstruzji. Taka regulacja usuwania jonów Mg^{2+} może zapobiec zarówno „przeładowaniu” magnezem komórki, jak i jego niedoborowi.

III-2. ATPazy transportujące Mg^{2+}

Obserwowany przez wielu autorów wzrost stężenia wolnego Mg^{2+} w cytosolu spowodowany zubożeniem komórki w ATP [19] skłania także do poszukiwań ATPaz transportujących jony Mg. Główne utrudnienie w tych badaniach stanowi brak specyficznych inhibitorów. Inhibitory znanych typów ATPaz pozostają bez wpływu na stężenie Mg^{2+} w komórce.

Obiecującym podejściem doświadczalnym jest genetyka molekularna. Grupie badaczy kierowanej przez Maguire'a udało się zidentyfikować trzy transportery białkowe magnezu w bakterii *Salmonella typhimurium* [25, 26]. Uzyskano szczepy mutantów zawierające tylko jeden z transporterów i podjęto próbę ich scharakteryzowania. Okazało się, że jedno z białek transportowych bierze udział zarówno w transporcie Mg^{2+} do komórki, jak i w jego ekstruzji. Dwa pozostałe transportują jony Mg^{2+} do komórki. Pokazano sekwencję nukleotydów segmentu DNA zawierającego gen *mgtB*. Sekwencja ta zawiera dwie ramki odczytu. Jedna z nich koduje białko o 101 kDa (*MgtB*) transportujące Mg^{2+} do komórki. Należy ono do rodziny ATPaz typu P transportujących kationy. Do rodziny tej są zaliczane między innymi Na^+ , K^+ -ATPazy oraz Ca^{2+} -ATPazy eukariotów.

Wstępna analiza sekwencji aminokwasów tego białka wskazuje, że ATPaza ta charakteryzuje się znacznym podobieństwem do ATPazy sarkoplazmatycznego reticulum — znacznie większym niż do znanych ATPaz typu P prokariotów.

Niektórzy badacze sugerują, że funkcje transporterów jonów Mg^{2+} w komórce mogłyby spełniać ekto-ATPazy znalezione w drożdżach, w komórkach nerwowych a także w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha (27-29).

IV. Regulacja hormonalna przepływów jonów Mg w komórce

IV-1. Regulacja procesu ekstruzji Mg^{2+} z komórki

Romani i Scarpa [1, 30-32] wykazali, że dodanie norepinefryny-agonisty receptora β -adrenergicznego w miocytach i hepatocytach wywołuje usuwanie jonów Mg^{2+} z komórki. Propranolol—antagonista tego receptora hamuje całkowicie ekstruzję Mg^{2+} wywołaną przez norepinefrynę. Podobny do norepinefryny efekt wywołują aktywator cyklicznej adenylowej forskolina oraz analogi cyklicznego AMP penetrujące błonę plazmatyczną. Co więcej autorzy ci obserwowali, że czynniki hamujące aktywność cyklicznej adenylowej będące agonistami receptora muskarynowego karbachol i wazopresyna wywołują wzrost stężenia jonów Mg^{2+} w cytosolu. Oznacza to, że ekstruzja i pobieranie Mg^{2+} w miocytach i hepatocytach są regulowane przez AMP oraz na drodze kinazy białkowej C poprzez stymulację receptora β -adrenergicznego i muskarynowego. Podobną stymulację usuwania Mg^{2+} przez pochodną cAMP dwubutyrylo-cAMP penetrującą błonę plazmatyczną obserwowali w tymocytach Gunther i Vormann [7] oraz Wolf i wsp. w komórkach raka wysiękowego Ehrlicha [8].

Romani i wsp. [35] wykazali także, że stymulowanie „uprzepuszczalnych” digitoniną hepatocytów przez cAMP wywołuje usuwanie Mg^{2+} do środowiska pozakomórkowego. Podobny efekt wywołuje ADP. Usuwanie Mg^{2+} jest całkowicie hamowane przez inhibitory translokazy nukleotydów adeninowych ataktylozyd, karboksyatraktylozyd i kwas bongkrekowy. Dodanie cAMP oraz ADP do izolowanych mitochondriów również wywołuje ekstruzję jonów Mg^{2+} do środowiska. Towarzyszy temu usuwanie ATP. Efekt cAMP jest specyficzny. Inne cykliczne i niecykliczne nukleotydy nie wpływają na ekstruzję Mg^{2+} z mitochondriów.

Przytoczone obserwacje sugerują, że cAMP może być przekaźnikiem w procesie mobilizacji Mg^{2+} w komórce, a głównym źródłem Mg^{2+} przez niego uruchamianym są mitochondria. Oznacza to, że cAMP powinien powodować wzrost stężenia wolnego Mg^{2+} w cytosolu. Tymczasem Gunther i Vormann [32] we wspomnianych już badaniach na tymocytach

stosując sondę fluorescencyjną mag-fura-2 nie stwierdzili wpływu dwubutyryl-cAMP na poziom wolnego Mg^{2+} w cytosolu komórek. Przyczyną tego może być obecność układów buforujących Mg^{2+} , o dużej pojemności. Na przykład ostatnio Gunther i wsp. wykazali, że głównym buforem Mg^{2+} w erytrocytach jest dwufosfoglicerol [33].

Zgodnie z hipotezą Romaniego i wsp. [35] usuwanie Mg^{2+} z mitochondriów aktywowane przez cAMP zachodzi z udziałem translokazy nukleotydów adeninowych, która pod wpływem cAMP może zmieniać mechanizm działania. Substratem zmienionego enzymu staje się kompleks $ATP \cdot Mg^{2+}$. Pozostaje to w sprzeczności z dobrze udokumentowanymi pracami Kligenberga [36, 37] zgodnie z którymi w procesie translokazy zachodzi wymiana cząsteczki wolnego ATP mitochondrialnego na cząsteczkę ADP z cytosolu. Proces translokacji jest elektrogeny. Romanio i wsp. [35] postulują elektroneutralność procesu translokacji, w którym ADP z cytosolu wymianie się z mitochondrialnym kompleksem $ATP \cdot Mg^{2+}$. Hipoteza zakłada fosforylowanie transportera z udziałem cAMP, pod wpływem którego transporter nukleotydów adeninowych mógłby zmieniać właściwości. Fosforylowanie transportera mogłoby zachodzić z udziałem specyficznych kinaz białkowych A fosforylujących specyficzne białka. Autorom tej hipotezy brakuje dowodów doświadczalnych na jej potwierdzenie. Doświadczenia zmierzające do wykazania fosforylowania transportera pozostają bez powodzenia. Co więcej, niedawno autorzy z tej samej grupy [34] pokazali, że efekt cAMP na ekstruzję Mg^{2+} z hepatocytów może być spowodowany wiązaniem się nukleotydu z translokazą, nie zaś jej fosforylowaniem. Doświadczenia z zastosowaniem światłoczułej azydkowej pochodnej cAMP wykazały, że cAMP wiąże się z oczyszczonym transporterem. Wyniki prac Romaniego i wsp. [1] wykluczają udział transportera $Mg^{2+} \cdot ATP/PO_4$ opisanego przez Aprille [38-41]. Transport ten bowiem nie jest hamowany przez inhibitory translokazy nukleotydów adeninowych. Z kolei zaś aktywność translokazy nie zależy od fosforanu.

Udział mitochondriów w regulowaniu poziomu stężenia wolnego Mg^{2+} w cytosolu nie budzi wątpliwości. Są one dużym kompartmentem subkomórkowym zawierającym Mg^{2+} [42, 43]. Większość mitochondrialnego Mg^{2+} znajduje się w matriks (41%) oraz w przestrzeni międzybłonowej (50%), w której znaleziono dwa miejsca wiązania Mg^{2+} o wysokim i niskim powinowactwie. Stężenie wolnego Mg^{2+} w matriks jest 0.35-0.8 mM [42-44]. Mitochondria mogą akumulować i usuwać Mg^{2+} w zależności od ich stanu metabolicznego i warunków doświadczenia. Na przykład usuwanie Mg^{2+} jest obserwowane podczas przejścia ze stanu spoczynkowego (wysokoenergetycznego) w stan aktywny oksydacyjnej fosforylacji [48]. Dane Corkey i wsp. [45] mogły wskazywać, że fluktuacje stężenia jonów Mg^{2+} w komórce są nie-

znaczne i nie mogą odgrywać znaczącej roli w regulowaniu metabolizmu. Komórki bowiem dysponują znaczną liczbą układów buforujących jony Mg^{2+} . Jednakże zgodnie z sugestią Bond i wsp. [52] dane o stężeniu Mg^{2+} prezentowane przez Corkey i wsp. były znacznie zaniżone.

IV-2. Regulacja pobierania jonów Mg^{2+} przez komórki

Stymulacja hepatocytów przez wazopresynę a mio-cytów przez karbachol wywołuje akumulację jonów Mg^{2+} w komórkach [51]. Stężenie pobranego Mg^{2+} stanowi około 10% stężenia całkowitego Mg w komórce będącej w stanie spoczynku. Podobnie jak stężenie jonów Mg^{2+} usuwanych z komórki podczas stymulacji receptora β -adrenergicznego. Oznacza to, że w komórkach stymulowanych stężenie Mg^{2+} obniża się lub wzrasta o 1.0 mM. Przepływ netto jonów Mg^{2+} przez błonę komórkową wynosi 0.2 nmole/min \cdot cm². Jest to jedna z najwyższych znanych wartości netto przepływów jonów zachodzących z udziałem znanych transporterów jonów w komórce. Dodanie do komórek stymulowanych przez norepinefrynę, w których zachodzi ekstruzja Mg^{2+} , octanu 12-0-tetradekanoilforbolu (TPA) aktywującego kinazę białkową C powoduje natychmiastowe pobieranie jonów Mg^{2+} do czasu osiągnięcia przez komórki stężenia „spoczynkowego”. Oznacza to, że stymulacja procesu przepływów jonów Mg^{2+} w komórkach jest odwracalna. Szybkość zmiany kierunku przepływów jonów Mg^{2+} w tej samej populacji komórek wskazuje na obecność aktywnych mechanizmów transportu reagujących na pobudzenie komórki przez stymulację receptorów błonowych.

Akumulacja i ekstruzja jonów Mg^{2+} w komórkach wymagają obecności jonów Ca^{2+} w środowisku pozakomórkowym. Implikuje to funkcjonowanie mechanizmu wymiany Mg^{2+} - Ca^{2+} podczas ekstruzji jonów Mg^{2+} wywołanej przez stymulację receptora β -adrenergicznego. Natomiast rola jonów Ca^{2+} w procesie pobierania jonów Mg^{2+} jest obecnie trudna do wyjaśnienia. Dyskutuje się możliwość, że stężenie wolnego Ca^{2+} w cytosolu może być ważnym czynnikiem w tym procesie [13, 14, 51]. Nie jest zatem wykluczone, że uruchomienie wewnątrzkomórkowych pul jonów Ca^{2+} zawartych w organellach odgrywa istotną rolę w procesie pobierania jonów Mg^{2+} przez komórki stymulowane wazopresyną. Na przykład Bond i wsp. [52] wykazali, że podczas stymulacji *in vivo* wątroby szczurzej przez glikagon i wazopresynę powodującej mobilizację jonów Ca^{2+} w cytosolu, zachodzi „redystrybucja” jonów Mg^{2+} . Przejawia się to podwyższeniem stężenia Mg^{2+} w matriks mitochondrialnej. Obserwowana zmiana jest znaczna i może odgrywać rolę w regulowaniu enzymów mitochondrialnych a w konsekwencji regulować oksydacyjną fosforylację. Baumani i wsp. [53] stwierdzili, że pod-

czas stymulacji świetlnej fotoreceptorów pszczoły następuje znaczny wzrost stężenia Mg^{2+} w endoplazmatycznym reticulum, który towarzyszy usuwaniu jonów Ca^{2+} do cytosolu. Zgodnie z sugestią autorów jony Mg^{2+} mogłyby równoważyć ubytek Ca^{2+} w reticulum. Podobną sugestię wysunęli Somlyo i wsp. [54], którzy obserwowali pobieranie jonów Mg^{2+} towarzyszące usuwaniu Ca^{2+} z sarkoplazmatycznego reticulum podczas skurczu mięśnia. Sugestie takie sprawdzają rolę jonów Mg^{2+} do biernego równoważenia ubytku jonów Ca^{2+} w reticulum. Udział wymiany Ca^{2+} - Mg^{2+} w procesie pobierania jonów Mg^{2+} wydaje się mało prawdopodobny, ponieważ żaden z agonistów receptora β -adrenergicznego wywołujących mobilizację jonów Ca^{2+} w cytosolu nie aktywuje pobierania Mg^{2+} . Zaś tapsigargina, specyficzny inhibitor Ca^{2+} -ATPazy błony reticulum endoplazmatycznego, która wywołuje opróżnienie puli Ca^{2+} w endoplazmatycznym reticulum oraz zwiększenie jego stężenia w cytosolu, hamuje pobieranie jonów Mg^{2+} [51]. Hamowanie Ca^{2+} -ATPazy przez tapsigarginę zachodzi ze znacznym wyprzedzeniem w stosunku do hamowania pobierania jonów Mg^{2+} . Oznacza to, że pula jonów Ca^{2+} uruchamiana przez tapsigarginę, nie zaś oddziaływanie jej per se na transport jonów Mg^{2+} , jest odpowiedzialna za pobieranie Mg^{2+} . Zgodnie z sugestią Romaniego i wsp. [51] cyklizacja przepływu jonów Ca^{2+} między cytosolem a endoplazmatycznym reticulum jest warunkiem koniecznym do działania mechanizmu pobierania jonów Mg^{2+} przez komórki stymulowane.

W procesie akumulacji jonów Mg^{2+} szczególną rolę odgrywa kinaza białkowa C. W wielu komórkach obserwuje się współdziałanie między kinazą a cAMP — zachodzi pewnego rodzaju „cross talk”. Aktywacja pobierania Mg^{2+} z udziałem kinazy C może być związana z obniżeniem aktywności cykazy adenylowej prowadzącym do zahamowania ekstruzji jonów Mg^{2+} .

Alternatywnym lub dodatkowym mechanizmem włączonym w proces pobierania i „redystrybucji” jonów Mg^{2+} w komórce może być wspomniany wyżej transport z udziałem antyportera Mg^{2+} ·ATP/ PO_4 zlokalizowanym w błonie mitochondrialnej [38-41]. Transport ten jest aktywowany przez jony Ca^{2+} . Wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytosolu w następstwie stymulacji komórek przez wazopresynę może być czynnikiem aktywującym transporter Mg^{2+} ·ATP/ PO_4 .

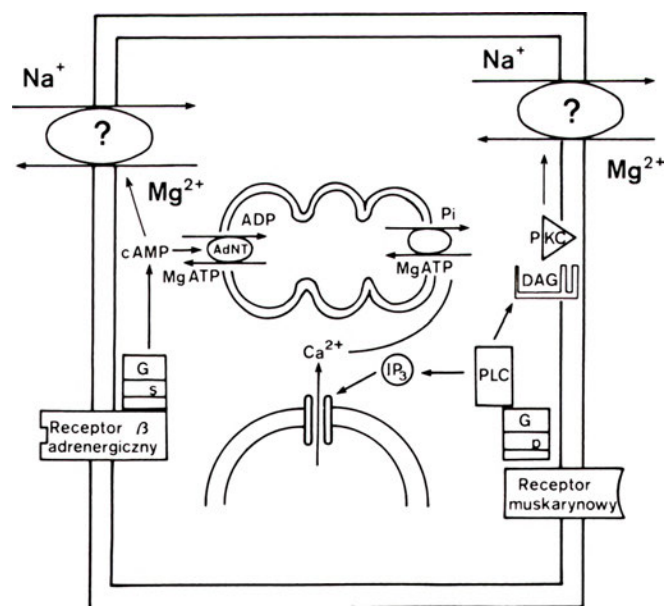
Na podstawie znanych obecnie danych dotyczących regulacji homeostazy jonów Mg^{2+} w komórce trudno jest sformułować spójną hipotezę obejmującą zarówno transport Mg^{2+} przez błonę plazmatyczną, jak i przepływy jonu wewnątrz komórki. Dane te są często sprzeczne i trudne do interpretacji. Romani i Scarpa [1] podjęli próbę powiązania znanych faktów doświadczalnych i przedstawili możliwy schemat wydarzeń dotyczących przepływów jonów Mg^{2+} w komór-

ce podczas stymulacji receptorów.

W rozważaniach tych nie można pominąć cytowanych już wyżej prac Zhanga i Melvina prowadzonych na gruczołach podjęzykowych szczura [13, 14]. Stosując sondę fluorescencyjną mag-fura-2 autorzy ci stwierdzili, że stymulacja receptora muskarynowego wywołuje mobilizację jonów Mg^{2+} w cytosolu niezależnie od obecności jonów Mg^{2+} w środowisku. Oznacza to, że pojawiający się w cytosolu Mg^{2+} pochodzi z puli wewnątrzkomórkowej. Podobny efekt wywoływała tapsigargina. Natomiast w komórkach naładowanych BAPTA (kwas bis (o-aminofenoksy)etano N N N N-tetra octowy), który jest specyficznym chelatorem jonów Ca^{2+} penetrującym błonę plazmatyczną, stymulacja komórek przez karbachol wywoływała obniżenie stężenia jonów Mg^{2+} w cytosolu. Podobnie działała taspigargina. Autorzy wnioskowali, że zubożenie puli jonów Ca^{2+} wrażliwej na trisfosfoinozytol aktywuje pobieranie jonów Mg^{2+} przez kompartment zawierający tę pulę. Wyniki te są trudne do interpretacji w świetle sugestii przedstawionych przez Romaniego i wsp.

IV-3. Hipoteza homeostazy jonów Mg^{2+} w hepatocytach i miocytach

Na rycinie 3 przedstawiono schemat komórki, na którym podwójną linią zaznaczono błonę plazmatyczną. Po lewej stronie schematu umieszczono receptor β -adrenergiczny, po prawej muskarynowy. Strzałkami o grubej linii zaznaczono szlaki przepływów jonów



Ryc. 3. [1] Mechanizmy regulacji przepływów Mg^{2+} w miocytach serca i hepatocytach.

Szczegółowy opis w rozdziale IV-3.
AdNT translokaza nukleotydów adeninowych
cAMP cykliczny AMP
GS białko G stymulujące cyklazę adenylową
IP₃ trisfosfoinozytol
GP białko G stymulujące fosfolipazę C
DAG dwuacylglicerol
PKC fosfokinaza C
PLC fosfolipaza C

Mg²⁺ potwierdzone przez dane doświadczalne. Strzałkami o linii cienkiej szlaki hipotetyczne.

Aktywacja receptora β -adrenergicznego wywołuje podwyższenie poziomu stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP, które z kolei stymuluje ekstruzję jonów Mg²⁺ z mitochondriów drogą zmodyfikowanej translokazy nukleotydów adeninowych (AdNT). W obecności cAMP translokaza przenosi Mg²⁺ z mitochondriów w postaci kompleksu Mg²⁺ · ATP, nie zaś wolny nukleotyd. Wzrost stężenia jonów Mg²⁺ w cytosolu może aktywować jego ekstruzję z komórki. Jednym z możliwych transporterów w komórkach zwierząt wyższych może być transporter Na⁺-Mg²⁺ zlokalizowany w błonie plazmatycznej. Badania bakterii *Salmonella typhimurium* prowadzone przez zespół Maguire'a (25) pozwalają oczekiwać, że w błonach eukariotów może operować podobny mechanizm ATPazy transportującej jony Mg²⁺. Nie wykluczone, że podwyższenie stężenia cAMP w komórce może aktywować per se transporter jonów Mg²⁺. Nie jest też wykluczone, że ekstruzja jonów Mg²⁺ zachodzi z udziałem wymiany Ca²⁺-Mg²⁺.

Aktywacja receptora muskarynowego przez karbachol w miocytach oraz wazopresynę w hepatocytach aktywuje białko G, fosfolipazę C oraz powstawanie dwuacylglicerolu (DAG) i Trisfosfoinozytolu (IP 3). Dwuacylglicerol może modulować aktywność kinazy białkowej C oraz wywoływać pobieranie Mg²⁺ z przestrzeni pozakomórkowej (cienka linia strzałki).

Podwyższenie poziomu stężenia jonów Ca w cytosolu wywołane obecnością Trisfosfoinozytolu (IP 3) (mobilizacja jonów Ca²⁺ z reticulum endoplazmatycznego) może aktywować transporter ATP · Mg²⁺/PO₄ zlokalizowany w błonie mitochondrialnej wywołując transport Mg²⁺ do mitochondriów z udziałem tego mechanizmu. Nie jest też wykluczone, że kinaza białkowa C może aktywować transport jonów Mg²⁺ do komórki.

V. Uwagi końcowe

1. W komórkach „nie stymulowanych” nie obserwuje się przepływów jonów Mg²⁺. Umieszczenie komórek w środowisku o wysokim stężeniu Mg²⁺ lub zawierającym jego chelatory nie zmienia stężenia Mg²⁺ w komórce lub zmienia nieznacznie. Nie wyklucza to, że zmiany metabolizmu w komórce mogą powodować przepływy kationu między jej kompartmentami.

2. W komórkach „stymulowanych” zachodzą znaczne przepływy netto jonów Mg²⁺ między kompartmentami subkomórkowymi oraz między cytosolem a środowiskiem pozakomórkowym. Przepływy te są szybkie.

3. Pogląd o zbyt wolnych przepływach jonów Mg²⁺ w komórce uniemożliwiających sprawowanie przez ten kation funkcji regulacyjnych wydaje się nieaktualny w świetle badań ostatnich lat.

4. Hipoteza regulacji przepływów jonów Mg²⁺ Ro-

maniego i Scarpy zawiera wiele luk i niejasności. Dotyczą one szczególnie współzależności przepływów jonów Ca²⁺ i Mg²⁺. Tym niemniej może być podstawą do sformułowania w przyszłości, w miarę pojawiania się danych eksperymentalnych, ogólnej spójnej teorii homeostazy jonów Mg²⁺ w komórce.

Piśmiennictwo

1. Romani A i Scarpa A (1992) *Arch. Biochem Biophys* **298**: 1-12
2. Jung DW, Brierley GP (1994) *J. Bioenerg. Biomembr.* **264**: 417-427
3. Grubbs RD, Maguire ME (1987) *Magnesium* **6**: 113-127
4. Ishijima S, Tatibana M (1994) *J. Biochem* **115**: 730-737
5. Zhang GH, Melvin JE (1995) *FEBS Letters* **371**: 52-56
6. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, Watanabe M, Higashi Y, Ono N, Hiraga H, Kambe M, Kajiyama G (1995) *Clinical Science* **89**: 293-298
7. Gunther T, Vormann J (1992) *FEBS Letters* **297**: 132-134
8. Wolf FI, Di Francesco A, Cittadini A (1994) *Archiv Biochem Biophys* **308**: 335-341
9. Zhang A, Cheng TP-O, Altura BM (1992) *Pflugers Arch (European J. of Physiol)* **421**: 391-393
10. Rijkers G T, Griffioen A W (1993) *Biochem J* **289**: 373-377
11. Grubbs RD, Walter A (1994) *Mol Cell Biochem* **136**: 11-22
12. Freudenrich CC, Murphy E, Levy LA, London RE, Lieberman M (1992) *Am J Physiol* **262**: 1024-1030
13. Zhang GH, Melvin JE (1992) *J Biol Chem* **267**: 20721-20727
14. Zhang GH, Melvin JE (1994) *J Biol Chem* **269**: 10352-10356
15. Murphy E, Freudenrich CC, Levy LA, London RE, Lieberman M (1989) *Proc Natl Acad Sci* **86**: 2981-2984
16. Gylfe E (1990) *Biochim Biophys Acta* **1055**: 82-86
17. Gunther T, Vormann J (1987) *Biochem Biophys Res Commun* **148**: 1069-1074
18. Di Polo R, Beauge L (1988) *Biochim Biophys Acta* **946**: 424-428
19. Flatman PW (1991) *Annu Rev Physiol* **53**: 259-271
20. Murphy E (1991) *Annu Rev Physiol* **53**: 273-287
21. Mullins LJ, Brinley FJJr (1978) *J Membr Biol* **43**: 243-250
22. Gonzales-Serratos H, Rasgado-Flores H, Sjoedin RA, Montes JG (1988) *Biophys J* **53**: 342a
23. Feray JC, Garay RR (1986) *Biochim Biophys Acta* **856**: 76-84
24. Gunther T, Vormann J, Holriegl V (1990) *Biochim Biophys Acta* **1023**: 455-461
25. Snavelly MD, Miller CG, Maguire ME (1991) *J Biol Chem* **266**: 815-823
26. Snavelly MD, Gravina SA, Cheng T, Miller CG, Maguire ME (1991) *J Biol Chem* **266**: 824-829
27. Dhalla NS, Zhao D (1988) *Prog Biophys Mol Biol* **52**: 1-37
28. Plesner L (1995) *Intern Rev Cytology* **158**: 141-163
29. Wallach DFH, Murphy D (1962) *Cancer Res* **22**: 228-234
30. Romani A, Scarpa A (1990) *Nature* **346**: 841-844
31. Romani A, Scarpa A (1990) *FEBS Letters* **1**: 37-40
32. Romani A, Marfella C, Scarpa A (1995) W: Papa S, Tager JM (red) *Biochemistry of Cell Membranes* 231-244, Birkhauser Verlag Basel/Switzerland
33. Gunther T, Vormann J, McGuigan (1995) *Biochem Molecular Biol Intern* **37**: 813-1027
34. Marfella C, Romani A, Scarpa A (1994) *Biophys J* **66**: A 333
35. Romani A, Dowell E, Scarpa A (1991) *J Biol Chem* **266**: 24376-24384
36. Klingenberg M, Grebe K, Heldt HW (1970) *Biochem Biophys Res Commun* **39**: 344-351
37. Klingenberg M W: *The Enzymes of Biological Membranes. Membranes Transport* (Martonosi A. N. (red)) 511-553, 2nd Ed, vol. 4, Plenum Publishing Corp. New York
38. Aprille JR (1993) *J Bioenerg Biomembr.* **25**: 473-481
39. Austin J, Aprille JR (1984) *J Biol Chem* **259**: 154-160
40. Aprille JR (1988) *FASEB J* **2**: 2547-2556

41. Nosek MT, Dransfield DT, Aprille JR (1990) *J Biol Chem* **265**: 8444-8450
42. Bogucka K, Wojtczak L (1971) *Biochem Biophys Res Commun* **44**: 1330-1337
43. George GA, Heaton FW (1975) *Biochem J* **152**: 609-6615
44. Bogucka K, Wojtczak L (1976) *Biochem Biophys Res Commun* **71**: 161-167
45. Corkey BE, Duszyński J, Rich TL, Matschinsky B, Williamson JR (1986) *J Biol Chem* **261**: 2561-2574
46. Jung DW, Apel L, Brierley GP (1990) *Biochemistry* **29**: 4121-4128
47. Rutter GA, Osbaldeston NJ, McCormack JG, Denton RM (1990) *Biochem J* **271**: 627-634
48. Masini A, Ceccarelli-Stanzari D, Muscatello V (1983) *J Bioenerg Biomembr* **15**: 217-234
49. Brierley GP, Murer E, Bachmann E, Green DE (1963) *J Biol Chem* **238**: 3482-3489
50. Kun E (1976) *Biochemistry* **15**: 2328-2336
51. Romani A, Marfella C, Scarpa A (1993) *J Biol Chem* **268**: 15489-15636
52. Bond M, Vadasz G, Somlyo AV (1987) *J Biol Chem* **262**: 15630-15636
53. Baumann O, Walz B, Somlyo AV, Somlyo AP (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 741-744
54. Somlyo AV, McClellan G, Gonzales-Serratos H, Somlyo AP (1985) *J Biol Chem* **260**: 6801-6807

*Artykuł dedykowany Pani Profesor Zofii Zielińskiej
z życzeniami dalszych sukcesów w redagowaniu Postępów Biochemii*

Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu) przez aktomiozynę

Molecular mechanism of force (motion) generation by actomyosin

HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mechanizm generacji ruchu filamentów aktynowych. Teoria poprzecznych mostków
- III. Kinetyczny mechanizm hydrolizy ATP przez układ aktomiozynowy
- IV. Atomowa struktura monomeru aktyny i model filamentu aktynowego
- V. Atomowa struktura główki miozyny i model jej kompleksu z aktyną
- VI. Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu)
- VII. Uwagi końcowe

Wykaz stosowanych skrótów: S1 — subfragment 1 cząsteczki miozyny; ELC — „istotny” lekki łańcuch; RLC — „regulujący” lekki łańcuch miozyny.

Wstęp

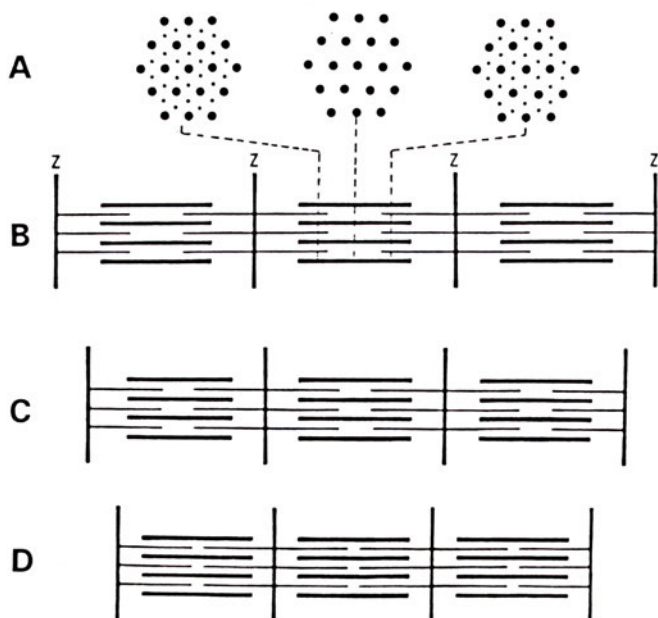
Miozyna jest najwcześniej i najlepiej poznanym z kilku obecnie znanych białek pełniących funkcję motorów biologicznych przekształcających energię chemiczną końcowego wiązania fosforanowego ATP w energię mechaniczną [1-4]. Jej partnerem w genero-

Contents:

- I. Introduction
- II. Mechanism of generation of the actin filament motion. Cross-bridge theory
- III. Kinetic mechanism of ATP hydrolysis by actomyosin
- IV. Atomic structure of the actin monomer and model of the actin filament
- V. Atomic structure of the myosin head and a model of its complex with actin
- VI. Molecular mechanism of force (motion) generation
- VII. Concluding remarks

waniu ruchu jest aktyna. Te dwa białka wyizolowano z wyspecjalizowanego narządu ruchu — mięśnia — o kilka dekad wcześniej zanim okazało się, że ich izoformy występują we wszystkich typach komórek eukariotycznych, gdzie uczestniczą w generowaniu różnego rodzaju ruchów wewnątrzkomórkowych i lokomocji komórek [2-5]. Mięsień (poprzecznie prążkowany) jest również najdogodniejszym materiałem do badań mechanizmu generacji ruchu, ponieważ miozyna i aktyna występują w nim wyłącznie w formie polimerów (filamentów) o regularnej, helikalnej strukturze, te zaś są zorganizowane w miofibryle — włókienka o wysoce uporządkowanej, niemal krystalicznej budowie, umożliwiającej śledzenie strukturalnych

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



Ryc. 1. Filamentowa budowa miofibryli. A. Schemat poprzecznego przekroju; B-D. Schemat podłużnego przekroju w różnych fazach skracania się miofibryli podczas skurczu. Większymi kółkami (A) i grubszymi liniami (B-D) zaznaczono filamente miozynowe, a kółkami mniejszymi i liniami cieńszymi filamente aktynowe. Literą Z oznaczono dyski Z ograniczające sarkomer.

zmian zachodzących podczas skurczu mięśniowego metodami mikroskopowymi lub metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich. W sarkomerach, strukturalnych jednostkach miofibryli powtarzających się wzdłuż włókna mięśniowego, występują dwie wiązki filamentów aktynowych, zakotwiczone w poprzecznych dyskach Z ograniczających sarkomer, oraz centralna wiązka filamentów miozynowych (Ryc. 1). Oba rodzaje filamentów, ułożonych równolegle do dłuższej osi włókna mięśniowego, na pewnym odcinku wnikają pomiędzy siebie. Skracanie się mięśnia podczas skurczu jest efektem przesuwania się filamentów aktynowych w obu połówkach sarkomeru ku jego centrum. Ten „ślizgowy mechanizm skurczu mięśniowego” został zaproponowany w 1954 r. na podstawie obserwacji w mikroskopie świetlnym [6, 7] i kilka lat później potwierdzony obserwacjami w mikroskopie elektronowym [8]. Był to punkt zwrotny w badaniach molekularnego podłoża mechanochemicznej transdukcji: wyeliminowano możliwość występowania aktomiozyny w postaci układu ciągłego, kurczącego się pod wpływem ATP.

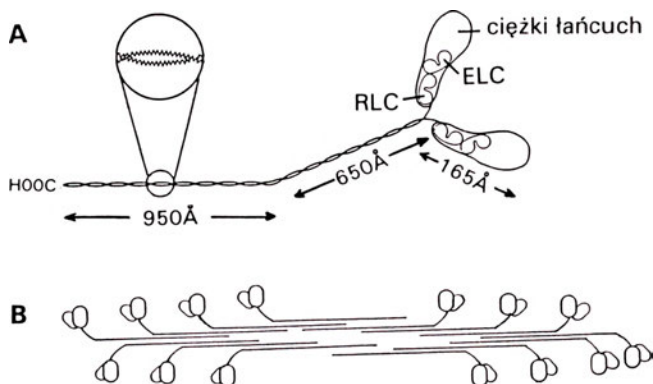
II. Mechanizm generacji ruchu filamentów aktynowych. Teoria poprzecznych mostków

Pierwsza teoria próbująca wytłumaczyć mechanizm przesuwania się filamentów aktynowych i miozynowych wzdłuż siebie, której główne elementy wytrzymały próbę czasu, została sformułowana na przełomie lat 60-tych i 70-tych [9, 10]. Zakładała ona istnienie niezależnych od siebie elementarnych generatorów siły równomiernie rozmieszczonych wzdłuż sąsiadujących

ze sobą filamentów miozynowych i aktynowych. Przesłanką tej propozycji była obserwacja, że napięcie wytworzone w izometrycznym skurczu włókien mięśniowych, w różnym stopniu rozciągniętych, jest proporcjonalnie do długości strefy zachodzenia między siebie obu rodzajów filamentów [11]. Drugim założeniem teorii był postulat wytwarzania przez generatory siły międzyfilamentowych połączeń — poprzecznych mostków — podczas skurczu. Takie połączenia, za pośrednictwem „wypustek” odchodzących od trzonów filamentów miozynowych [12], zauważono w mikroskopie elektronowym na skrawkach mięśni [8].

Poznanie podstawowych strukturalnych cech filamentów miozyny [12] i budowy cząsteczki tego białka [13-15] pozwoliło zidentyfikować mostki jako globularne fragmenty cząsteczek miozyny, nazwane „główkami” [13], helikalnie rozmieszczone na powierzchni filamentu (Ryc. 2). W główce znajduje się bowiem centrum aktywności enzymatycznej miozyny i miejsca interakcji z aktyną [14, 15]. Jak pokazano schematycznie na rycinie 2C, miozyna ma budowę dwugłówkową. Każda główka utworzona jest z N-końcowego fragmentu jednego z dwóch tzw. ciężkich łańcuchów (o masie cząsteczkowej ok. 200 kDa) i pary tzw. lekkich łańcuchów (16-27 kDa). C-końcowe fragmenty obu ciężkich łańcuchów, w blisko 100% α -helikalne, asocjują ze sobą w superhelisę tworzącą rodzaj pałeczki. Filament miozynowy jest produktem asocjacji cząsteczek za pośrednictwem tych pałeczkowatych fragmentów. Odwrócenie kierunku asocjacji cząsteczek w centralnej części filamentu nadaje mu charakter bipolarny. Taka budowa filamentu miozynowego, przy jednokierunkowym ułożeniu podjednostek w filamencie aktynowym [16], jest podstawą ruchu filamentów aktynowych podczas skurczu ku centrum sarkomeru w obu jego połówkach.

Jak działa elementarny generator siły? Zaproponowana na przełomie lat 60-tych i 70-tych hipoteza rotacji główki była tak sugestywna, że mimo niepowodzeń w poszukiwaniach bezpośrednich dowodów na jej potwierdzenie była powszechnie akceptowana bez zasadniczych zmian przez blisko 15 lat. Rycina 3 ilustruje

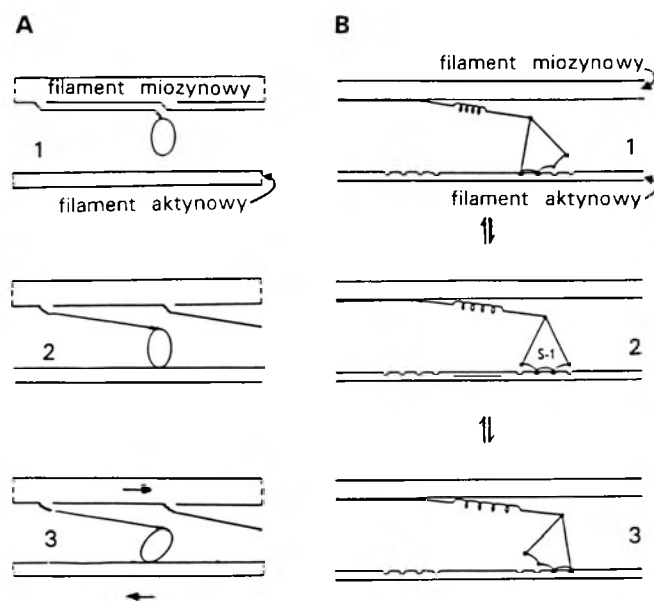


Ryc. 2. A. Schemat budowy cząsteczki miozyny. Lekkie łańcuchy, „istotny” i „regulujący”, oznaczono skrótami ich nazw w terminologii angielskiej: ELC i RLC odpowiednio. B. Uproszczony schemat budowy filamentu miozynowego.

szybka (k rzędu $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), co umożliwia aktywie realizowanie funkcji aktywatora ATPazy miozynowej: łącząc się z kompleksem miozyna-produkty przyspiesza uwalnianie ortofosforanu, najwolniejszą reakcją w całym cyklu. Uwolnienie fosforanu wzmacnia kompleks miozyny z aktyną, toteż następne etapy cyklu zachodzą głównie w kompleksie obu białek. Główny tor reakcji w układzie aktomiozynowym zaznaczono pogrubionymi strzałkami.

O tym, która z reakcji jest sprzężona z wykonaniem pracy przesunięcia filamentów możemy wnioskować na podstawie wielkości zmian swobodnej energii (obliczonych z wartości efektywnych stałych równowagi reakcji) na kolejnych etapach procesu hydrolizy ATP przez aktomiozynę [20, 22]. Duża zmiana swobodnej energii towarzyszy izomeryzacji miozyny po przyłączeniu substratu, ale ta reakcja prowadzi do dysocjacji główki miozyny z aktyną, a wprawienie filamentów w ruch wymaga silnego połączenia obu białek. Prawdopodobne jest więc tylko powiązanie przemiany energii chemicznej w mechaniczną z drugim stadium cyklu, w którym zachodzi duża zmiana swobodnej energii — uwolnieniem ortofosforanu i towarzyszącą mu izomeryzacją enzymu (reakcje 3, 4).

Z kinetycznego mechanizmu hydrolizy ATP w układzie aktomiozynowym wynika zatem, że uwolnienie energii końcowego wiązania fosforanowego ATP (reakcja hydrolizy) i jej zamiana na pracę są rozdzielone w czasie. W swoim modelu działania mostków, A. F. Huxley [17] postulował istnienie elastycznego elementu, którego odkształcenie, porównywalne do naciągnięcia sprężyny (Ryc. 3B), odpowiadałoby magazynowaniu energii chemicznej w formie zmiany konformacyjnej białka do momentu jej zamiany w ruch przez powrót elastycznego elementu do konformacji wyjściowej. Autor podkreślał, że umieszczenie tego elementu poza główką było czysto arbitralne, równie prawdopodobne jest jego występowanie w obrębie główki. Koncepcja zmian w obrębie główki wysunęła się automatycznie na pierwszy plan, gdy posługując się tzw. testem ruchliwości *in vitro* wykazano, że nie tylko filamenty lub cząsteczki miozyny, lecz także oddzielone od reszty cząsteczki główki miozyny, zaadsorbowane do nitrocelulozowego podłoża, w obecności ATP generują kierunkowy ruch filamentów aktynowych [23]. Ruchy te można obserwować w mikroskopie fluorescencyjnym po naznakowaniu aktyny fluorescencyjnym znacznikiem. Również badania spektroskopowe z użyciem znaczników fluorescencyjnych lub spinowych wprowadzonych do główki miozyny, wskazujące na stałą orientację pewnych fragmentów główki w jej silnych kompleksach z aktyną [24-26], sygnalizowały konieczność odrzucenia hipotezy rotacji całej główki. W oparciu o dostępne wówczas dane, w połowie lat 80-tych zaczęto lansować model, w którym część główki będąca w kontakcie z filamentem aktynowym pozostaje nieruchoma, a tylko jej fragment bliższy filamentowi miozynowemu zmienia na-

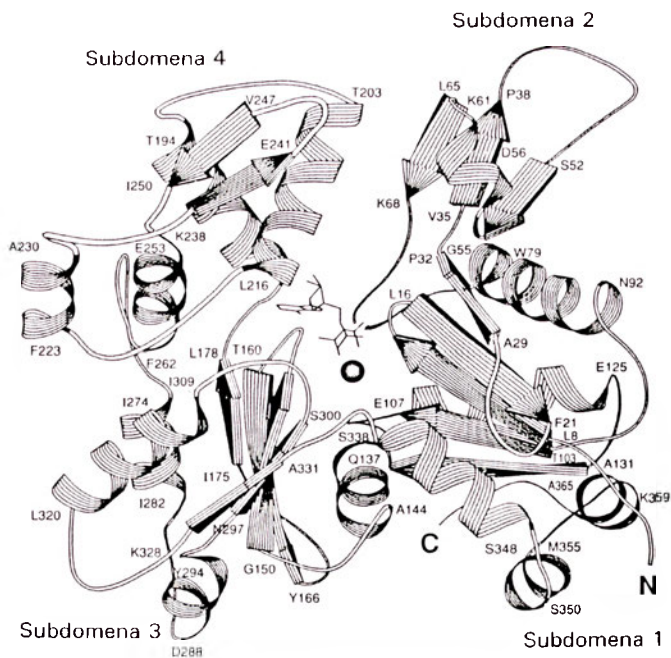


Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie wczesnych hipotez mechanizmu generacji siły przez główki miozyny. A. Hipoteza H.E. Huxleya [9]; B. Hipoteza A.F. Huxleya [17]. Autor sugeruje kilkuetapowe wytwarzanie połączenia główki z aktyną oraz przechowywanie energii chemicznej w postaci odkształcenia elastycznego elementu do czasu jej zamiany w ruch.

chylenie w stosunku do osi filamentu [27-29]. Sformułowanie realistycznej hipotezy odnośnie natury strukturalnych zmian odpowiedzialnych za generację siły działającej na filament aktynowy stało się jednak możliwe dopiero wówczas, gdy od dawna podejmowane próby określenia trzeciorzędowej struktury zarówno główki miozyny jak i cząsteczki aktyny zostały uwieńczone sukcesem.

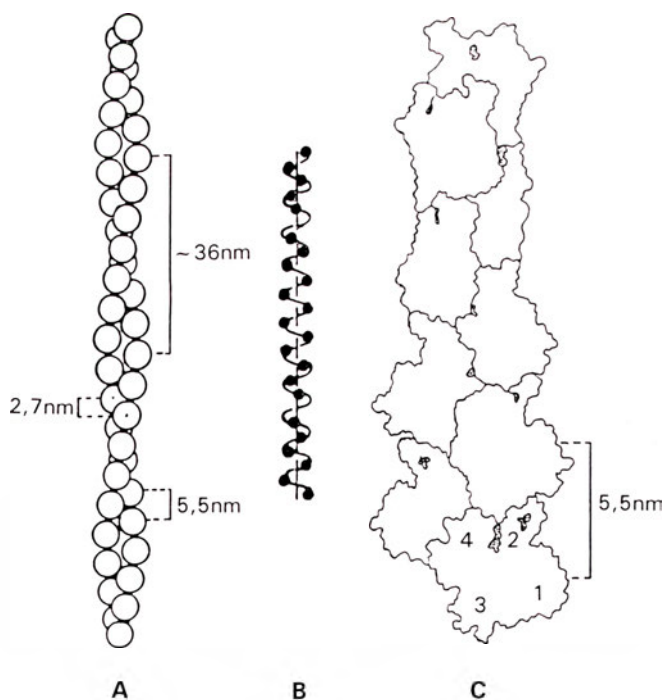
IV. Atomowa struktura monomeru aktyny i model filamentu aktynowego

Trudnością, jaką należało pokonać w celu krystalizacji aktyny jest jej polimeryzacja pod wpływem soli. Posłużono się białkami, które wiążąc się z aktyną utrzymują ją w stanie monomerycznym. Pierwszy atomowy model cząsteczki aktyny (Ryc. 4) otrzymano przez „wycięcie” ze struktury jej kompleksu z DNAzą-I części odpowiadającej cząsteczce osobno zbadanej DNAzy I [30]. Pojedynczy łańcuch aminokwasowy aktyny ułożony jest w dwie domeny przedzielone głęboką szczeliną, zaś w każdej domenie wyraźnie wyróżniają się dwie subdomeny. W międzysubdomenowej szczelinie wiązany jest nukleotyd — ATP lub ADP — i jon dwuwartościowego metalu, reagujący z resztami fosforanowymi nukleotydu oraz bezpośrednio z białkiem. *In vivo* jest to jon Mg^{2+} , który podczas izolacji i oczyszczania aktyny jest zwykle zastępowany przez Ca^{2+} (odnośniki w [31]) i ten właśnie jon był wiązany w kryształach kompleksów aktyny z innymi białkami. DNAza wiązana jest przez powierzchniowe pętle na szczycie subdomen 2 i 4. Ze względu na możliwość strukturalnych zaburzeń spowodowanych przez połączenie z tym białkiem, istotne znaczenie



Ryc. 4. Wstążkowy model atomowej struktury monomeru aktyny. Strzałki reprezentują odcinki łańcucha polipeptydowego o strukturze β ; kółko wskazuje miejsce silnie wiązane dwuwartościowego kationu. Wg [30].

miało potwierdzenie zasadniczych cech struktury monomeru przez rentgenograficzną analizę kryształów aktyny w kompleksach z innymi białkami: fragmentem cząsteczki (segmentem 1) żelazoliny [32] lub profiliną [33], które wiązane są po przeciwnej stronie cząsteczki aktyny — przez jej subdomenę 1 i „kieszneń” między subdomenami 1 i 3.



Ryc. 5. Schemat budowy filamentu aktynowego. A. Pierwszy model, wg [34]; B. Lewoskrętna genetyczna helisa opisująca ułożenie kolejnych monomerycznych podjednostek filamentu; C. Schemat ułożenia monomerycznych podjednostek w atomowym modelu filamentu zaproponowanym przez H o l m e s a i w s p. [35]; cyframi 1-4 zaznaczono odpowiednie subdomeny monomeru.

Ogólne cechy budowy polimeru aktyny poznano już w latach 60-tych. Na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym negatywno kontrastowanych preparatów zaproponowano wówczas model [34] przedstawiający filament jako dwa helikalnie wokół siebie zwinięte sznury globularnych podjednostek (Ryc. 5A). Strukturę tę można również opisać jako pojedynczą, lewoskrętną helisę przechodzącą przez centra kolejnych podjednostek (Ryc. 5B). Parametry obu helis i średnicę filamentu znamy z badań niskokątowej dyfrakcji promieni rentgenowskich na wiązkach filamentów lub całych włóknach mięśniowych. Dalszy postęp w badaniach filamentu aktynowego uzależniony był od poznania struktury monomeru aktyny. Atomowy model monomeru został wykorzystany przez H o l m e s a i w s p. [35] do określenia, metodą „prób i błędów”, jedynego — jak twierdzą — sposobu ułożenia monomerów wzdłuż genetycznej helisy wykazującego zgodność z obrazami dyfrakcji promieni rentgenowskich na wiązkach jednakowo zorientowanych filamentów. Tak skonstruowany atomowy model filamentu aktyny (Ryc. 5C) jest zasadniczo zgodny również z wynikami innych badań, takich jak pomiary odległości między określonymi resztami aminokwasowymi w sąsiednich podjednostkach polimeru metodą chemicznego sieciowania [36, 37] lub rezonansowego przeniesienia energii fluorescencji między parami znaczników (odnośniki w [38]), oraz najnowszymi trójwymiarowymi rekonstrukcjami filamentu na podstawie jego mikroskopowych obrazów [39-43]. Umieszczenie subdomen 1 i 2 monomeru na obwodzie filamentu eksponuje zidentyfikowane wcześniej powierzchnie kontaktowe dla główki miozyny, zgrupowane głównie w subdomenie 1 (odnośniki w [44]). Udział powierzchniowych pętli na szczycie subdomen 2 i 4 w międzymonomerycznych kontaktach w filamencie jest zgodny z hamowaniem polimeryzacji przez wiązaną w tych miejscach DNAzę I [30]. To samo odnosi się do powierzchniowych segmentów u podstawy subdomen 1 i 3, gdzie wiązane są inne białka utrzymujące aktynę w formie monomerycznej, jak profilina [33], segment 1 żelazoliny [32], czy tymozyna β_4 [45].

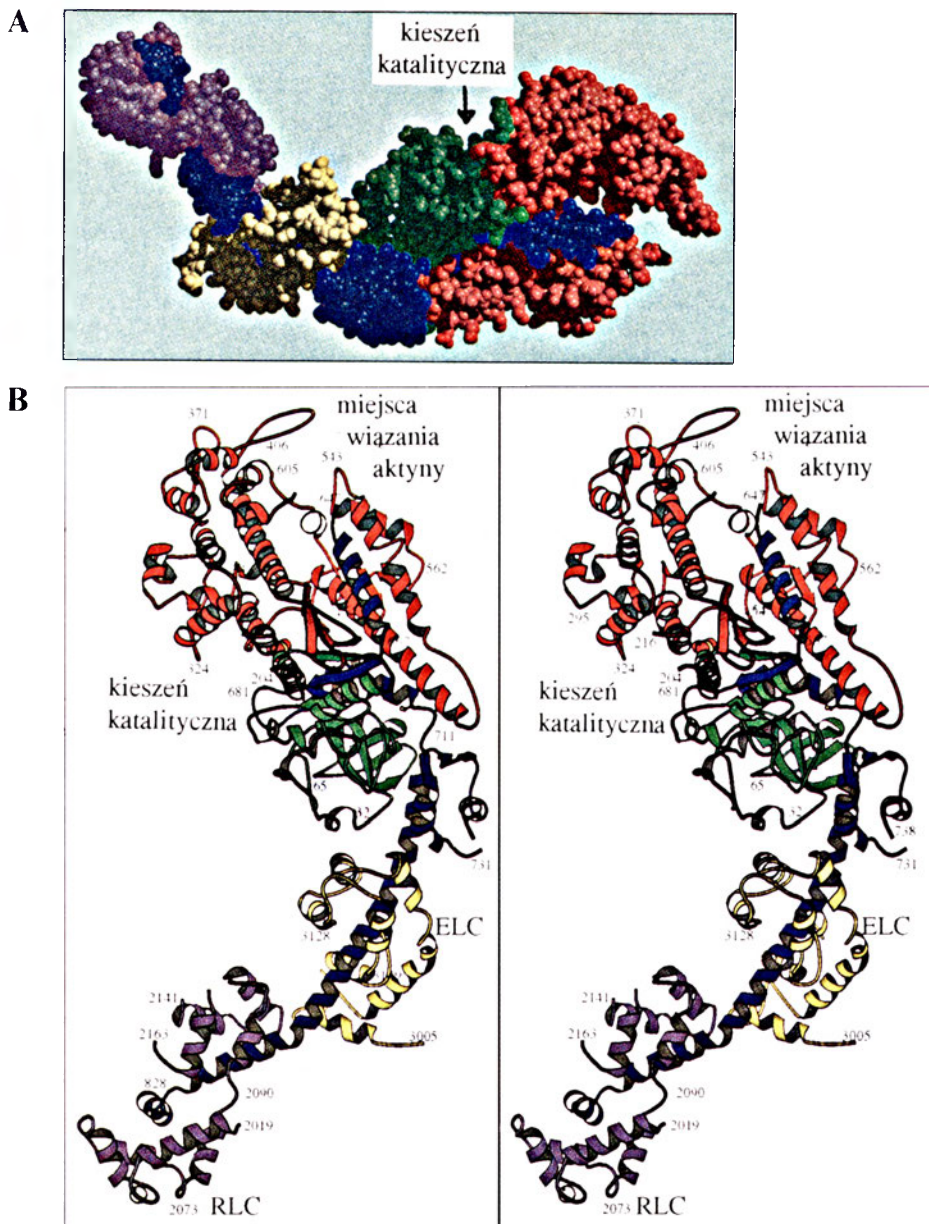
Tylko jedna grupa badaczy [46] kwestionuje tezę, iż ułożenie monomerów proponowane przez H o l m e s a i w s p. jest jedyne z możliwych oraz sugeruje prawdopodobieństwo zupełnie innych międzymonomerycznych kontaktów — takich jakie występują między monomerami aktyny w kryształach jej kompleksu z profiliną [33]. Autorzy atomowego modelu filamentu przyznają natomiast, że korekty mogą wymagać pewne szczegóły strukturalne ich modelu. Nowe propozycje [47, 48] uwzględniają rotacje subdomeny 2 i jej przybliżenie do osi filamentu poprzez zwięźlenie międzydomenowej szczeliny, oraz przemieszczenie segmentu C-końcowego w stosunku do jego ułożenia w strukturze monomeru. Sugestia iż tego rodzaju zmiany zachodzą podczas lub w efekcie poli-

meryzacji wynikała z porównania pierwotnej wersji atomowego modelu filamentu [35], opartego — jak powiedziano wyżej — na strukturze aktyny monomerycznej, z trójwymiarowymi rekonstrukcjami na podstawie obrazów mikroskopowych rzeczywistych filamentów [41, 43]. Popierają ją również wyniki badań biochemicznych [49, 50]. Prawdopodobieństwo zmian wzajemnej orientacji domen i subdomen monomeru, sugerowanych na podstawie teoretycznych analiz strukturalnych [51], wynika z luźnego połączenia tych struktur giętkimi pętlami (Ryc. 4).

V. Atomowa struktura główki miozyny i model jej kompleksu z aktyną

Wyprodukowanie kryształów subfragmentu 1 miozyny o jakości odpowiedniej dla analizy rentgenostrukturalnej wymagało bezprecedensowego podejścia, jakim była redukcjna metylacja 97% reszt lizyny w cząsteczce. Modyfikacja ta niestety obniża aktyw-

ność ATPazową główek [52, 53] i — co więcej — eliminuje ich zdolność wprawiania w ruch filamentów aktynowych w teście ruchliwości *in vitro* [53]. Wydaje się jednak, że nasuwające się w związku z tym zastrzeżenia nie dotyczą ogólnej architektury główki, jaką pokazuje ogłoszony w 1993 r. przez R a y m e n t a i w s p. [54] model oparty na analizie dyfrakcyjnej, z rozdzielczością 2.8 Å, kryształów S1 miozyny z mięśni szkieletowych kury. W modelu tym, przedstawionym na rycinie 6, różnymi kolorami zaznaczono trzy fragmenty, na które można podzielić ciężki łańcuch polipeptydowy S1 przez łagodne trawienie trypsyną, często wykorzystywane we wcześniejszych badaniach struktury i funkcji główki (odnośniki w [55]). We wstążkowym modelu główki (Ryc. 6B), w miejscach powierzchniowych pętli łączących te trzy fragmenty występują przerwy w ciągłości łańcucha polipeptydowego, ponieważ rejonu te cechuje wysoka ruchliwość i dlatego nie znaleziono ich na mapach gęstości. Dystalna, grubsza część główki, zbudowana z N-końcowego, centralnego



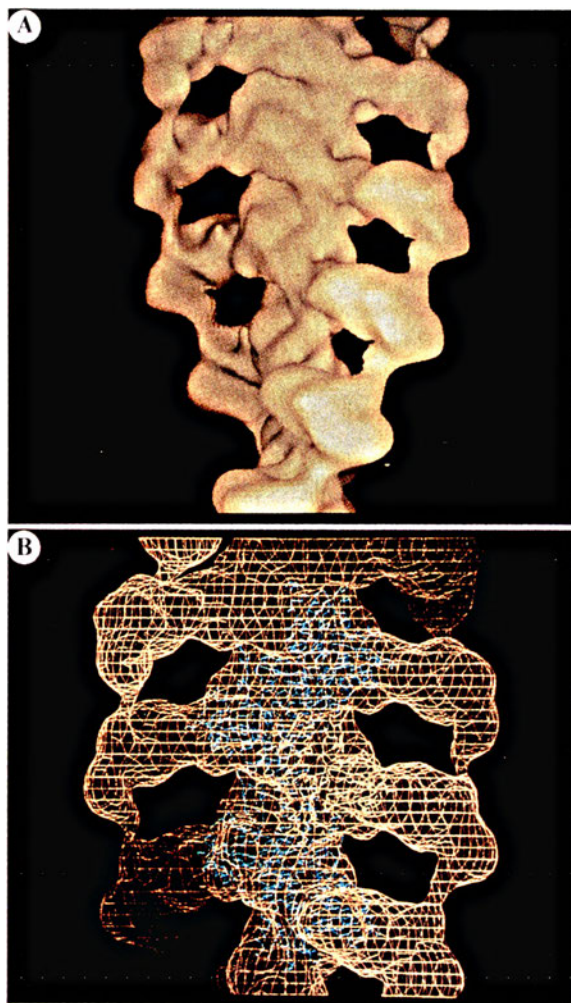
Ryc. 6. Model atomowej struktury S1 miozyny z mięśni szkieletowych kury. A. Model kulkowy; B. Model wstążkowy (stereopara). Kolorami zielonymi, czerwonym i fioletowym oznaczono, odpowiednio, N-końcowy (25 kDa), centralny (50 kDa) i C-końcowy (20 kDa) segment „ciężkiego” łańcucha polipeptydowego; kolorami żółtym i fioletowym zaznaczono „lekki” łańcuch: „istotny” (ELC) i „regulujący” (RLC); pozostałe objaśnienia w tekście. Wg [54].

i części C-końcowego fragmentu ciężkiego łańcucha, stanowi jej domenę motoryczną: tu znaleziono kieszeń katalityczną oraz powierzchnie kontaktowe dla aktyny, których miejsca w sekwencji ciężkiego łańcucha były znane z wcześniejszych badań [55]. Miejsca wiązania aktyny rozmieszczone są po obu stronach głębokiej szczeliny dzielącej centralny fragment łańcucha polipeptydowego na dwie domeny, „górną” i „dolną”. Szczelina ta sięga do podstawy kieszeni katalitycznej, co sugeruje, że może ona odgrywać istotną rolę w stymulacji aktywności ATPazowej przez aktynę, związaną przy jej drugim końcu.

Wychodzący z domeny motorycznej długi (8,5 nm) α -helikalny segment C-końcowego fragmentu ciężkiego łańcucha, wraz z niekowalencyjnie połączonymi z nim lekkimi łańcuchami — istotnym i regulującym, tworzy rodzaj szyjki, określanej również jako domena regulatorowa. Uzasadnienie tej nazwy znajdzie czytelnik w artykułach omawiających szerzej funkcje lekkich łańcuchów miozyny [56, 57]. Ciężki łańcuch, tu proteolitycznie odcięty przy 828-ej reszcie aminokwasowej, w rodzimej cząsteczce wnika dalej w „pałeczkę” zasocjowaną z trzonem filamentu miozynowego (patrz Ryc. 2).

Wraz z ogłoszeniem atomowego modelu główki miozyny podjęto pierwsze próby określenia geometrii wiązania główki z filamentem aktynowym na poziomie atomowym [58, 59]. Do tego celu wykorzystano trójwymiarowe rekonstrukcje filamentu aktyny „udekorowanego” główkami miozyny (Ryc. 7A), uzyskane przez analizę mikroskopowych obrazów takiego kompleksu metodą optycznej dyfrakcji i transformacji Fouriera. Obwódzając kontury kompleksu liniami otrzymano siatkową obwolutę, w którą wprowadzono atomowy model filamentu aktyny (Ryc. 7B), a następnie główki miozyny. Asymetryczny kształt główki jednoznacznie określa jej usytuowanie w siatkowym modelu. W obszarze kontaktu obu białek dochodzi jednak do kolizji ich mas. Nie dyskwalifikuje to zastosowanego podejścia, świadczy raczej o tym, że wytworzenie silnych międzybiałkowych wiązań występujących w kompleksie, którego mikroskopową rekonstrukcją posłużono się w budowaniu atomowego modelu kompleksu, wymaga zmiany konformacji co najmniej jednego ze składników. Okazało się, że kolizji mas można uniknąć przez zamknięcie szczeliny przedzielającej centralny fragment głównego łańcucha główki. Wyciągnięto stąd wniosek, że otwieranie i zamykanie centralnej szczeliny w główce miozyny mogłoby być strukturalnym podłożem zmian siły wiązania miozyny z aktyną w trakcie hydrolizy ATP [58, 60].

Ponieważ centralna szczelina w domenie motorycznej sięga do podstawy kieszeni katalitycznej, wydawało się pierwotnie, że otwarcie tej szczeliny, osłabiające wiązanie S1 z aktyną po związaniu ATP, może być inicjowane przez hipotetyczne zamknięcie kieszeni katalitycznej wokół substratu [58]. Z biochemicznych badań wiadomo, że w charakterystycznym dla inter-



Ryc. 7. Trójwymiarowa rekonstrukcja filamentu aktynowego „udekorowanego” główkami miozyny oparta na analizie obrazów mikroskopowych tego kompleksu (A) i kontury kompleksu z wbudowanym w nie atomowym modelem filamentu aktynowego (B). Wg [59].

mediatów M·T i M·D·T (Schemat 1) słabym wiązaniu z aktyną uczestniczą oddziaływania elektrostatyczne między polarnymi resztami obu białek [44]. Izomeryzację główki towarzyszącą uwolnieniu fosforanu i wzmacniającą wiązanie obu białek przedstawiono jako otwarcie kieszeni katalitycznej i sprzężone z nim zamknięcie szczeliny. Przeprowadzenie tej operacji na modelu wymaga przemieszczenia „dolnej” domeny centralnego fragmentu, co umożliwi włączenie jej w stereospecyficzne, hydrofobowe oddziaływania z aktyną. Zmiany te kreują ponadto nowe powierzchnie kontaktowe między „górną” domeną centralnego fragmentu i aktyną [58].

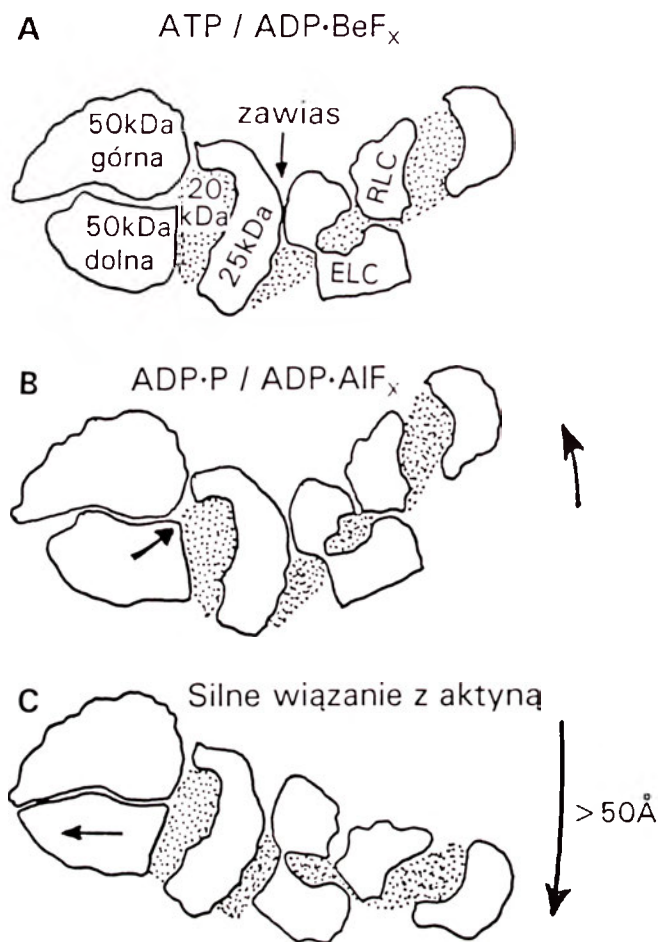
Weryfikację tych propozycji umożliwiło oznaczenie, w 1995 r., krystalicznej struktury motorycznej domeny główki miozyny w kompleksie z ADP i fluorkiem berylu lub glinu [60] — analogami ortofosforanu, związanymi w centrum katalitycznym miozyny w miejscu γ -fosforanu ATP. W odróżnieniu od intermediatu M·ADP·P, są to trwałe kompleksy [61]. W tym przypadku krystalizacja powiodła się bez modyfikacji reszt lizyny, prawdopodobnie dzięki temu, cząsteczka była mniejsza. Użyto fragment ciężkiego łańcucha (reszty 1-760) miozyny z ameby *Dictyostelium dis-*

coideum, bez łańcuchów lekkich, otrzymany przez ekspresję w komórkach *Dictyostelium*. Fragment ten zachowuje aktywność ATPazową i wiąże się z aktyną [62]. Okazało się, że struktura jego kompleksu z ADP i fluorkiem berylu jest uderzająco podobna do odpowiedniego fragmentu S1 miozyny z mięśni szkieletowych kury (bez substratu lub produktów jego hydrolizy). Wbrew oczekiwaniom, nie zauważono żadnych istotnych różnic w konformacji kieszeni katalitycznej. Wcześniejsza sugestia zmian w tym rejonie na różnych etapach hydrolizy ATP nie znalazła również potwierdzenia w porównaniu struktur tego samego białka, z *Dictyostelium*, w kompleksach z ADP i fluorkiem berylu lub fluorkiem glinu. Pierwszy z nich strukturalnie odpowiada kompleksowi z ATP, gdyż końcowy atom tlenu β -fosforanu ADP uczestniczy tu w koordynacji atomu berylu. Odległość między tlenem β -fosforanu ADP i atomem glinu jest większa (2,0 Å w porównaniu z 1,57 Å dla berylu), co sugeruje, że ten kompleks jest analogiem stanu pośredniego między kompleksem enzym-ATP i enzym-produkty. W tym pośrednim stadium hydrolizy, utrwalonym w kompleksie z fluorkiem glinu, konformacja kieszeni katalitycznej pozostaje nadal niezmienną. Widać natomiast postulowane zżęcenie szczeliny, wynikające z rotacji dolnej domeny centralnego fragmentu o 5° i przesunięcia jej masy przy zewnętrznym końcu szczeliny o 5 Å. Zauważono również przemieszczenie znajdującego się w pobliżu kieszeni katalitycznej odcinka C-końcowego fragmentu ciężkiego łańcucha; tej zmianie przypisano istotną rolę w przedstawionym niżej nowym modelu działania mostków. Autorzy przypuszczają, że te strukturalne różnice ulegają pogłębieniu po zakończonej hydrolizie ATP [60].

Innym interesującym rezultatem przeprowadzonych analiz było spostrzeżenie, że geometria wiązania substratu nie pozwala na to, by reszta fosforanowa generowana przez hydrolizę ATP była uwalniana tą samą drogą, jaką do centrum aktywności dostaje się substrat. Otwór kieszeni katalitycznej jest blokowany przez ADP, uwalniany jak wiemy w drugiej kolejności. Sugeruje się, że ortofosforan wychodzi „tylnymi drzwiami”, których otwarcie można sobie wyobrazić jako przesunięcie pętli wiążącej γ -fosforan ATP lub sąsiednich reszt (Ser²⁴³ lub Arg²⁴⁵) o 3-4 Å [60, 63].

VI. Molekularny mechanizm generacji siły (ruchu)

Mechanizm generacji ruchu filamentów przedstawia się obecnie jako zmianę orientacji tylko C-końcowej domeny główki (szyjki). Najnowszą hipotezę, R a y m e n t a i w s p. [60], ilustruje rycina 8. Na podstawie omówionych w rozdziale V analiz krystalograficznych autorzy sugerują, że ogólna konformacja główki po związaniu ATP (stan A) jest podobna do obserwowanej w kryształach S1 miozyny z mięśni szkieletowych kury (centralna szczelina otwarta, głów-



Ryc. 8. Schemat ilustrujący różne stany konformacyjne główki miozyny: A. w kompleksie z substratem; B. w kompleksie z produktami hydrolizy substratu; C. po uwolnieniu produktów i wytworzeniu silnych stereospecyficznych wiązań z aktyną. Na rysunku zaznaczono N-końcowy (25 kDa), C-końcowy (20 kDa) oraz „górna” i „dolna” domeny centralnego (50 kDa) fragmentu ciężkiego łańcucha S1, jak również „istotny” (ELC) i „regulujący” (RLC) lekki łańcuch. Strzałkami zaznaczono zmiany orientacji „dolnej” domeny centralnego fragmentu oraz regulatorowej domeny główki (szyjki). Wg [60].

ka ma kształt przecinka). Hydrolizie ATP towarzyszą zmiany konformacyjne prowadzące do silniejszego zgięcia cząsteczki na pograniczu domeny motorycznej i szyjki (stan B). Na tego rodzaju różnicę kształtu cząsteczki w kompleksie z substratem i w kompleksie z produktami hydrolizy wskazują niedawne pomiary niskokątowego rozpraszania promieni X przez roztwory S1 [64, 65]. Zdaniem R a y m e n t a i w s p. jest to zmiana wprowadzająca główkę w stan gotowości do wykonania pracy. W stanach A i B główka wiąże się z aktyną słabymi wiązaniami. Wobec braku znaczących zmian w konformacji kieszeni katalitycznej wysunięto sugestię, że proces tworzenia — w następnym etapie — silnych wiązań z aktyną (wraz z uwolnieniem ortofosforanu) powoduje rotację „dolnej” domeny centralnego fragmentu ciężkiego łańcucha i zamknięcie szczeliny w centralnym fragmencie, a w konsekwencji — rotację szyjki, która spełnia rolę dźwigni w przesuwaniu filamentu aktynowego wraz z domeną motoryczną główki. Rycina 8C pokazuje konformację główki po wykonaniu pracy.

W transmisji strukturalnych przekształceń z domeny motorycznej do szyjki uczestniczy niewątpliwie sam C-końcowy fragment ciężkiego łańcucha S1, gdyż przechodzi on wzdłuż niemal całej główki (patrz Ryc. 6B). Jego pierwszy α -helikalny segment (Ser⁶⁵⁰ — Arg⁶⁶⁵) jest w kontakcie z „dolną” domeną centralnego fragmentu ciężkiego łańcucha S1. Dalszy segment przechodzi pod kieszenią katalityczną i najprawdopodobniej uczestniczy w funkcjonalnych zmianach konformacyjnych w części motorycznej główki [58, 60]. Przemawiają za tym wcześniejsze badania, w których wykazano specyficzny wpływ chemicznych modyfikacji dwóch najbardziej reaktywnych grup SH miozyny, należących do występujących w tym segmencie reszt Cys⁷⁰⁷ i Cys⁶⁹⁷, na ATPazową aktywność miozyny. Odwrotny wpływ, konformacji centrum aktywnego na rejon zawierający te dwie reaktywne reszty cysteiny, ujawniono wykazując możliwość usieciowania tych reszt, ale tylko w obecności ATP, bifunkcyjnymi odczynnikami sieciującymi o długości ramienia od 2 do 14 Å (odnośniki w [66, 67]).

Rolę wewnętrznego zawiasu umożliwiającego rotację szyjki względem domeny motorycznej spełnia, jak się przypuszcza [60], miejsce kontaktu N-końcowego segmentu ciężkiego łańcucha, na skraju domeny motorycznej, z C-końcowym segmentem istotnego lekkiego łańcucha w szyjce. Z badań metodą chemicznego sieciowania wynika, że wzajemna orientacja tych rejonów cząsteczki zmienia się gdy centrum aktywności zajęte jest przez substrat lub produkty hydrolizy [68, 69]. Również inne badania sugerują, że istotny lekki łańcuch odgrywa nie tylko rolę strukturalną w stabilizacji α -helikalnego rdzenia szyjki, lecz poprzez bezpośrednią interakcję z domeną motoryczną pośredniczy w jej sprzęganiu z pełniącą funkcję dźwigni szyjką [70, 71].

VII. Uwagi końcowe

Postęp w badaniach struktury aktyny i miozyny, jaki nastąpił w ciągu kilku ostatnich lat, przybliżył nas do rozpatrywania mechanizmu generacji ruchu przez te białka na poziomie zmian w ich strukturze atomowej. Takie próby są już obecnie podejmowane; proponowane modele są jednak jeszcze w dużej mierze spekulatywne.

Proponowane przejście główki miozynowej z konformacji „zgiętej” w „wyprostowaną” (Ryc. 8, B → C), uważane obecnie za podstawę przekształcenia energii chemicznej w mechaniczną, w świetle dostępnych danych jest wysoce prawdopodobne, lecz wciąż nie poparte bezpośrednimi dowodami. Jeżeli słuszna jest sugestia R a y m e n t a i w s p. [60], że ta zmiana kształtu główki jest inicjowana przez wytworzenie stereospecyficznych, silnych wiązań z aktyną, to nieskuteczne dotąd próby jej udokumentowania na drodze różnego typu badań samego S1 w kolejnych stadiach hydrolizy ATP skazane są na niepowodzenie. Trójwymiarowa rekonstrukcja makrocząsteczkowych

kompleksów oparta na analizie ich obrazów w mikroskopie elektronowym, dzięki której uzyskaliśmy wgląd w strukturę silnego kompleksu S1 z aktyną, jest ograniczona niską rozdzielczością uzyskiwanych map gęstości elektronowej (20-30 Å). W takich rekonstrukcjach rejon szyjki — nie tylko najwyższej, ale w tym układzie również ruchliwej części główki — nie był w ogóle widoczny na mapach gęstości. Obecnie mówi się o możliwości zwiększenia rozdzielczości do 8-10 Å [72], co stwarza nadzieję na wizualizację również tej części główki w kompleksie S1 z aktyną.

Trudność, jaką napotkano w konstrukcji modelu kompleksu S1 z aktyną przez wbudowanie atomowych modeli obu białek w trójwymiarową rekonstrukcję kompleksu — kolizja mas S1 i aktyny w miejscu ich kontaktu, w efekcie okazała się pomocna w modelowaniu strukturalnych zmian towarzyszących transformacji słabego kompleksu w silny. Ograniczenie się do propozycji zmian w strukturze S1 wydaje się jednak zbyt dużym uproszczeniem, choć być może na tym wstępnym etapie było to konieczne dla uniknięcia komplikacji. Zmiany w strukturze aktyny towarzyszące wiązaniu S1 były sygnalizowane w piśmiennictwie biochemicznym [73-76]. Bardziej precyzyjne ich scharakteryzowanie i, jeżeli okażą się znaczące, uwzględnienie w modelu kompleksu jest zadaniem na przyszłość. W związku z tym pozostaje bardziej generalne pytanie: czy filament aktynowy — jak to przedstawiają wiodące hipotezy — jest tylko biernym przekaźnikiem działających na niego sił generowanych w główkach miozyny? Charakterystyczną cechą filamentu aktynowego jest jego torsyjna giętkość (odnośniki w [77]) wynikająca, jak można obecnie przypuszczać, z wewnątrzmonomerycznych międzydomenowych ruchów [78]. Na funkcjonalne znaczenie strukturalnej giętkości filamentu aktyny wskazują doświadczenia na filamentach utworzonych z monomerów usztywnionych przez ich wewnątrzcząsteczkowe chemiczne usieciowanie. Tak zmodyfikowane filamenty, choć nadal stymulowały ATPazową aktywność miozyny, traciły zdolność do generowanego przez miozynę ruchu w teście ruchliwości *in vitro* [79, 80]. Na filament aktynowy jako potencjalne miejsce zamiany energii chemicznej w mechaniczną poprzez lokalne odkształcenia strukturalne wskazuje od dawna O o s a w a [77, 81, 82], możliwość taką rozważał również w swym modelu działania poprzecznych mostków A. F. H u x l e y [17] i nadal ją podtrzymuje [83].

Artykuł otrzymano 16 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Skoufias D.A., Scholey J.M. (1993) *Curr Opin Cell Biol* 5: 95-104
2. Titus M.A. (1993) *Curr Opin Cell Biol* 5: 77-81
3. Hammer III J.A. (1994) *J Muscle Res Cell Motil* 15: 1-10

4. Dąbrowska R (1994) *Post Biochem* **40**: 96-105
5. Herman IM (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 48-55
6. Huxley AF, Niedergergerke RM (1954) *Nature* **173**: 971-973
7. Huxley HE, Hanson J (1954) *Nature* **173**: 973-976
8. Huxley HE (1957) *J Biophys Biochem Cytol* **3**: 631-648
9. Huxley HE (1969) *Science* **164**: 1356-1366
10. Huxley AF, Simmons RM (1971) *Nature* **223**: 533-538
11. Gordon AM, Huxley AF, Julian FJ (1966) *J Physiol* **184**: 170-192
12. Huxley HE (1963) *J Mol Biol* **7**: 281-301
13. Lowey S, Slayter HS, Weeds A, Baker H (1969) *J Mol Biol* **42**: 1-29
14. Szent-Györgyi AG (1953) *Arch Biochem Biophys* **42**: 305-320
15. Mueller H, Perry SV (1962) *Biochem J* **85**: 431-439
16. Moore PB, Huxley HE, De Rosier DJ (1970) *J Mol Biol* **50**: 279-292
17. Huxley AF (1974) *J Physiol* **243**: 1-43
18. Reedy M, Holmes KC, Tregear RT (1965) *Nature* **207**: 1276-1280
19. Taylor EW (1979) *CRC Crit Rev Biochem* **4**: 103-164
20. Taylor EW (1992) W: Fozzard HA et al. (red) *The Heart and Cardiovascular System*, II wyd., Raven Press Ltd, New York, str 1281-1293
21. Geeves MA (1991) *Biochem J* **274**: 1-14
22. Shriver JW (1986) *Biochem Cell Biol* **64**: 265-276
23. Toyoshima YY, Kron SJ, McNally EM, Niebling KR, Toyoshima C, Spudich JA (1987) *Nature (Lond)* **328**: 536-539
24. Cooke R, Crowder MS, Thomas D (1982) *Nature (Lond)* **30**: 776-778
25. Burghardt TP, Ando T, Borejdo J (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7515-7519
26. Fajer PG, Fajer EA, Thomas DD (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5538-5542
27. Holmes KC, Goody RS (1984) W: Pollack GH, Sugi H (red) *Contractile Mechanisms in Muscle*, Plenum Publishing Co, str 373-384
28. Huxley HE, Kress M (1985) *J Muscle Res Cell Motil* **6**: 153-161
29. Cooke R (1986) *CRC Crit Rev Biochem* **21**: 53-118
30. Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC (1990) *Nature (Lond)* **347**: 37-44
31. Estes JE, Selden LA, Kinosian HJ, Gershman LC (1992) *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 272-284
32. McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG (1993) *Nature (Lond)* **364**: 685-692
33. Schutt CE, Myslik JC, Rozycki MD, Goonesekere NCW, Lindberg U (1993) *Nature (Lond)* **365**: 810-816
34. Hanson J, Lowy J (1963) *J Mol Biol* **6**: 46-60
35. Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) *Nature (Lond)* **347**: 44-49
36. Elzinga M, Phelan JJ (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6599-6602
37. Hegyi G, Michel H, Shabanowitz J, Hunt DF, Chatterjee N, Healy-Louie G, Elzinga M (1992) *Protein Sci* **1**: 132-144
38. dos Remedios C, Moens PDJ (1995) *Biochim Biophys Acta* **1228**: 99-124
39. Milligan RA, Whittaker M, Safer D (1990) *Nature (Lond)* **348**: 217-221
40. Bremer A, Millonig RC, Sütterlin R, Engel A, Pollard TD, Aebi U (1991) *J Cell Biol* **115**: 689-705
41. Orlova A, Egelman EH (1992) *J Mol Biol* **227**: 1043-1053
42. Mendelson RA, Morris E (1994) *J Mol Biol* **240**: 138-154
43. Bremer A, Aebi U (1992) *Curr Opin Cell Biol* **4**: 20-26
44. Reisler E (1993) *Curr Opin Cell Biol* **5**: 41-47
45. Heintz D, Reichert A, Mihelic M, Voelter W, Faulstich H (1993) *FEBS Lett* **329**: 9-12
46. Schutt CE, Rozycki MD, Myslik JC (1995) *J Struct Biol* **116**: 186-198
47. Lorenz M, Popp D, Holmes KC (1993) *J Mol Biol* **234**: 826-836
48. Tirion MM, ben-Avraham D, Lorenz M, Holmes KC (1995) *Biophys J* **68**: 5-12
49. Muhrad A, Cheung PC, Phan BC, Miller C, Reisler E (1994) *J Biol Chem* **269**: 11852-11858
50. Strzelecka-Golaszewska H, Woźniak A, Hult T, Lindberg U (1996) *Biochem J* (w druku)
51. Tirion MM, ben-Avraham D (1993) *J Mol Biol* **230**: 186-195
52. White HD, Rayment I (1993) *Biochemistry* **32**: 9859-9865
53. Phan BC, Cheung P, Miller CJ, Reisler E, Muhrad A (1994) *Biochemistry* **33**: 11286-11295
54. Rayment I, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) *Science* **261**: 50-58
55. Mornet D, Bonet A, Audemard E, Bonicel J (1989) *J Muscle Res Cell Motil* **10**: 10-24
56. Dąbrowska R (1996) *Post Biochem* **42**: 195-203
57. Stepkowski D (1995) *FEBS Lett* **374**: 6-11
58. Rayment I, Holden HZ, Whittaker M, Yohn CB, Lorenz M, Holmes KC, Milligan RA (1993) *Science* **261**: 58-65
59. Schröder RR, Manstein DJ, Jahn WJ, Holden H, Rayment I, Holmes KC, Spudich JA (1993) *Nature (Lond)* **364**: 171-174
60. Fisher A, Smith CA, Thoden J, Smith R, Sutoh K, Holden HM, Rayment I (1995) *Biophys J* **68**: 19s-28s
61. Werber MM, Peysr YM, Muhrad A (1992) *Biochemistry* **31**: 7190-7197
62. Itakura S, Yamakawa H, Toyoshima YY, Ishijima A, Kojima T, Harada Y, Yanagida T, Wakabayashi T, Sutoh K (1993) *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1504-1510
63. Yount RG, Lawson D, Rayment I (1995) *Biophys J* **68**: 44s-49s
64. Wakabayashi K, Tokunga M, Kohno I, Sugimoto Y, Hamanaka T, Takezawa Y, Wakabayashi T, Amemiya Y (1992) *Science* **258**: 443-447
65. Sugimoto Y, Tokunaga M, Takezawa Y, Ikebe M, Wakabayashi K (1995) *Biophys J* **68**: 29s-34s
66. Reisler E (1982) *Methods Enzymol* **85**: 84-93
67. Wells JA, Yount RG (1982) *Methods Enzymol* **85**: 93-116
68. Pliszka B (1990) *Biochim Biophys Acta* **1040**: 89-94
69. Pliszka B (1993) *Biochem Mol Biol Int* **31**: 381-388
70. VanBuren P, Waller GS, Harris DE, Trybus KM, Warshaw DM, Lowey S (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12403-12407
71. Lowey S, Trybus KM (1995) *Biophys J* **68**: 120s-127s
72. Holmes KC (1994) *Curr Biol* **2**: 589-593
73. Koyama T, Mihashi K (1981) *Eur J Biochem* **114**: 33-38
74. Chen T, Haigentz M, Reisler E (1992) *Biochemistry* **31**: 2941-2946
75. Fievez S, Carlier M-F (1993) *FEBS Lett* **316**: 186-190
76. Kasprzak AA (1993) *J Biol Chem* **268**: 13261-13266
77. Oosawa F (1993) *Biophys Chem* **47**: 101-111
78. Erickson HP (1989) *J Mol Biol* **206**: 465-474
79. Prochniewicz E, Yanagida T (1990) *J Mol Biol* **216**: 761-772
80. Kwon H, Hardwicke PMD, Collins JH, Zhao X, Szent-Györgyi AG (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 555-562
81. Asakura S, Taniguchi M, Oosawa F (1963) *J Mol Biol* **7**: 55-69
82. Oosawa F (1983) W: Stracher A (red) *Muscle and Nonmuscle Motility* t. I. Academic Press Inc, str 151-216
83. Goldman YE, Huxley AF (1994) *Biophys J* **67**: 2131-2136

Please contact the Editors if you wish to advertise in „Postępy Biochemii” the products and services related to biochemistry, molecular biology and cell biology.

Molekularne mechanizmy zależnej od Ca^{2+} regulacji skurczu różnych typów mięśni

Molecular mechanisms for the Ca^{2+} -dependent regulation of various muscle types

RENATA DĄBROWSKA*

Spis treści:

- I. Ogólna charakterystyka głównych mechanizmów regulacji
- II. Akceptory Ca^{2+}
- III. Regulacja skurczu mięśni szkieletowych
- IV. Regulacja skurczu mięśni mięczaków i mięśni gładkich
IV-1. Mięśnie mięczaków
IV-2. Mięśnie gładkie
- V. Komplementarne mechanizmy regulacji

I. Ogólna charakterystyka głównych mechanizmów regulacji

Pomimo różnic w budowie aparatu skurczu i w aktywności różnych typów mięśni podstawowy mechanizm ich działania jest taki sam [1]. Również cykl skurczowo-rozkurczowy wszystkich typów mięśni kontrolowany jest przez stężenie Ca^{2+} w cytoplazmie komórki mięśniowej; wzrost stężenia tego kationu powyżej $1 \mu\text{M}$ powoduje skurcz, a spadek do poziomu

Contents:

- I. General characteristics of the main regulatory mechanisms
- II. Ca^{2+} -acceptors
- III. Regulation of skeletal muscle contraction
- IV. Regulation of molluscan and smooth muscle contraction
IV-1. Molluscan muscle
IV-2. Smooth muscle
- V. Complementary mechanisms of regulation

$0,1 \mu\text{M}$ rozkurez. Molekularny mechanizm wpływu Ca^{2+} na działanie aparatu skurczu jest różny dla różnych typów mięśni [2]. W tabeli 1 przedstawiono ogólną charakterystykę głównych mechanizmów regulacji skurczu trzech typów mięśni: szkieletowych i gładkich mięśni kręgowców oraz mięśni mięczaków.

Główny mechanizm regulacji skurczu mięśni szkieletowych funkcjonuje przy udziale białek związanych z aktyną, troponiny i tropomiozyny, które usytuowane są w rowkach podwójnej helisy filamentów aktynowych

Tabela 1.

Ogólna charakterystyka zależnej od Ca^{2+} regulacji skurczu różnych typów mięśni.

Typ mięśni	Mechanizm regulacji	Białka regulujące	Akceptor jonów wapnia	Białko docelowe akceptora jonów wapnia
mięśnie szkieletowe kręgowców	związany z aktyną	kompleks troponinowo-tropomiozynowy	troponina C	troponina I troponina T
mięśnie mięczaków	związany z miozyną	regulujące łańcuchy lekkie miozyny	istotne łańcuchy lekkie miozyny	regulujące łańcuchy lekkie miozyny łańcuch ciężki miozyny
mięśnie gładkie kręgowców	związany z miozyną	regulujące łańcuchy lekkie miozyny	kalmodulina	kinaza regulujących łańcuchów lekkich miozyny

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

wych [3-5] (Ryc. 1A, B, C). Polimery superhelikalnych dimerów tropomiozyny wiążą się z każdym z dwu łańcuchów monomerów w filamencie aktynowym

wiązaniem elektrostacyjnymi w taki sposób, że jedna cząsteczka tropomiozyny jest w kontakcie z siedmioma monomerami aktynowymi. Z każdą cząsteczką tropomiozyny związany jest kompleks troponinowy, który wiąże się także z aktyną. Tak więc każda z dwóch nici tworzących filament cienki może być rozpatrywana jako ciąg powtarzających się jednostek regulatorowych zawierających siedem monomerów aktyny, jeden dimer tropomiozynowy i jeden kompleks troponinowy. Troponina składa się z trzech podjednostek: troponiny I, która bierze udział w hamowaniu ATPazy aktomiozynowej, troponiny C, wiążącej Ca^{2+} i znoszącej hamowanie ATPazy przez troponinę I, oraz troponiny T, która wiąże tropomiozynę. Oddziaływania między podjednostkami kompleksu troponinowego, a także oddziaływania podjednostek troponiny z tropomiozyną i aktyną zależą od stężenia Ca^{2+} w komórce mięśniowej.

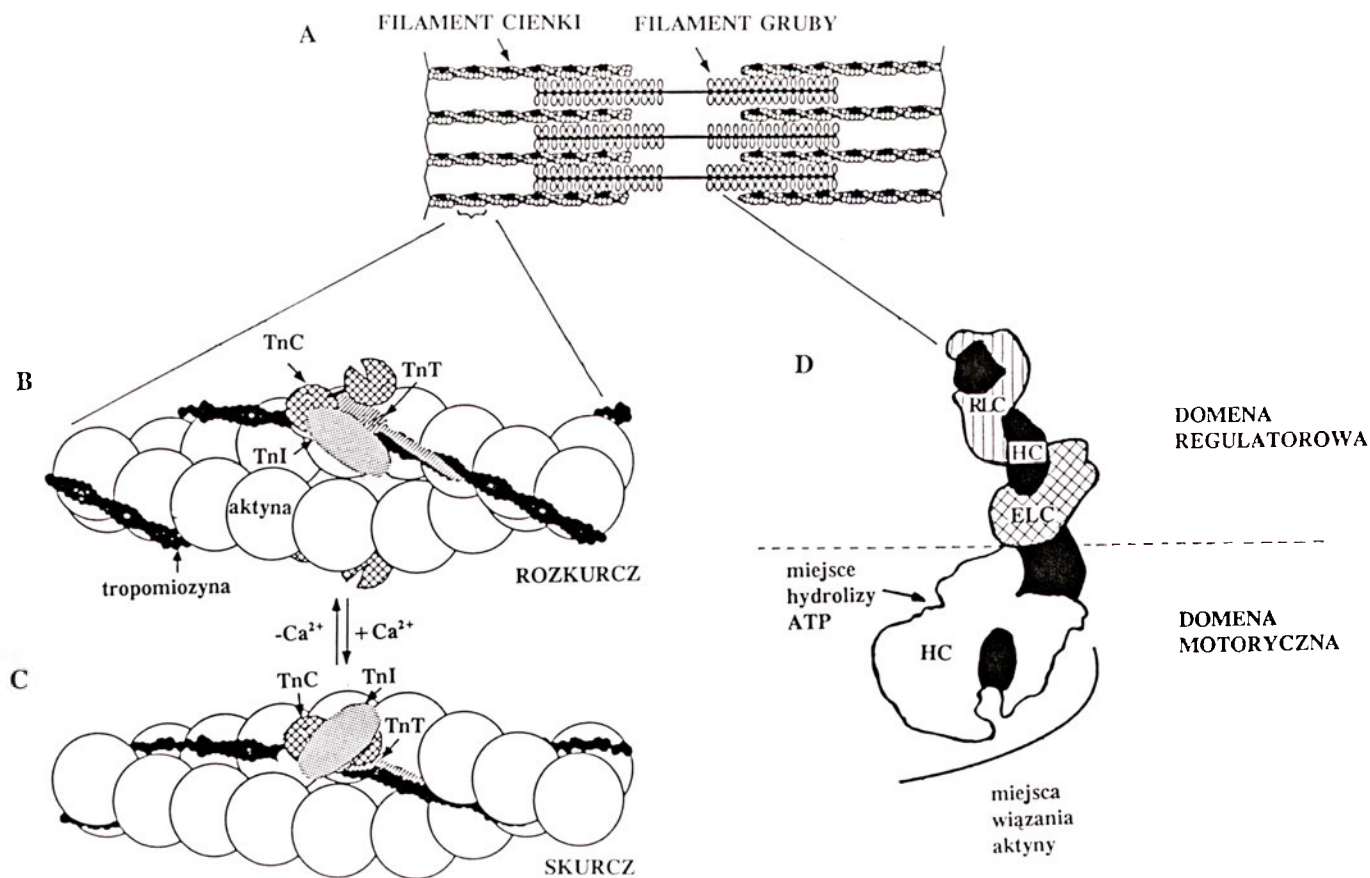
Główny mechanizm regulacji skurczu mięśni mięczaków i mięśni gładkich wiąże się z podjednostkami miozyny — łańcuchami lekkimi — usytuowanymi u podstawy główek miozynowych wysuniętych na zewnątrz filamentów miozynowych [6] (Ryc. 1 A, D). Miozyna izolowana z komórek mięśniowych, tzw. miozyna konwencjonalna (lub miozyna II) (patrz odn. [7]) zbudowana jest z dwóch fragmentów globularnych stanowiących główki, połączonych z długim (16

nm) odcinkiem superhelisy. Każda z główek składa się z domeny motorycznej (ok. 770 reszt aminokwasowych), zawierającej miejsce wiązania aktyny i miejsce hydrolizy ATP oraz tzw. szyjki (ok. 70 reszt aminokwasowych), do łańcucha ciężkiego której przyłączone są wiązaniem kowalencyjnymi dwa łańcuchy lekkie, istotny i regulujący [8]. Rejon szyjki miozyny odgrywa rolę regulującą działanie domeny motorycznej w mięśniach, w których mechanizm regulacji polega na modyfikacji cząsteczki miozyny, oraz rolę strukturalną we wszystkich typach mięśni [6, 9].

Akceptory Ca^{2+} podczas aktywacji skurczu różnych typów mięśni są różne, chociaż należą do rodziny białek homologicznych [10]. Białka z którymi reagują w procesie regulacji skurczu są specyficzne dla danego typu mięśni (Tab. 1).

II. Akceptory Ca^{2+}

Akceptorami Ca^{2+} w mięśniach szkieletowych, gładkich i mięśniach mięczaków są odpowiednio: troponina C, kalmodulina i łańcuchy lekkie miozyny. Należą one do homologicznych białek posiadających kilkakrotnie powielony motyw strukturalny, składający się z dwu odcinków α -helisy połączonych pętlą, której reszty aminokwasowe stanowią ligandy koordynujące Ca^{2+} . Motyw ten został po raz pierwszy zidentyfiko-

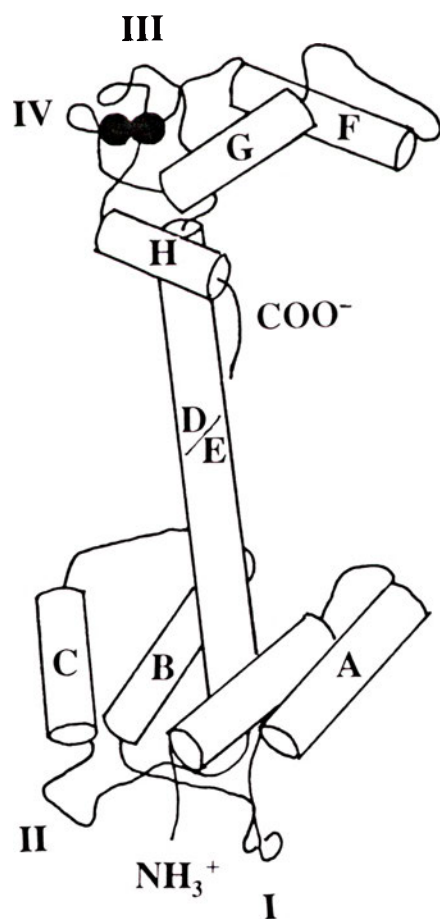


Ryc. 1. Schemat organizacji filamentów cienkich i grubych w sarkomerze mięśni szkieletowych kręgowców ilustrujący usytuowanie białek regulujących ich oddziaływanie (schemat wg F a r a h a i R e i n a c h a [5], rozszerzenie). (A) Budowa sarkomeru. (B) i (C). Budowa filamentu cienkiego i zależne od stężenia Ca^{2+} zmiany w oddziaływaniu tworzących go białek. TnC, TnI i TnT, składniki kompleksu troponinowego. (D) Budowa główki miozynowej. RLC, regulujący łańcuch lekki (ang. *regulatory light chain*); ELC, istotny łańcuch lekki (ang. *essential light chain*); HC, łańcuch ciężki (ang. *heavy chain*).

wany przez Kretsingera w krystalicznej strukturze parwalbuminy karpia wiążącej Ca^{2+} i nazwany motywem *EF hand* [11]. Prototypowa pętla zawiera 12 reszt aminokwasowych, z których pięć ma w łańcuchach bocznych grupy karboksylowe lub hydroksylowe rozmieszczone w precyzyjnie określonych miejscach, koordynujące Ca^{2+} ; szóstym ligandem jest cząsteczka wody. Powszechność tej strukturalnej zasady budowy białek wiążących Ca^{2+} została następnie potwierdzona dzięki analizie strukturalnej kryształów wielu przedstawicieli tej grupy [12].

Troponina C, kalmodulina i łańcuchy lekkie miozyny zawierają cztery strukturalne domeny *EF hand* [10, 12]. Jednakże domeny II, III i IV istotnych i regulujących łańcuchów lekkich, na skutek delecji lub podstawień aminokwasowych w pętlach koordynujących Ca^{2+} , utraciły zdolność jego wiązania [13]. Ponadto miejsca wiązania w pętlach domen III i IV troponiny C [14, 15] oraz domeny I regulującego łańcucha lekkiego [16] są niespecyficzne wobec Ca^{2+} ; prawdopodobnie *in vivo* wysycone są Mg^{2+} (którego stężenie w komórce tysiącrotnie przekracza stężenie Ca^{2+}) i nie biorą udziału w procesie regulacji.

Znana jest struktura krystaliczna zarówno troponiny C [17, 18], jak i kalmoduliny [19], natomiast



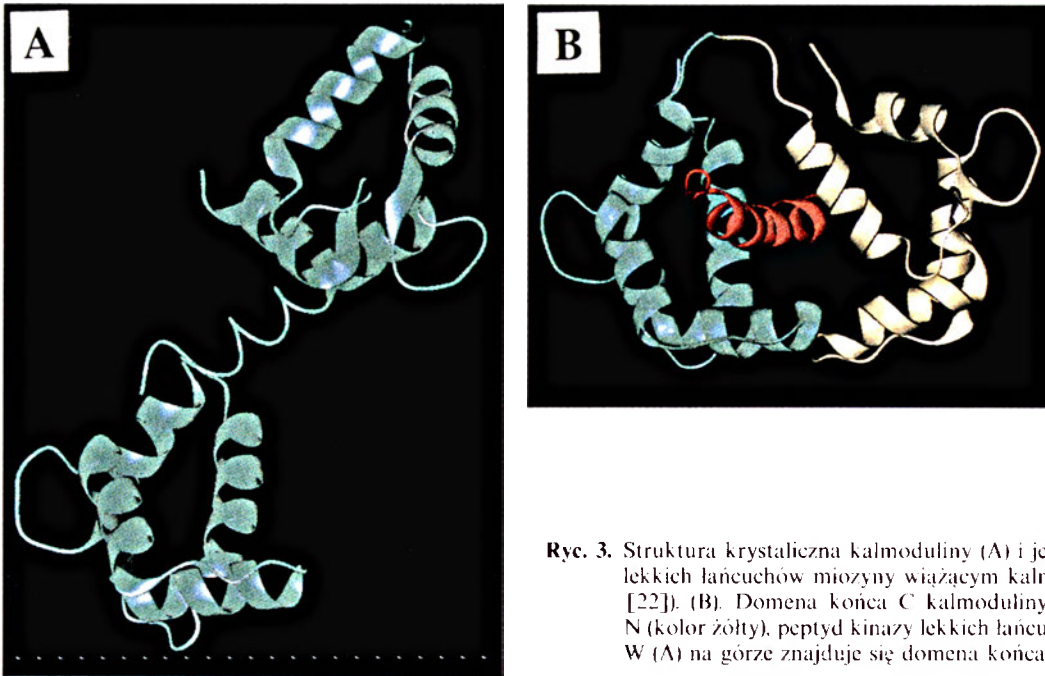
Ryc. 2. Struktura krystaliczna troponiny C (wg Herzberga i Jamesa [17] oraz Sundaralingama i wsp. [18]). A-H, odcinki helikalne, I-IV, pętla wiążące Ca^{2+} . Pełne kółka oznaczają dwa atomy wapnia silnie związanego obecne w strukturze krystalicznej troponiny C (nie odgrywające roli w regulacji).

struktura łańcuchów lekkich miozyny została poznana dzięki krystalizacji główki miozyny z mięśni szkieletowych [8] oraz domeny regulatorowej miozyny z mięśni mięczaków (patrz roz. IV-1). We wszystkich tych białkach domeny *EF-hand* rozmieszczone są parami, które utrzymują się dzięki wiązaniom hydrofobowym łańcuchów bocznych aminokwasów tworzących odcinki α -helis. Pary te, tworzące struktury globularne, połączone są długą, pojedynczą, centralną α -helisą, co nadaje cząsteczce białka kształt hantli [17-19] (Ryc. 2). Centralna α -helisa łącząca domeny odgrywa bardzo ważną rolę podczas zależnego od Ca^{2+} oddziaływania z białkami docelowymi [20]. Może ulegać rozwinięciu w giętką pętlę, jak to ma miejsce np. przy oddziaływaniu kalmoduliny z peptydem docelowym kinazy lekkich łańcuchów miozyny [21] (Ryc. 3). Kalmodulina owijając go przyjmuje strukturę globularną, a domeny wiążące Ca^{2+} przechodzą z konfiguracji *trans* w *cis*. Podobną strukturę ma kompleks istotnego łańcucha lekkiego miozyny z łańcuchem ciężkim [8]. (Ryc. 4). Na podstawie struktury kompleksu regulującego łańcucha lekkiego z łańcuchem ciężkim można przypuszczać, że ich oddziaływaniu nie towarzyszą tak dramatyczne zmiany konformacyjne: zmianie ulega prawdopodobnie tylko domena końca C regulującego lekkiego łańcucha, natomiast domena końca N jest identyczna z domeną końca N kalmoduliny. Także podczas oddziaływania troponiny C z troponiną I kształt cząsteczki troponiny C nie ulega znacznym zmianom [23].

Krystaliczna struktura troponiny C, kalmoduliny i łańcuchów lekkich miozyny pozbawionych Ca^{2+} nie została jeszcze określona. Za pomocą metod fizykochemicznych (NMR, CD, przeniesienie energii fluorescencji między parami znaczników) i biochemicznych (elektroforeza, ograniczona proteoliza) wykazano, że wiązaniu Ca^{2+} z troponiną C i z kalmoduliną towarzyszą znaczne zmiany w strukturze tych białek [14, 15]. Przypuszcza się, że przesunięcie rejonów helikalnych względem siebie otwiera w każdej z dwu domen cząsteczki tych białek hydrofobowe kieszenie, które służą oddziaływaniu z białkami docelowymi (troponiną I i troponiną T w przypadku troponiny C, i kinazą lekkich łańcuchów miozyny w przypadku kalmoduliny) [14]. W nieobecności Ca^{2+} α -helikalne odcinki łańcucha polipeptydowego przyjmują konformację ściśle upakowaną wokół centralnej α -helisy, uniemożliwiają w ten sposób oddziaływanie z białkami docelowymi.

III. Regulacja skurczu mięśni szkieletowych

Dla wyjaśnienia mechanizmu regulacji skurczu mięśni szkieletowych przez kompleks troponinowo-tropomiozynowy, który *in vitro*, w nieobecności Ca^{2+} , hamuje aktywność enzymatyczną aktomiozyny [24] i ruch filamentów aktynowych wobec immobilizowanej miozyny [25], wykorzystano początkowo metodę nisko-



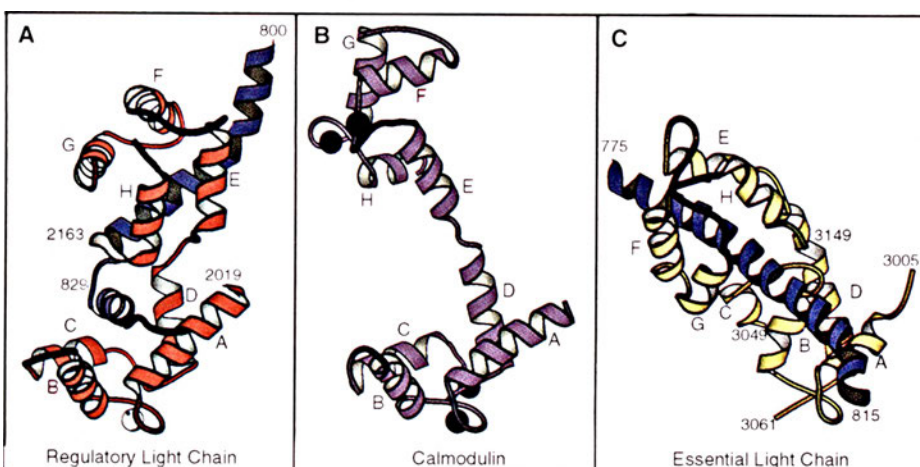
Ryc. 3. Struktura krystaliczna kalmoduliny (A) i jej kompleksu z peptydem kinazy lekkich łańcuchów miozyny wiążącym kalmodulinę (wg *Jamesa i w.s.p.* [22]). (B). Domena końca C kalmoduliny (kolor zielony) domena końca N (kolor żółty), peptyd kinazy lekkich łańcuchów miozyny (kolor czerwony). W (A) na górze znajduje się domena końca C, na dole domena końca N.

kątowej dyfrakcji promieni rentgenowskich na włóknach mięśniowych. Metoda ta umożliwiła śledzenie zmian w położeniu tropomiozyny względem filamentu aktynowego poprzez pomiar rozkładu i intensywności odpowiadających temu białku refleksów świetlnych. W oparciu o wyniki tych badań *Huxley* [26] i *Hasselgrove* [27] zaproponowali na początku lat siedemdziesiątych tzw. model blokowania przestrzennego, według którego w nieobecności Ca^{2+} (tj. w stanie rozkurczu mięśni), tropomiozyna zasłania miejsce wiązania miozyny na filamencie aktynowym (Ryc. 1B). Zwiększenie stężenia jonowego wapnia inicjuje proces skurczu przez wiązanie go z troponiną C, co powoduje zwiększenie siły wiązania między trzema podjednostkami troponiny (troponiną C, I i T) i osłabienie wiązania tych podjednostek z aktyną i tropomiozyną. Te zmiany w oddziaływaniu białek powodują zmianę pozycji tropomiozyny i ekspozycję miejsc wiązania miozyny na aktynie (Ryc. 1C).

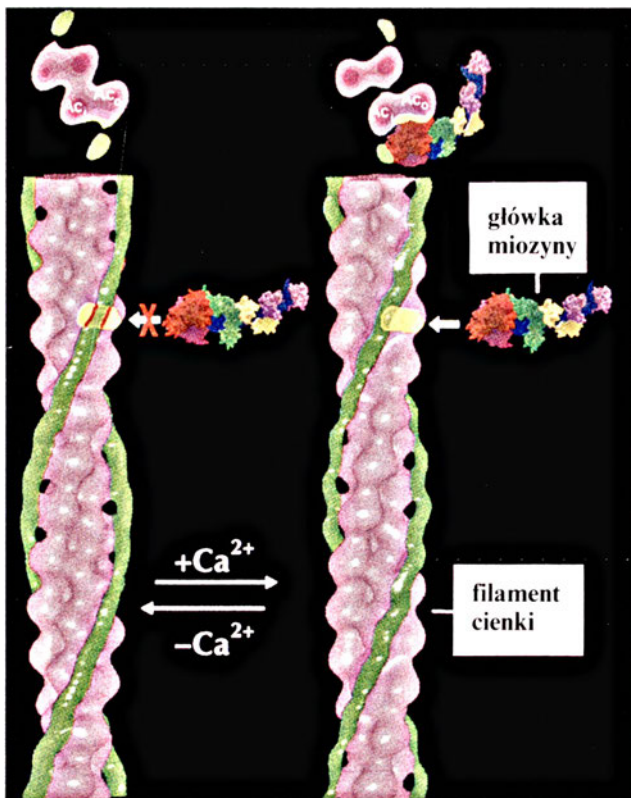
Model ten wielokrotnie poddawano w wątpliwość. Największą konkurencję stanowił dla niego model allosteryczny (zwany również kinetycznym), który po-

wstał w oparciu o wyniki pomiarów wiązania zawierających domenę motoryczną rozpuszczalnych fragmentów miozyny (zwanymi subfragmentami 1 i odpowiadających główkom miozynowym) z aktyną w jej kompleksie z troponiną i tropomiozyną w obecności ATP. Stwierdzono, że usunięcie Ca^{2+} nie zapobiega łączeniu miozyny z aktyną, ale powoduje aż trzydziestokrotny spadek szybkości hydrolizy ATP przez kompleks aktomiozynowy [4, 28]. Okazało się więc, że tropomiozyna wraz z troponiną mogą hamować hydrolizę ATP nie blokując wiązania miozyny z aktyną. W odpowiedzi na wzrost stężenia Ca^{2+} kompleks tropoinowo-tropomiozynowy indukuje allosteryczne zmiany konformacji aktyny przyspieszając hydrolizę ATP. Postuluje się, że kontroli przez kompleks tropoinowo-tropomiozynowy podlega w sposób pośredni przejście miozyny ze stanu słabego wiązania do stanu silnego wiązania z aktyną, które sprzężone jest z uwolnieniem reszt fosforanowych z kompleksu enzym-produkt i generacją siły przez mięsień [4].

W ostatnich latach sceptycyzm dotyczący modelu blokowania przestrzennego został przełamany dzięki



Ryc. 4. Struktura krystaliczna kompleksów łańcuchów lekkich: regulującego (RLC) (A) i istotnego (ELC) (C) z łańcuchem ciężkim (HC) (wg *Raymenta i w.s.p.* [8]). Dla porównania pokazano strukturę kalmoduliny (B). Oznaczenia odcinków helikalnych jak na rycinie 2. HC (kolor granatowy), RLC (kolor czerwony) i ELC (kolor żółty).



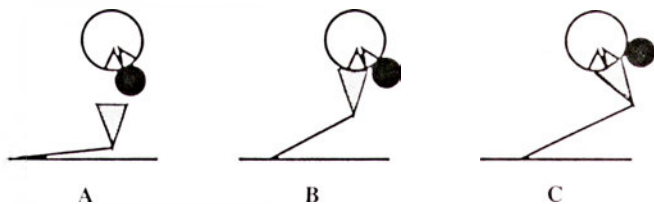
Ryc. 5. Trójwymiarowe rekonstrukcje natywnych filamentów cienkich skrzyplacza w nieobecności i w obecności Ca^{2+} (wg Reedy i wsp. [30]). Aktyna (kolor różowy), tropomiozyna (kolor zielony), powierzchnia kontaktu aktyny z miozyną (kolor żółty), fragmenty łańcucha ciężkiego główki miozynowej (kolory czerwony, zielony i granatowy), łańcuchy lekkie istotny i regulujący (kolor żółty i fioletowy). Góra, przekrój poprzeczny; dół, przekrój podłużny. Ac_0 i Ac_1 oznaczają odpowiednio zewnętrzną i wewnętrzną domene protomeru aktynowego.

trójwymiarowej rekonstrukcji struktury filamentów cienkich mięśni skrzyplacza uzyskanej metodą optycznej dyfrakcji ich obrazów mikroskopowych [29]. Pokazała ona, że w nieobecności Ca^{2+} polimery tropomiozynowe znajdują się w centrum miejsca wiązania protomerów aktyny z główkami miozyny; Ca^{2+} indukuje ich obrót o kąt ok. 25° wokół filamentu aktynowego (od domeny zewnętrznej do domeny wewnętrznej protomerów aktyny) do pozycji, w której tylko w niewielkim stopniu przykrywają one miejsca wiązania główki miozynowej [30] (Rys. 5). W poprzednio otrzymanych rekonstrukcjach filamentów cienkich mięśni kręgowców w stanie rozkurczu [31] ustalenie pozycji polimerów tropomiozyny na filamencie aktynowym było utrudnione z powodu jej niestabilności w nieobecności Ca^{2+} . Użycie przez Lehmana i wsp. [29] cienkich filamentów z mięśni stawonoga, gdzie większy (o ok. 20 kDa) niż w mięśniach kręgowców kompleks troponinowy [32] zapewnił stabilność pozycji tropomiozyny, umożliwiło autorom określenie wpływu Ca^{2+} na miejsce jej asocjacji z aktyną.

Ostatnio, stosując nową metodę otrzymywania cienkich filamentów, dostosowaną do badań mikroskopowych, udało się również określić pozycję tropomiozyny w czasie rozkurczu mięśni kręgowców [33]. Wpisanie atomowego modelu filamentu aktynowego do obwiedni trójwymiarowej rekonstrukcji filamentu cienkiego pokazało, że w stanie rozkurczu mięśni miejsca protomerów aktyny, wytwarzające silny stereospecyficzny kompleks z główkami miozyny, są zakryte przez tropomiozynę. Ponadto, w nowych badaniach rentgenograficznych na mięśniu szkieletowym kręgowców potwierdzono zmianę pozycji tropomiozyny przy przejściu mięśnia ze stanu spoczynku w stan aktywny

nawet wówczas, gdy mięsień jest rozciągnięty w takim stopniu, że kontakt filamentów aktynowych i miozynowych jest przerwany [34]. Przesunięcie tropomiozyny nie mogło więc być skutkiem reagowania główki miozynowej z aktyną. Wszystkie te obserwacje pozwalają przypuszczać, że usytuowanie tropomiozyny w obecności Ca^{2+} na skraju rejonu protomerów aktyny wiążących miozynę umożliwia wstępne, słabe wiązanie główek miozyny. Silnie związany kompleks główek miozyny z aktyną może być wytworzony dopiero w wyniku dalszego niewielkiego obrotu (ok. 5°) tropomiozyny (na co wskazuje pozycja tropomiozyny w rekonstrukcjach filamentów aktynowych dekorowanych subfragmentami I miozyny z obrazów mikroskopowych [31]). W ten sposób konieczna dla skurczu oscylacja między stanami silnego i słabego połączenia główek miozynowych z filamentem aktynowym byłaby uzależniona od regulowanego przez Ca^{2+} położenia tropomiozyny [35].

Przedstawione wyniki badań strukturalnych są zgodne z wynikami badań biochemicznych wskazującymi na występowanie przynajmniej trzech (a nie dwóch opisywanych poprzednio) stanów filamentu cienkiego, zależnych od położenia tropomiozyny: stanu zablokowanego (w nieobecności Ca^{2+}), w którym miozyna nie może reagować z aktyną, przejściowego stanu „zamkniętego” dla silnego oddziaływania aktyny z miozyną (w obecności Ca^{2+}), pozwalającego na wytworzenie słabego stereospecyficznego wiązania obu białek i stanu w pełni odblokowanego (w obecności Ca^{2+}) pozwalającego na wytworzenie silnego wiązania między aktyną i miozyną [36, 37] (Ryc. 6). Pełne odblokowanie dokonuje się dzięki kooperatywnemu wiązaniu główek miozyny z filamentem aktynowym przy udziale



Ryc. 6. Schemat ilustrujący trzy stany filamentu cienkiego w mięśniach szkieletowych kręgowców (wg Geesesa i Conibeara [37]). (A) stan zablokowany — tropomiozyna (czarne kółko) zasłania miejsca wiązania główki miozynowej (odwrócony szary trójkąt) z protomerem aktynowym (puste kółko z zaznaczonymi w postaci trójkątów miejscami wiązania główki), nie dopuszczając do wytworzenia kompleksu aktomiozynowego. (B) stan „zamknięty” — tropomiozyna zasłania jedno z miejsc wiązania pozwalając na wytworzenie słabo związanego kompleksu aktomiozynowego. (C) stan „otwarty” (odblokowany) — tropomiozyna odsłania obydwa miejsca wiązania aktyny z główką miozyny, wytwarza się silnie związany kompleks aktomiozynowy.

kompleksu troponinowo-tropomiozynowego. Wykazano, że jedna główka miozyny w stanie silnego wiązania z aktyną może w sposób kooperatywny „odkryć” 5-6 dalszych miejsc wiążących na filamencie aktynowym jeśli zawiera on tropomiozynę. Obecność troponiny zwiększa liczbę miejsc „odkrytych” do 10-12, co wskazuje, że troponina wzmacnia łączność pomiędzy sąsiednimi „jednostkami kooperatywnymi” filamentu cienkiego [38].

Wszystkie te nowe informacje dowodzą, że molekularny mechanizm regulacji skurczu mięśni szkieletowych jest bardziej złożony niż zakładano wcześniej, chociaż pozostały w nim główne elementy proponowane zarówno w modelu blokowania przestrzennego, jak i w modelu allosterycznym.

IV. Regulacja skurczu mięśni mięczaków i mięśni gładkich

IV-1. Mięśnie mięczaków

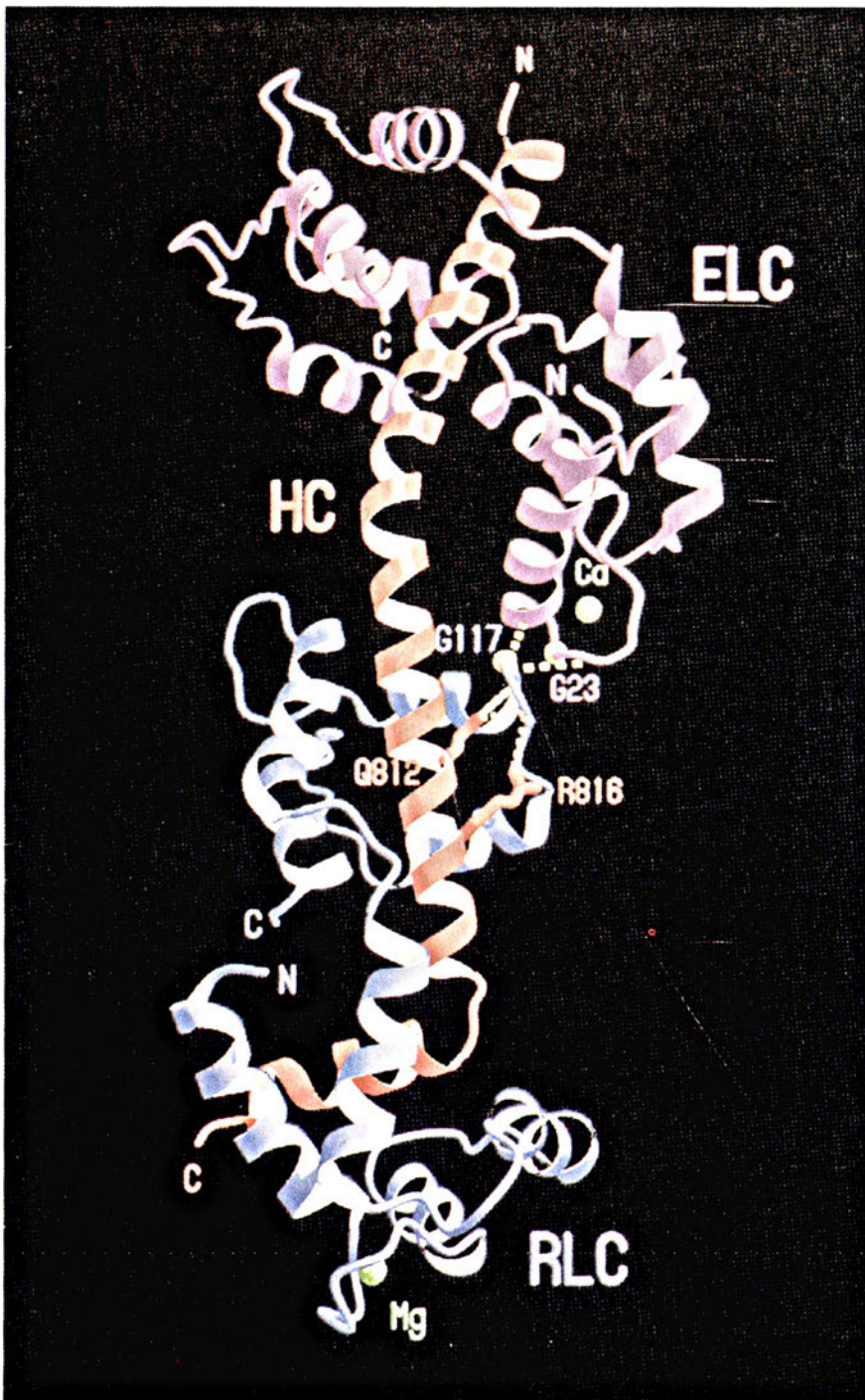
Aktywacja ATPazy miozyny z mięśni mięczaków przez aktynę [39], ruch filamentów aktynowych wobec immobilizowanej miozyny mięczaków (w tekście ruchliwości *in vitro*) [40], a także generacja siły przez mięśnie mięczaków [41], następują w wyniku wiązania Ca^{2+} z domeną regulatorową miozyny. Miozyna pozbawiona regulujących łańcuchów lekkich nie podlega regulacji: nie wiąże Ca^{2+} i ma wysoką aktywność stymulowanej przez aktynę ATPazy niezależnie od stężenia Ca^{2+} , co wskazuje, że w nieobecności Ca^{2+} regulujące łańcuchy lekkie hamują oddziaływanie aktyny z miozyną [42]. W laboratorium Szent-Györgyiego za pomocą enzymów proteolitycznych papainy i klostripainy otrzymano fragment główki miozyny małża — przegrzebka — zawierający kompleks złożony z istotnego i regulującego łańcucha lekkiego oraz krótkiego (8,5 nm), 10 kDa fragmentu łańcucha ciężkiego, stanowiący w istocie domenę regulatorową [43]. Domenę tę wykrystalizowano w postaci związanej z Ca^{2+} i określono jej strukturę z rozdziel-

czością do 0,28 nm (Ryc. 7). W ten sposób pokazano, że łańcuchy lekkie — istotny i regulujący — występują w tandemie, stabilizując helikalny fragment łańcucha ciężkiego. Regulujący łańcuch lekki owija rejon końca C, a istotny łańcuch lekki rejon końca N fragmentu łańcucha ciężkiego. Miejsce wiązania Ca^{2+} stanowi nietypowa struktura *EF hand* (patrz rozdz. II), tworzą ją 9 reszt aminokwasowych pętli domeny I istotnego łańcucha lekkiego, ale specyficzność i siła wiązania Ca^{2+} zależą od połączeń istotnego łańcucha z łańcuchami regulującym i ciężkim [44]. Kluczową resztą aminokwasową stabilizującą te połączenia, jak wykazały badania przeprowadzone za pomocą mutagenazy punktowej, jest glicyna 117 regulującego łańcucha lekkiego, która tworzy mostki wodorowe pomiędzy jego domeną III i IV oraz domeną I istotnego łańcucha lekkiego [45]. Zastąpienie jej cysteiną lub alaniną znosi zdolność miozyny przegrzebka do wiązania Ca^{2+} . Krytyczna dla funkcji miozyny mięczaków reszta glicynowa została zachowana w homologicznych regulujących łańcuchach lekkich miozyny mięśni gładkich, ale nie szkieletowych (gdzie w miejscu glicyny występuje cysteina). Dlatego po usunięciu regulujących łańcuchów z miozyny mięczaków jej aktywność może być przywrócona tylko po związaniu z regulującymi łańcuchami z mięśni mięczaków lub z mięśni gładkich [42]. Ponad 400 wiązań, głównie van der Waalsa, łączy obydwa łańcuchy lekkie z ciężkim poprzez zawierające ok. 23-25 reszt aminokwasowych tzw. motywy IQ (IQXXRGGXXR) obecne w tej lub nieco zmienionej postaci we fragmencie łańcucha ciężkiego domeny regulatorowej [43]. Ten motyw aminokwasowy znaleziono wcześniej w rejonie szyjki niektórych niekonwencjonalnych miozyn, gdzie służy wiązaniu kalmoduliny, spełniającej wówczas rolę regulujących łańcuchów lekkich [7].

Jakkolwiek struktura domeny regulatorowej w stanie rozkurczu mięśni mięczaków nie jest znana, przypuszcza się, że usunięcie Ca^{2+} powoduje jej destabilizację, zachodzącą w wyniku zmian w oddziaływaniu między łańcuchami lekkimi i ciężkim.

IV-2. Mięśnie gładkie

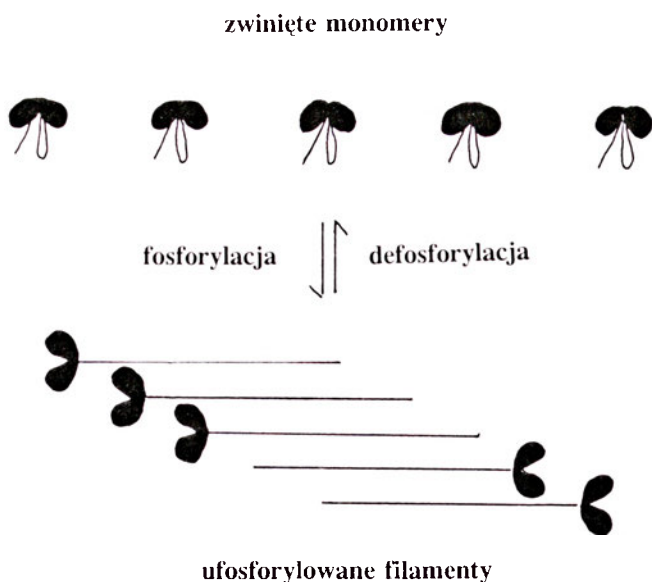
Miozyna z mięśni gładkich nie wiąże Ca^{2+} na skutek zmian w sekwencji aminokwasowej istotnego łańcucha lekkiego odpowiedzialnej za wiązanie tego kationu [6]. Główny mechanizm regulacji skurczu mięśni gładkich polega na fosforylacji reszty serynowej (w pozycji 19) regulujących łańcuchów lekkich. Reakcja fosforylacji jest katalizowana przez specyficzną kinazę, której podjednostkę regulatorową stanowi kompleks Ca^{2+} z kalmoduliną [46, 47]. Fosforylacja regulujących łańcuchów lekkich z mięśni gładkich, podobnie jak wiązanie Ca^{2+} z domeną regulatorową miozyny mięśni mięczaków, kontroluje jej zdolność do oddziaływania z aktyną i hydrolizy ATP. Defosforylacja przez specyficzną fosfatazę zazwyczaj czyni miozynę



Ryc. 7. Struktura krystaliczna domeny regulatorowej głowki miozynowej mięśni przegrzebka (wg Trybus [6]). Regulujący łańcuch lekki (RLC) (kolor niebieski), istotny łańcuch lekki (ELC) (kolor różowy), łańcuch ciężki (kolor czerwony), miejsca wiązania Ca^{2+} w domenie I ELC i Mg^{2+} w domenie I RLC (oznaczone kolorem zielonym), wiązania wodorowe między łańcuchami lekkimi i ciężkim kluczowe dla regulacji (oznaczone żółtą linią przerywaną).

nieaktywną. Te zmiany funkcjonalne wywołane są zmianami konformacji miozyny. W badaniach *in vitro* wykazano, że nieufosforylowana miozyna występuje w nieaktywnej konformacji zwiniętej, która blokuje uwalnianie produktów hydrolizy ATP i tworzenie filamentów [48, 49] (Ryc. 8). Miozyna ufosforylowana przyjmuje konformację wyprostowaną, aktywną, która przy zbliżonych do fizjologicznych wartościach pH i siły jonowej może tysiąc razy szybciej uwalniać produkty hydrolizy ATP, a także wytwarzać stabilne filanty [46, 48]. Podobnym zmianom konformacyjnym podlega miozyna z mięśni mięczaków, chociaż w bardziej ograniczonym zakresie warunków jonowych środowiska [50]. Jakkolwiek badania mikroskopowe wykazały, że w warunkach *in vivo* filanty

miozyny z mięśni gładkich są trwale i nie ulegają dysocjacji niezależnie od stanu fizjologicznego mięśni [51, 52], przypuszcza się, że w cząsteczkach miozyny zorganizowanych w filanty zachodzą pod wpływem fosforylacji podobne zmiany konformacyjne do opisanych *in vitro*. Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe w konformacji zwiniętej miozyny są prawdopodobnie zastąpione oddziaływaniami międzycząsteczkowymi (między częścią pałeczkowatą jednej cząsteczki miozyny i główką cząsteczki sąsiedniej). Taki mechanizm potwierdzają obserwacje wskazujące na to, że warunkiem *sine qua non* regulacji jest obecność odpowiedniej długości części pałeczkowatej miozyny [53]. Sama główka miozyny mięśni gładkich, podobnie jak główka miozyny mięśni mięczaków zawierająca łańcuchy lek-



Ryc. 8. Zmiany konformacyjne miozyny z mięśni gładkich pod wpływem fosforylacji jej regulujących łańcuchów lekkich (wg Sweeney i wsp. [49]).

kie, jest zawsze aktywna i nie regulowana, podczas gdy ciężka meromiozyna zawierająca obydwie główki i fragment części pałeczkowatej podlega regulacji [9].

Badania ostatnich lat wykonane za pomocą technik biologii molekularnej pozwoliły wyjaśnić szereg szczegółów związanych z mechanizmem regulacji polegającym na modyfikacji miozyny. W badaniach tych otrzymywano mutanty łańcuchów lekkich z wymienionymi lub wydeletowanymi resztami aminokwasowymi, a następnie zastępowano nimi natywne łańcuchy lekkie w cząsteczce miozyny. Otrzymywano też chimery łańcuchów lekkich, w których skład wchodziła np. część łańcucha lekkiego z mięśni gładkich lub mięczaków, a część z łańcucha lekkiego z mięśni szkieletowych. Właściwości motoryczne tak zrekonstruowanych cząsteczek miozyny badano za pomocą pomiaru aktywności ATPazy aktomiozynowej lub testu ruchliwości *in vitro*. W ten sposób wykazano, że tworzenie zwiniętej struktury miozyny monomerycznej z mięśni gładkich zależy od elektrostatycznych oddziaływań między fragmentem końca N regulującego łańcucha lekkiego i zwiniętym u nasady główki łańcuchem ciężkim, a także z drugą główką, natomiast zredukowanie ładunku w pobliżu seryny ulegającej fosforylacji prowadzi do wyprostowania cząsteczki [49, 53-56]. Samo wyprostowanie cząsteczki miozyny nie wystarcza jednak dla jej aktywności motorycznej [49]. Wykazano ponadto, że w regulacji skurczu mięśni gładkich, podobnie jak mięśni mięczaków, bardzo ważną rolę odgrywa rejon końca C regulującego łańcucha lekkiego (IV domena *EF hand*), w którym znajduje się główne, niezależne od fosforylacji i wiązania Ca^{2+} , miejsce jego połączenia z łańcuchem ciężkim [57-59]. Jest on prawdopodobnie odpowiedzialny za transmisję zmian konformacyjnych, zachodzących w N-końcowym fragmencie regulującego łańcucha lekkiego, do łańcucha ciężkiego. Sugerowana w mode-

lu atomowym główki miozyny niewielka odległość między N- i C-końcową połową regulującego łańcucha lekkiego dzięki owinięciu go wokół łańcucha ciężkiego [8] (Ryc. 1D i Ryc. 3A) ułatwiałaby przekazywanie informacji.

W odróżnieniu od mięśni mięczaków, istotne łańcuchy lekkie nie odgrywają roli w molekularnym mechanizmie regulacji skurczu mięśni gładkich [53]. Jeśli więc istnieje wspólny mechanizm regulacji związanej z modyfikacją końca N regulującego łańcucha lekkiego miozyny (poprzez fosforylację albo wiązanie Ca^{2+}), to przepływ informacji z domeny regulatorowej do odległej o ok. 10 nm domeny motorycznej główki miozynowej zależy głównie od wymienionych wyżej oddziaływań między regulującym i ciężkim łańcuchem. Zmiany w tym oddziaływaniu wywołane usunięciem Ca^{2+} mogą prowadzić do zaburzeń superhelikalnej struktury łańcucha ciężkiego, co z kolei wpływa na funkcjonowanie domeny motorycznej [6, 43]. Według obecnych hipotez, domena regulatorowa odgrywa również ważną rolę w sprzężeniu mechanochemicznym, działając jak ramię dźwigni wzmacniającej stosunkowo małe zmiany strukturalne zachodzące w domenie motorycznej [8, 60]. Wywołana w ten sposób znaczna rotacja dystalnego w stosunku do domeny motorycznej końca łańcucha ciężkiego główki miozynowej powodowałaby przesuwanie filamentu aktynowego.

V. Komplementarne mechanizmy regulacji

Celem artykułu było omówienie aktualnych poglądów na temat głównych mechanizmów regulacji skurczu różnego typu mięśni. Oprócz tych ostatnich istnieją mechanizmy komplementarne, modyfikujące działanie aparatu skurczu [61, 62]. Na przykład, fosforylacja regulujących łańcuchów lekkich w mięśniach szkieletowych zwiększa ich wrażliwość na Ca^{2+} sprawiając, że skurcz zachodzi przy niższym stężeniu tego kationu [63], a w mięśniach skrzydeł *Drosophila* determinuje ich zdolność do wykonania pracy [64]. Działanie białek mięśni gładkich kaldesmonu i kalponiny, związanych podobnie jak troponina z filamentami aktynowymi, odgrywa prawdopodobnie rolę podczas rozkurczu mięśni gładkich [65-67], w których nie zawsze defosforylacja skorelowana jest z relaksacją włókien mięśniowych [68, 69].

Artykuł otrzymano 11 stycznia 1996 r.
Zaakceptowano do druku 21 lutego 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Strzelecka-Golaszewska H (1996) *Post Biochem* **42**: 185-194
2. Dąbrowska R (1987) W: Kuźnicki L (red) Komórka — jej budowa i ruch. Ossolineum, Wrocław, str 93-132
3. Ebashi S, Endo M (1969) *Progr Biophys Molec Biol* **18**: 123-183
4. Chalovich JM (1992) *Pharmacol Ther* **55**: 95-148
5. Farah C S, Reinach F C (1995) *FASEB J* **9**: 755-767

6. Trybus K (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 587-594
7. Dąbrowska R (1994) *Post Biochem* **40**: 91-96
8. Rayment Y, Rypniewski WR, Schmidt-Bäse K, Smith R, Tomchick DR, Benning MM, Winkelmann DA, Wesenberg G, Holden HM (1993) *Science* **261**: 50-58
9. Lowey S, Trybus KM (1994) *Biophys J* **68**: 1208-1275
10. Kretsinger RH (1980) *CRC Crit Rev Biochem* **8**: 119-174
11. Kretsinger RH, Nockolds CE (1973) *J Biol Chem* **248**: 3313-3326
12. Heizmann CW, Hunziker W (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 98-103
13. Collins JH (1991) *J Muscle Res Cell Motil* **12**: 3-25
14. Strynadka NCJ, James MNG (1989) *Annu Rev Biochem* **58**: 951-998
15. Grabarek Z, Tao T, Gergely J (1992) *J Muscle Res Cell Motil* **13**: 383-393
16. DaSilva AC, Reinach FC (1991) *Trends Biochem Sci* **16**: 53-57
17. Herzberg O, James MNG (1985) *Nature (Lond)* **313**: 653-659
18. Sundaralingam M, Bergstrom R, Strasburg G, Rao ST, Roychowdhury P, Greaser ML (1985) *Science* **227**: 947-948
19. Babu YS, Bugg CE, Cook WJ (1988) *J Mol Biol* **204**: 191-204
20. Putkey JA, Ono T, VanBerkum MFA, Means AR (1988) *J Biol Chem* **263**: 11242-11249
21. Ikura M, Clore GM, Angela M, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A (1992) *Science* **256**: 632-638
22. James P, Vorherr T, Carafoli E (1995) *Trends Biochem Sci* **20**: 38-42
23. Olah GA, Trehwella J (1994) *Biochemistry* **33**: 12800-12806
24. Drabikowski W, Dąbrowska R, Baryłko B (1973) *Acta Biochim Polon* **20**: 181-199
25. Frazer IDC, Marston SB (1995) *J Biol Chem* **270**: 7836-7841
26. Huxley HE (1972) *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* **37**: 361-376
27. Haselgrove JC (1972) *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* **37**: 341-352
28. Chalovich JM, Eisenberg E (1982) *J Biol Chem* **257**: 2432-2437
29. Lehman W, Craig R, Vibert P (1994) *Nature (Lond)* **368**: 65-67
30. Reedy MK, Reedy MC, Schachat F (1940) *Cur Biol* **4**: 624-626
31. Milligan RA, Wittaker M, Safer D (1990) *Nature (Lond)* **348**: 217-222
32. Lehman W, Regenstein JM, Ranson AL (1976) *Biochim Biophys Acta* **434**: 215-222
33. Lehman W, Vibert P, Uman P, Craig R (1995) *J Mol Biol* **251**: 191-196
34. Poole KV, Holmes KC, Rayment I, Lorenz M (1994) *Biophys J* **68**: 348s
35. Holmes KC (1995) *Biophys J* **68**: 2s-7s
36. Geeves MA (1991) *Biochem J* **274**: 1-14
37. Geeves MA, Conibear PB (1995) *Biophys J* **68**: 194s-201s
38. Geeves MA, Lehrer SS (1994) *Biophys J* **67**: 273-282
39. Szent-Györgyi AG, Szentkiralyi EM, Kendrick-Jones J (1973) *J Mol Biol* **74**: 179-203
40. Vale RD, Szent-Györgyi AG, Sheez MP (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6775-6778
41. Simmons RD, Szent-Györgyi AG (1980) *Nature (Lond)* **286**: 626-628
42. Scholley JM, Taylor K, Kendrick-Jones J (1981) *Biochimie* **63**: 255-271
43. Xie X, Harrison DH, Schlichting I, Sweet RM, Kalabokis VN, Szent-Györgyi AG, Cohen C (1994) *Nature (Lond)* **368**: 306-312
44. Kalabokis VN, O'Neill-Hennessey, Szent-Györgyi AG (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 547-553
45. Jancsó A, Szent-Györgyi AG (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8762-8766
46. Dąbrowska R (1992) *Post Biochem* **38**: 2-5
47. Allen BG, Walsh MP (1994) *Trends Physiol Sci* **19**: 362-368
48. Cross RA (1988) *J Muscle Res Cell Motil* **9**: 108-110
49. Sweeney HL, Yang Z, Zhi G, Stull JT, Trybus KM (1994) *Biochemistry* **33**: 1490-1494
50. Ankrett RJ, Rowe AJ, Cross RA, Kendrick-Jones J (1991) *J Mol Biol* **217**: 323-335
51. Somlyo AV, Butler TM, Bond M, Somlyo AP (1981) *Nature (Lond)* **294**: 567-569
52. Horowitz A, Trybus KM, Browman DS, Fay FS (1994) *J Cell Biol* **126**: 1195-1200
53. Trybus K (1994) *J Biol Chem* **269**: 20819-20822
54. Wolff-Long WL, Saraswat LD, Lowey S (1993) *J Biol Chem* **268**: 23162-23167
55. Ikebe M, Ikebe R, Kamisoyama H, Reardon S, Schwonek JP, Sanders CR, Matsuura M (1994) *J Biol Chem* **269**: 28173-28180
56. Cremo CR, Sellers JR, Facemyer KC (1995) *J Biol Chem* **270**: 2171-2175
57. Trybus KM, Chatman TA (1993) *J Biol Chem* **268**: 4412-4419
58. Ikebe M, Reardon S, Mitani Y, Kamisoyama H, Matsuura M, Ikebe R (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9096-9100
59. Trybus KM, Waller GS, Chatman TA (1994) *J Cell Biol* **124**: 963-969
60. Vibert P, Cohen C (1988) *J Muscle Res Cell Motil* **9**: 296-305
61. Stepkowski D (1995) *FEBS Lett* **374**: 6-11
62. Dąbrowska R (1994) W: Reaburn D, Giembycz MA, (red) Airways Smooth Muscle: Biochemical Control of Contraction and Relaxation. Birkhäuser Verlag, Basel, str 31-59
63. Sweeney HL, Browman BF, Stull JT (1993) *Am J Physiol* **264**: C1085-C1095
64. Yamashita H, Tohtong R, Simcox A, Vigoreaux J, Haerberle J, Hyatt C, Brown S, Maughan D (1994) *Biophys J* **66**: A123
65. Makuch R, Dąbrowska R (1992) *Post Biochem* **38**: 90-97
66. Marston SB, Redwood CS (1991) *Biochem J* **279**: 1-16
67. Winder SJ, Walsh MP (1993) *Cell Signal* **6**: 667-686
68. Fisher W, Pfitzer G (1989) *FEBS Lett* **258**: 59-62
69. Bárány M, Bárány K (1994) *Archiv Biochem Biophys* **305**: 202-204

Kompleks dystrofiny z glikoproteinami błony komórkowej w mięśniu szkieletowym

Dystrophin-Glycoprotein complex of skeletal muscle sarcolemma

ANNA JAKUBIEC-PUKA¹
URSZULA WIECZOREK²

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Dystrofina
 - II-1. Dystrofina mięśniowa
 - II-2. Nadrodzina dystrofin
 - II-3. Lokalizacja dystrofiny we włóknie mięśniowym
- III. Białka występujące w kompleksie z dystrofiną
 - III-1. Budowa kompleksu glikoproteinowego sarkolemy (DAG)
 - III-2. Kompleks dystrofina-DAG jako receptor białek błony podstawnej
 - III-2.1. Receptor lamininy
 - III-2.2. Receptor agryny
 - III-3. Współdziałanie z kinazami i przypuszczalny udział w przekaźnictwie sygnałów
- IV. Dystrofie mięśniowe
 - IV-1. Dystrofie spowodowane defektami dystrofiny
 - IV-2. Dystrofie spowodowane zmianami w kompleksie DAG i merozynie
 - IV-3. Przypuszczalna rola kompleksu dystrofina-DAG
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Dystrophin
 - II-1. Muscle dystrophin
 - II-2. Dystrophin super-family
 - II-3. Dystrophin localization in muscle fibre
- III. Dystrophin-associated proteins
 - III-1. Organization of the sarcolemmal dystrophin-glycoprotein complex (DAG)
 - III-2. Dystrophin-DAG complex as receptor of the basement membrane proteins
 - III-2.1. Laminin receptor
 - III-2.2. Agrin receptor
 - III-3. Cooperation with cellular kinases and probable contribution to signal transduction
- IV. Muscular dystrophies
 - IV-1. Dystrophies related to the dystrophin defects
 - IV-2. Dystrophies related to changes in the DAG complex and merosin
 - IV-3. Presumable role of the dystrophin-DAG complex
- V. Conclusions

Wykaz stosowanych skrótów: DAG — glikoproteiny związane z dystrofiną; RACH — receptor acetylocholinowy; DMD — dystrofia Duchenne'a; BMD — dystrofia Beckera; SCARM — dystrofia dziecięca z autosomalnym dziedziczeniem recesywnym; CMD — dystrofia wrodzona

I. Wprowadzenie

Dystrofina jest białkiem kodowanym przez gen dystrofii mięśniowej Duchenne'a (gen DMD), znajdujący się w chromosomie X. Dystrofina jest częścią podblonowego cytoszkieletu komórki mięśniowej (nazywanej włóknem mięśniowym). Brak lub zmieniona forma dystrofiny jest przyczyną dystrofii mięśniowej, schorzenia rodzinnego, występującego u chłopców, a przenoszonego przez matki-nosicielki.

Poznanie dystrofiny oraz licznych współdziałają-

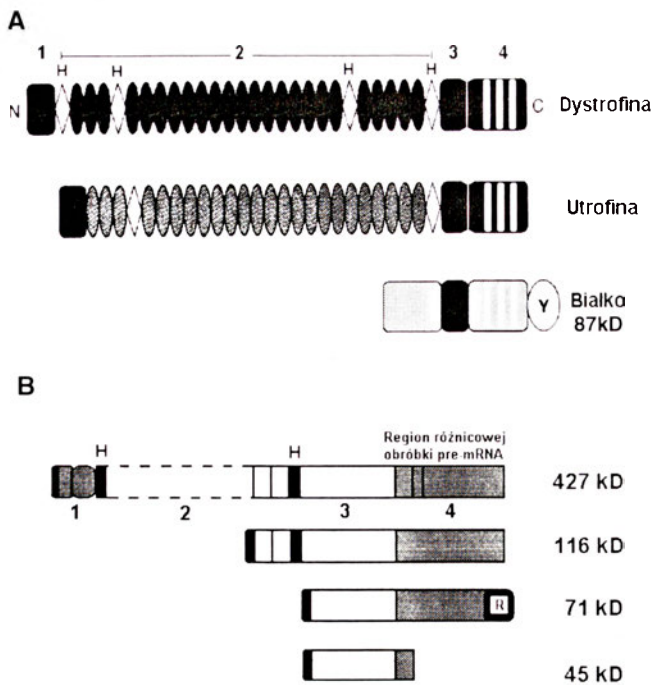
cych z nią białek zawdzięczamy intensywnym badaniom (prowadzonym zwłaszcza w ostatnich latach) nad dystrofiami mięśniowymi ludzkimi i zwierzęcymi, zwłaszcza nad dystrofią mysią (*mdx*). Izoformy dystrofiny, znaleziono w większości badanych tkanek. Ich rola w komórce wydaje się zatem znacznie wykraczać poza problematykę schorzeń mięśni. Artykuł ten poświęcony został jednak głównie budowie i funkcji dystrofiny i współdziałających z nią białek w mięśniu szkieletowym, ponieważ w tej tkance są one najlepiej poznane. Wcześniejsze informacje dotyczące budowy dystrofiny oraz genu DMD zostały już uprzednio opisane szeroko w *Postęпах Biochemii* [1].

II. Dystrofina

II-1. Dystrofina mięśniowa

Dystrofina mięśniowa [2] jest białkiem o masie 427 kD, zawierającym 3685 aminokwasów, posiadającym

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



Ryc. 1. Schematycznie przedstawiona struktura nadrodziny dystrofin (*dystrophin-superfamily*). (A) Dystrofina, utrofina i białko 87 kD. (B) Izoformy dystrofiny. Domeny strukturalne: 1 — domena wiążąca aktynę, 2 — domena centralna, 3 — domena bogata w cysteinę, 4 — domena C-końca. H — odcinki bogate w prolinę, Y — rejon zawierający aminokwasy ulegające fosforylacji, R — rejon różnic pomiędzy tkankowo-specyficznymi izoformami. (Wzorowane na rycinach Blake'a i wsp. [21] oraz Fabbrizio i wsp. [4]).

cztery strukturalne domeny, o różnej funkcji [3] (przedstawione schematycznie na Ryc. 1A). Na N-końcu cząsteczki dystrofiny znajduje się 200-240 aminokwasowy region homologiczny z wiążącymi aktynę sekwencjami w α -aktyninie i β -spektrynie. Ta część cząsteczki wiąże aktynę [4, 5]. Domenę środkową, najdłuższą, stanowią 24 powtarzające się homologiczne odcinki, z których każdy składa się z 88-126 aminokwasów i tworzy potrójną helisę. Ta część dystrofiny, zawierająca odcinki bogate w prolinę, jest homologiczna z pałeczkowatą częścią α -aktyminy i β -spektryny i jest prawdopodobnie elastyczna [6, 7]. Następną domenę cząsteczki dystrofiny stanowi odcinek bogaty w cysteinę, homologiczny z białkami wiążącymi wapń. W części tej znajdują się 2 rejony o sekwencji „EF-hand”*. Nie stwierdzono jednak, by dystrofina wiązała jony wapnia w warunkach *in vivo*. Domena rejonu C-końca cząsteczki, zawierająca około 420 aminokwasów, jest charakterystyczna dla nadrodziny dystrofin. W odcinku tym dystrofina jest fosforylowana. (Szczegóły w pracach przeglądowych [4, 8]).

II-2. Nadrodzina dystrofin

Ze znanych obecnie białek do nadrodziny dystrofin

* Wyjaśnienie odnośnie sekwencji „EF-hand” jak w pracy przeglądowej w *Postęпах Biochemii*, porównaj pozycję 87 Piśmiennictwa

(*dystrophin superfamily*) należy: dystrofina, utrofina [9] oraz białko 87 kD z organu elektrycznego ryby *Torpedo Californica* [10] (Ryc. 1A, Tab. 1).

Gen DMD [3, 11], kodujący dystrofinę, jest największym genem człowieka (stanowi on 0,1% genomu). Gen DMD znajduje się na krótszym ramieniu chromosomu X (Xp21), składa się z około 2,5 miliona par zasad i zawiera 79 eksonów. W genie dystrofiny znajduje się kilka ogromnych intronów, zwłaszcza w rejonie kodującym N-końiec białka, oraz pomiędzy 44 i 45 eksonem. Produktem genu jest mRNA, o wielkości 14 kb. W genie dystrofiny znajduje się co najmniej 5 promotorów. Trzy z nich znajdują się przy 5'-końcu i powodują ekspresję tkankowo-specyficznych izoform dystrofiny o pełnej długości. Izoformy te różnią się co najmniej w obrębie pierwszego eksonu. Mogą też różnić się w obrębie C-końca cząsteczki w wyniku różnicowej obróbki pre-mRNA (*alternative splicing*). Izoformy długie to: dystrofina mięśniowa, obecna w mięśniach wszystkich typów, dystrofina mózgowa, obecna w neuronach kory mózgowej oraz dystrofina komórek Purkinjego mózdzku [4, 8, 12]. W siatkówce oka znaleziono długą izoformę o N-końcu dystrofiny mózgowej, a C-końcu dystrofiny mięśniowej [13].

Dwa promotory, „S” i „G”, umiejscowione w pobliżu 3'-końca genu DMD, kontrolują ekspresję tkankowospecyficznych krótkich izoform dystrofiny. Promotor „S” znajduje się między eksonem 55 i 56 genu; jego białkowy produkt ma masę 116 kD. Promotor „G” znajduje się pomiędzy 62 i 63 eksonem; powoduje ekspresję dwóch białek o masach 71 kD i 45 kD, które mają identyczną część N-końcową cząsteczki (zawierającą 7 nowych aminokwasów oraz część domeny bogatej w cysteinę), lecz różnią się długością domeny C-końca. Tkankowospecyficzne izoformy dystrofiny różnią się ekspresją w obrębie eksonów 68-78 (Ryc. 1B). Krótkie izoformy dystrofiny znaleziono w różnych tkankach (Tab. 2). Izoforma 45 kD występuje w tkankach rozwijających się. Ekspresja różnych izoform dystrofiny wydaje się być regulowana niezależnie [4, 14-18].

Białkiem homologicznym z dystrofiną mięśniową jest utrofina, nazywana również DRP (*dystrophin-related protein*) [9]. Utrofinę koduje gen znajdujący się w chromosomie 6 (6q24). Utrorfina ma ciężar cząsteczkowy 395 kD i zbudowana jest z domen homologicznych wobec dystrofiny (2-ga domena jest krótsza niż w dystrofinie) (Ryc. 1A). Znaleziono też krótką izoformę utrofiny o masie 62 kD, odpowiadającą N-końcowi utrofiny [4, 19].

W mięśniu występuje również białko o ciężarze 87 kD, homologiczne z C-końcem dystrofiny i z białkiem 87 kD organu elektrycznego ryby *Torpedo Californica*, gdzie je pierwotnie zidentyfikowano. Mało wiadomo o strukturze mięśniowego białka 87 kD. Jego N-końiec nie jest homologiczny z żadnym znanym białkiem; jego C-końiec ulega licznym fosforylacjom (Ryc. 1A)

Tabela 1.

Komponenty kompleksu dystrofina-DAG.

Białko	Lokalizacja	Dodatkowe informacje
<i>Nadrodzina dystrofin</i> dystrofina (427 kD) izoformy dystrofiny (71 kD i 116 kD) utrofina (395 kD) białko 87 kD	cytoszkielet podbłonowy — — — — — —	gen DMD (Xp21) alternatywne produkty genu DMD (Xp21), promotory „S” i „Q” 6q24; homolog dystrofiny produkt osobnego genu; homolog C-końca dystrofiny
<i>Kompleks białek sarkolemy</i> związany z dystrofiną syntrofina α , β 1, β 2 (59 kD)	wewnątrzkomórkowa	produkty 3 genów: 20q11, 16, 8q23-24; wiążą się z C-końcem dystrofiny utrofiny; syntrofina β 2 jest skoncentrowana w obrębie synapsy
α -dystroglikan (156 kD)	zewnątrzkomórkowa	3p21; połączony z β -dystroglikanem; wiąże się z lamininą, merozyną i agryną
β -dystroglikan (43 kD)	wewnątrzblonowa/podbłonowa	3p21; wiąże się z dystrofiną/utrofiną; α - i β -dystroglikan pochodzą z potranslacyjnej obróbki wspólnego prekursora białkowego
adhalina (50 kD) 35 kD 25 kD rapsyna (43 kD)	wewnątrzblonowa — — — — podbłonowa	17q21 nieznana budowa — — uczestniczy w agregacji RACH
<i>Białka zewnątrzkomórkowe</i> merozyna (laminina M) (ok. 850 kD) agryna (220 kD)	macierz zewnątrzkomórkowa (błona podstawna) — —	6p22-23; wiąże się z α -dystroglikanem 1p32; białko syntetyzowane w motoneuronie wydostaje się przez błonę presynaptyczną; wiąże się z α -dystroglikanem

Na podstawie prac: Campbell [82], Fallon i Hall [42], Pathy i Nikolics [55]

[10, 20, 21].

II-3. Lokalizacja dystrofiny we włóknie mięśniowym

Dystrofina stanowi zaledwie około 0,002% białek włókna mięśniowego, a około 2% białek błony komórkowej (sarkolemy) i około 5% białek cytoszkieletu podsarkolemalnego [22]. Częsteczka dystrofiny mięśniowej ma kształt pałeczki o długości około 110 nm i średnicy 3 nm [23], mogącej tworzyć dimery i multimery. Przyjmuje się, że 2 cząsteczki dystrofiny łączą się częściami elastycznymi (domena 2) antyrównolegle tak, że N-koniec jednej cząsteczki znajduje się w pobliżu C-końca drugiej [24] (Ryc. 2A). Proponowane jest również inne (równoległe) ułożenie cząsteczek dystrofiny [4, 21]. We włóknie mięśniowym cząsteczki dystrofiny umiejscowione są równoległe do cytoplazmatycznej powierzchni sarkolemy. C-koniec dystrofiny zakotwiczony jest w sarkolemie za pośrednictwem kompleksu glikoproteino-owego sarkolemy, który jest połączony z macierzą

pozakomórkową (Ryc. 2A) [25-28].

Rozmieszczenie dystrofiny pod sarkolemą nie jest równomierne. Jej zagęszczenia występują w okolicy przyczepu do ścięgna, w rejonie synapsy nerwowo-mięśniowej oraz w pasmach biegnących okrężnie, poprzecznie do osi długiej włókna mięśniowego, jak również w cienkich podłużnych pasemkach. Pasma umiejscowione poprzecznie odpowiadają liniom Z i liniom M. Dystrofina w tych pasmach jest przypuszczalnie częścią struktur nazwanych „kostamerami”, które, jak się uważa, pośredniczą w połączeniu aparatu skurczu z macierzą międzykomórkową i uczestniczą w przenoszeniu siły wytwarzanej w aparacie skurczu. W obrębie „kostamerów” oprócz dystrofiny znaleziono: α -aktynę, winkulinę i β -spektrynę, talinę i γ -aktynę. Wzajemne połączenia tych białek i ich organizacja w „kostamerach” są mało poznane [29-33].

Dystrofina obecna w fałdach sarkolemy w okolicy przyczepu do ścięgna tworzy przypuszczalnie połączenia boczne między filamentami aktynowymi a sarkolemą. W rejonie synapsy nerwowo-mięśniowej dystrofina jest obecna w okolicy napięciowych kanałów

Tabela 2.

Występowanie izoform dystrofiny w różnych tkankach

Tkanka	427 kD	71 kD	116 kD
Mięsień szkieletowy	+	–	–
sercowy	+	+	–
gładki	+	+	–
Narządy wewnętrzne (nerka, wątroba, płuca, trzustka, jądra)	–	+	–
Centralny układ nerwowy			
neurony	+	+	–
komórki gleju	+	+	–
Obwodowy układ nerwowy			
siatkówka oka	+	–	–
neurony	–	–	–
komórki Shwanna	–	–	+

Dane z prac: Ahn i Kunkel [8], Górecki i Barnard [18], Matsumura i wsp. [16]

Ponadto za pomocą przeciwciał poliklonalnych stwierdzono obecność dystrofiny również w komórkach nabłonka, w skórze, rogówce, kubkach smakowych, oraz trąbce Eustachiusza [29]

sodowych, natomiast brak jej w fałdach zawierających receptor acetylocholinowy, w których znajduje się homolog dystrofiny — utrofina oraz białko 87 kD [8-10].

Umieszczenie dystrofiny we włóknie mięśniowym zmienia się wraz z rozwojem mięśnia. Dystrofina jest wykrywalna w cytoplazmie miotub, w ich rejonach przylegających do ścięgna, już u 8-10 tygodniowego płodu. W późniejszym okresie życia płodowego (17 tygodni) jest obecna w całej cytoplazmie i w sarkolemie. W dojrzałym mięśniu szkieletowym dystrofina jest obecna wyłącznie w sarkolemie. W dojrzałym mięśniu krótkie izoformy dystrofiny nie występują, natomiast izoforma 71 kD jest obecna w mięśniu przez okres życia płodowego [15, 34].

W komórkach mięśnia gładkiego dystrofina jest umiejscowiona pod sarkolemą. W komórkach mięśnia sercowego dystrofina występuje również pod sarkolemą, a także w postaci rozpuszczalnej w cytoplazmie [35]. W mięśniu sercowym dystrofina znajduje się w „kostamerach” w kompleksie z glikoproteiną sarkolemy, natomiast brak jej w okolicy „wstawek”. Izofoma dystrofiny 71 kD występuje w poprzecznych kanałach T komórek serca [17, 36]. Umieszczenie wewnątrzkomórkowe dystrofiny w mózgu, jak i w innych tkankach jest mało poznane. W mózgu dystrofina występuje w tych samych rejonach co dystroglikan (opisany w części III-1) [18].

Utrofina, z kolei, w dojrzałym mięśniu występuje w obrębie synapsy nerwowo-mięśniowej (Ryc. 2B) i połączenia mięśnia ze ścięgnem, lecz brak jej w obrębie pozostałej sarkolemy. W mięśniu płodowym utrofina jest obecna w całej sarkolemie. Maksymalna ekspresja utrofiny następuje w 17-18 tygodniu życia

płodowego. W miarę dalszego rozwoju mięśnia i ekspresji dystrofiny, utrofina jest przez nią stopniowo zastępowana [37-39]. Utrofina jest obecna w większości tkanek; o jej lokalizacji wewnątrzkomórkowej w tkankach niemięśniowych mało wiadomo.

III. Białka występujące w kompleksie z dystrofina

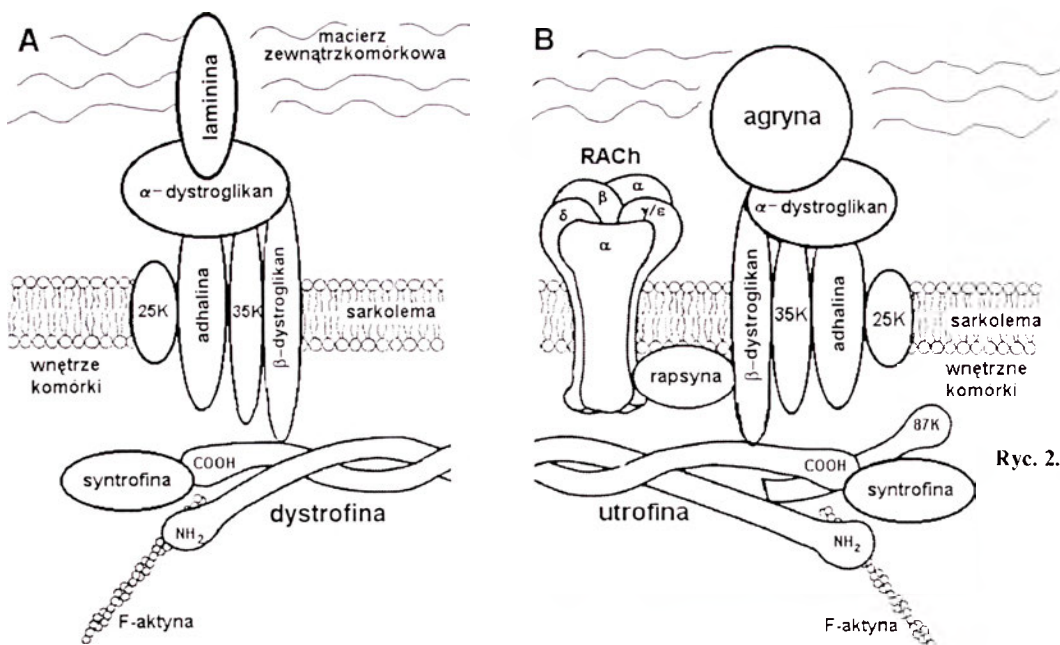
III-1. Budowa kompleksu glikoproteinowego sarkolemy (DAG)

W komórce mięśnia szkieletowego dystrofina występuje w kompleksie z sarkolemalnym heteromerem glikoproteinowym, nazwanym DAG (*dystrophin-associated glycoprotein*). W skład kompleksu DAG wchodzi: transmembranowe glikoproteiny o masie 50 kD, 43 kD i 35 kD, transmembranowe białko o masie 25 kD, zewnątrzkomórkowa glikoproteina o masie 156 kD oraz podbłonowe białko o masie 59 kD, nazwane syntrofina [24, 26]. W kompleksie tym mogą się jeszcze znajdować podbłonowe białka: rapsyna, o masie 43 kD [40] oraz homolog dystrofiny o masie 87 kD [10, 20]. Białka wchodzące w skład kompleksu DAG omówione są poniżej oraz zestawione w tabeli 1, a hipotetyczną strukturę kompleksu przedstawiono na rycinie 2A.

Komponenty kompleksu glikoproteinowego o masie 156 kD i 43 kD, nazwane α - i β -dystroglikanem, koduje jeden gen (umiejscowiony w 3-cim chromosomie). Ze wspólnego prekursora białkowego o masie 97 kD powstają dwa peptydy, w wyniku protranslacyjnej modyfikacji proteolitycznej, następującej jeszcze w trakcie syntezy. Peptydy te ulegają glikozylacji i przekształceniu w dojrzałe białka: β -dystroglikan powstaje z C-końca prekursora (po N-glikozylacjach); α -dystroglikan powstaje z N-końca prekursora (po licznych O-glikozylacjach). α -dystroglikan, składający się w około 1/3 z białka i w około 2/3 z cukrów, jest umiejscowiony po zewnętrznej stronie sarkolemy. Wiąże się on specyficznie z lamininą A, z lamininą M (merozyną) oraz z agryną (szczegóły w części III-2). β -dystroglikan umiejscowiony jest transmembranowo i częściowo cytoplazmatycznie. Jego C-koniec tworzy 120-aminokwasowy „ogon”, którym wiąże się z dystrofina, w jej domenach: bogatej w cysteinę i C-końcowej. β -dystroglikan wiąże się również z krótkimi izoformami dystrofiny oraz z utrofina. α - i β -dystroglikan występują powszechnie w tkankach [24, 27, 41-43].

Glikoproteiny 50 kD i 35 kD są białkami transmembranowymi mięśnia prądkowanego, nie znaleziono ich w innych tkankach. Białko 50 kD, nazwane adhaliną, jest u człowieka kodowane w 17-tym chromosomie (17q21) [44, 45]. O białku 35 kD, jak też 25 kD nie wiele wiadomo.

Syntrofina (59 kD), wewnątrzkomórkowy składnik kompleksu dystrofino-glikoproteinowego [24], jest homologiczna z białkiem 59 kD organu elektrycznego



Ryc. 2. Schematyczny model hipotetycznej organizacji kompleksu DAG i współdziałających z nim białek: na powierzchni włókna mięśniowego poza synapsą (A); w obrębie synapsy nerwowo-mięśniowej (B). (Wzorowane na rycinie A pel'a i w s.p. [40]).

ryby *Torpedo Californica* [10, 20]. Syntrofina występuje w mięśniu w 3 izoformach: α , $\beta 1$ i $\beta 2$, kodowanych na osobnych genach (Tab. 1); izoformy $\beta 1$ i $\beta 2$ są obecne powszechnie w tkankach. W mięśniu izoformy α i $\beta 1$ występują w całej sarkolemie, wiążąc się z dystrofiną w jej domenie C-końca. Natomiast izoforma $\beta 2$ jest skumulowana w obrębie błony postsynaptycznej. Miejsca wiązania syntrofin na dystrofinie są w rejonie jej C-końca, kodowanym przez eksony 73 i 74. W wyniku alternatywnego cięcia i składania eksonu 74 powstają izoformy dystrofiny, które wiążą różne izoformy syntrofiny i przypuszczalnie różną ich ilość. Syntrofina tworzy kompleksy również z utrofiną, z homologiem dystrofiny, białkiem 87 kD oraz z krótkimi izoformami dystrofiny [10, 46-49].

Rapsyna jest białkiem o masie 43 kD, usytuowanym podbłonowo w rejonie synapsy nerwowo-mięśniowej. Rapsyna występuje w kompleksie z receptorem acetylocholinowym (RACH) jak też z kompleksem DAG [40].

Ostatnio zidentyfikowano białko cytoszkieletowe o masie 60 kD, homologiczne z fosfoglikomutazą typu 1, które nazwano acykuliną. Acykulina tworzy bezpośrednio kompleksy z dystrofiną oraz z utrofiną. Acykulina znajduje się pod sarkolemą w rejonie „kostamerów” oraz w okolicy połączenia ze ścięgnem. Przypuszczalnie tworzy ona dodatkowe wzmocnienie połączenia cytoszkieletu z macierzą międzykomórkową [50].

III-2. Kompleks dystrofina-DAG jako receptor białek błony podstawnej

III-2.1. Receptor lamininy

Laminina jest białkiem błony podstawnej komórek, heterotrimerem o masie około 850 kDa, występującym w tkankach w postaci licznych izoform. Receptorami laminin są integryny, które pośredniczą w regulacji

kinaz komórkowych [51]. Laminina mięśniowa zbudowana jest z trzech podjednostek: dwóch mniejszych, B1 lub S i B2, oraz jednej większej — lamininy A lub lamininy M, czyli merozyny. Merozyna występuje w mięśniu dojrzałym, laminina A w mięśniu rozwijającym się [52, 53]. Ich naturalnym ligandem i receptorem jest α -dystroglikan (Ryc. 2A). Połączenie merozyny (jej domeny G) z α -dystroglikanem zależy od jonów Ca^{2+} i jest hamowane przez heparynę [27, 28, 51].

Jak już wspomniano uprzednio, kompleks dystrofina-DAG-merozyna stanowi połączenie cytoszkieletu podbłonowego z macierzą zewnątrzkomórkową. O roli tego kompleksu w przekazywaniu sygnałów niewiele w tej chwili wiadomo.

III-2.2. Receptor agryny

Agryna jest białkiem o masie 220 kD, konserwatywnym, zbudowanym z powtarzających się 3 rodzajów domen: homologicznych z inhibitorem proteaz typu Kazala, z nabłonkowym czynnikiem wzrostu (EGF) oraz z lamininą. Agryna występuje w postaci licznych tkankowo-zróżnicowanych izoform. Izoforma agryny pochodząca z neuronów posiada, jako jedyna, zdolność agregacji RACH. Izoforma ta wyróżnia się 8-aminokwasową wstawką w rejonie C-końca, której brak w innych izoformach. Agryna, syntetyzowana w motoneuronie, zostaje następnie przenoszona wzdłuż aksonu do synapsy nerwowo-mięśniowej, gdzie wydostaje się przez błonę presynaptyczną i jest wbudowywana w błonę podstawną. W błonie podstawnej utrzymuje się bardzo długo. Agryna tworzy kompleksy z czynnikami wzrostu i jest miejscem ich magazynowania w przestrzeni międzykomórkowej [42, 54, 55].

Receptorem agryny w komórce mięśniowej okazał się α -dystroglikan (Ryc. 2B). Interakcja agryny z α -dystroglikanem jest zależna od jonów Ca^{2+} , a hamuje ją heparyna i laminina. Efektem połączenia agryny

z kompleksem DAG jest agregacja RACH w błonie postsynaptycznej. Warunkiem agregacji RACH jest fosforylacja β -podjednostki tego receptora przez bliżej niezidentyfikowaną kinazę tyrozynową, aktywowaną po przyłączeniu agryny do α -dystroglikanu. W wyniku przyłączenia agryny do kompleksu DAG następuje, oprócz agregacji RACH, agregacja i organizowanie kilkunastu różnych białek cytoplazmatycznych i cytoszkieletowych okolicy synapsy [42, 43, 55, 56]. W procesach tych uczestniczy również rapsyna, stymulująca agregację RACH i połączenie RACH z kompleksem DAG [40], a także białko 87 kD, które przypuszczalnie ułatwia formowanie synapsy i stabilizuje ją [10] (Tab. 1, Ryc. 2B).

Występuje współzależność pomiędzy rodzajem ligandu α -dystroglikanu, a powinowactwem kompleksu DAG do innych białek. Okazało się, że przyłączenie agryny do α -dystroglikanu powoduje interakcję β -dystroglikanu z utrofina, natomiast przyłączanie lamininy interakcję z dystrofina [43] (Ryc. 2A i 2B). Rodzaj ligandu, z jakim związany jest α -dystroglikan determinuje sposób regulacji wiązania kompleksu z cytoszkieletem komórki, ponieważ wiązanie F-aktyny przez utrofina jest hamowane przez kalmodulinę w obecności jonów Ca^{2+} , czego nie stwierdzono w przypadku wiązania F-aktyny przez dystrofina [28, 57].

III-3. Współdziałanie z kinazami i przypuszczalny udział w przekaznictwie sygnałów

Badania ostatnich lat wykazały, że kompleks DAG odgrywa prawdopodobnie ważną rolę w przekazywaniu sygnałów (ta rola kompleksu jest stosunkowo mało poznana). Poniżej przedstawiono aktualnie dostępne informacje, bardzo fragmentaryczne, dotyczące tego zagadnienia.

Kompleks dystrofina-DAG pośredniczy przypuszczalnie w regulacji aktywności kinaz komórkowych. Z drugiej strony, poszczególne białka kompleksu, a zwłaszcza C-koniec dystrofina, syntrofina i białko 87 kD, są fosforylowane w wielu miejscach przez endogenne kinazy białkowe [4, 58]. Sam oczyszczony kompleks dystrofina-DAG również wykazuje aktywność kinazy białkowej, fosforylującej reszty serynowe dystrofina i syntrofina. Aktywność tej kinazy jest zależna od jonów Mg^{2+} ; kinazę tę aktywuje kalmodulina w obecności jonów Ca^{2+} [59]. Żadne jednak z białek kompleksu DAG o poznanej sekwencji (ani α -, ani β -dystroglikan ani adhalina) nie jest kinazą.

Kompleks glikoproteinowy uczestniczy przypuszczalnie w przekazywaniu informacji dla reorganizacji cytoszkieletu komórki, podobnie jak receptory czynników wzrostu i integryny. Wskazuje na to bezpośrednia interakcja β -dystroglikanu z białkiem Grb2, które jest przekaźnikiem sygnałów zewnątrzkomórkowych regulujących organizację cytoszkieletu [51, 60].

IV. Dystrofie mięśniowe

IV-1. Dystrofie spowodowane defektami dystrofina

Dystrofia typu Duchenne'a (DMD) jest ciężkim postępującym schorzeniem mięśni, stwierdzanym u jednego na 3500 urodzonych chłopców (z tego około 1/3 to nowe mutacje). Choroba ujawnia się w 3-5 roku życia jako postępujące osłabienie mięśni. W obrazie mikroskopowym obserwuje się zmiany nekrotyczne komórek mięśniowych, ich zniszczenie i zastąpienie przez tkankę łączną i tłuszczową. DMD w ciągu kilku lat prowadzi do zniszczenia mięśni, powodując unieruchomienie dziecka i trudności w oddychaniu. Chorzy ci rzadko przekraczają 20-ty rok życia [61].

Dystrofia mięśniowa typu Beckera (BMD) występuje około 10 razy rzadziej i ma łagodniejszy przebieg, przy czym ciężkość przebiegu BMD jest różna, zależna od rodziny, a nawet od osobnika [62]. Część przypadków dystrofii wywołanej defektem genu DMD przebiega podobnie jak dystrofia obřeczowo-konczynowa [63], a także jako nietypowe miopatie lub kardiomiopatia, która może być jedynym objawem choroby [64, 65]. U chorych na dystrofie DMD/BMD, a także u matek nosicielek stwierdza się we krwi podwyższony poziom enzymów mięśniowych. U części nosicielek występują objawy miopatyczne o różnym nasileniu [64].

Przyczyną wymienionych dystrofii są mutacje w obrębie genu DMD, powodujące brak dystrofina lub syntezę jej zmienionej formy. Mutacje mogą dotyczyć zarówno odcinków kodujących, jak i intronów. Gen dystrofina może ulegać delecjom lub duplikacjom (w około 60-65% przypadków DMD/BMD) mutacjom punktowym oraz mutacjom zmieniającym obróbkę pre-mRNA (*splicing mutation*). Delecje mogą powodować syntezę krótszej dystrofina z zachowaniem ramki odczytu (*reading in-frame*), co prowadzi zwykle do dystrofii Beckera. Natomiast mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu są najczęściej przyczyną przedwczesnego przerwania syntezy dystrofina i wystąpienia dystrofii Duchenne'a [8, 62, 64, 66]. Typ dystrofii i ciężkość jej przebiegu w znacznym stopniu zależy od umiejscowienia defektu w cząsteczce dystrofina. Defekt okolicy C-końca wywołuje w 95% przypadków DMD, a defekt okolicy N-końca powoduje najczęściej ciężkie postaci BMD. Defekty środkowych rejonów cząsteczki dystrofina powodują zwykle BMD o różnym stopniu ciężkości, a także nietypowe miopatie, albo kardiomiopatie [8, 62, 63, 65]. Są liczne wyjątki od tych reguł, w tym przypadki bezobjawowe, mimo dużej delecji genu DMD [64, 67, 68].

U nosicielek DMD/BMD w jądrach włókna mięśniowego, które jak wiadomo jest wielojądrzastym komórczakiem, następuje alternatywnie ekspresja prawidłowego, lub zmutowanego genu DMD. W efekcie, we włóknie mięśniowym znajdują się odcinki zawierające prawidłową dystrofina naprzemiennie z odcinkami bez dystrofina. W tych ostatnich często jest obecna utrofina w sarkolemie [38].

Brakiem dystrofina są spowodowane również dys-

trofie zwierzęce, powstałe w wyniku spontanicznych mutacji. Najlepiej poznane z nich to dystrofia mysia *mdx* [69] i dystrofia psia *grmd* [70]. Dystrofia mysia *mdx* (*X-linked muscular dystrophy*) spowodowana jest mutacją punktową w obrębie eksonu, która powoduje przedwczesne przerwanie translacji i ekspresję ułomnej dystrofiny, zawierającej tylko domenę N-kończową i około 1/3 domeny drugiej [71]. Z niejasnych przyczyn u myszy *mdx* objawy dystrofii są nieznaczne (za wyjątkiem mięśni przepony [72]); cięższe objawy dystrofii pojawiają się dopiero u starszych zwierząt [73]. Dystrofia mysia *mdx* jest powszechnie używanym obiektem do badań nad dystrofią mięśniową i kompleksem dystrofina-DAG.

Dystrofia psia *grmd* (*golden river muscular dystrophy*), której obraz chorobowy przypomina bardzo DMD, jest spowodowana zamianą jednej zasady w intronie 6. Mutacja ta powoduje wadliwą obróbkę pre-mRNA i w efekcie powstawanie bardzo krótkiej dystrofiny, zawierającej tylko produkt pierwszych sześciu eksonów [74].

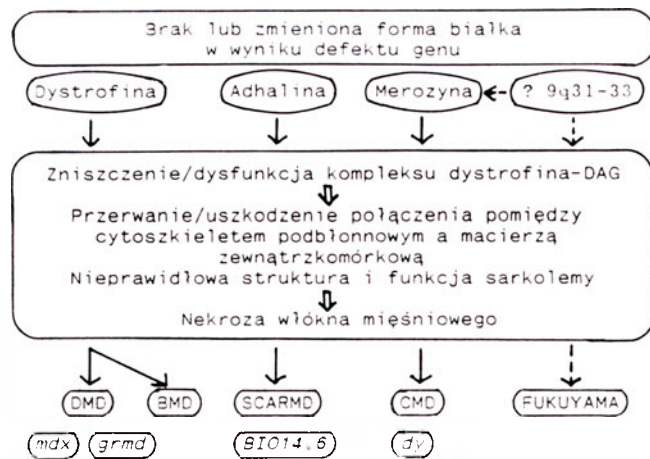
Bardzo wiele kwestii dotyczących DMD/BMD jest ciągle niewyjaśnionych. Na przykład, dlaczego przy analogicznym defekcie genu, kliniczny przebieg choroby jest tak bardzo różny, zależnie od gatunku, rodziny dotkniętej dystrofią, a nawet osobnika. Nieznana jest też przyczyna wystąpienia objawów dystrofii dopiero w pewnym wieku, oraz mechanizm który wyzwała chorobę, a także objęcie chorobą tylko niektórych grup mięśni.

IV-2. Dystrofie spowodowane zmianami w kompleksie DAG i w merozynie

Brak adhaliny (50 kD składnik kompleksu DAG), spowodowany mutacją genu tego białka, znajdującego się w 17 chromosomie, (17q21) wywołuje ciężką dystrofię dziecięcą, o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym, nazwaną SCARMD (*Severe Childhood Autosomal-Recessive Muscular Dystrophy*). Choroba ta jest spotykana głównie w północnej Afryce. Dystrofię o identycznym przebiegu powoduje też defekt genu w chromosomie 13 (13q12). Defektem adhaliny spowodowana jest również kardiomiopatia chomików *BIO14.6* [44, 75, 76].

Brak merozyny w mięśniu, związany z defektem genu w chromosomie 6 (6p22-23), jest przyczyną dystrofii mięśniowej wrodzonej — CMD (*Congenital Muscular Dystrophy*) oraz dystrofii mysiej *dy*. Dystrofia wrodzona charakteryzuje się wiotkością i osłabieniem mięśni; ma ona zróżnicowany przebieg kliniczny [77-79].

Obniżoną zawartość merozyny w mięśniu stwierdzono w dystrofii wrodzonej Fukuyamy [53, 78]. W chorobie tej objawy kliniczne dotyczące układu mięśniowego są zbliżone do dystrofii Duchenne'a. Ponadto charakteryzuje się ona wiotkością mięśni i poważnymi uszkodzeniami układu nerwowego. Dys-



Ryc. 3. Hipotetyczny schemat sugerujący w jaki sposób defekty genetyczne niektórych białek, powodujące uszkodzenie kompleksu dystrofina-DAG, doprowadzają do wystąpienia dystrofii. 9q31-33 — miejsce w genie, w obrębie którego znajduje się defekt powodujący dystrofię Fukuyamy [78]; DMD — dystrofia Duchenne'a; BMD — dystrofia Beckera; SCARMD — ciężka dystrofia dziecięca z dziedziczeniem autosomalnym recesywnym; CMD — dystrofia wrodzona; FUKUYAMA — dystrofia wrodzona Fukuyamy. Modele dystrofii zwierzęcych: *mdx* [71], *dy* [77] — myszy; *grmd* [70] — psi; *BIO14.6* [44] — chomików. Strzałki przerywane oznaczają przypuszczalne zależności. (Wzorowane na schematach Matsumury i wsp. [75] i Ohlendieck'a [79]).

trofia Fukuyamy występuje u Japończyków i jest dziedziczona drogą autosomalną recesywną [61]. Defekt genetyczny będący przyczyną dystrofii Fukuyamy nie został jeszcze określony, wiadomo jednak, że dotyczy on chromosomu 9 (rejon 9q31-33) [78]. W dystrofii Fukuyamy w sarkolemie dojrzałego mięśnia jest obecna laminina A zamiast merozyny. Obecność lamininy A stwierdzono również w niektórych przypadkach DMD oraz u nosicieli tego schorzenia [53].

Znaleziono współzależność zawartości w mięśniu dystrofiny oraz białek kompleksu DAG, a także lamininy i niektórych białek cytoszkieletu. Brakowi dystrofiny, lub brakowi jej C-końca, towarzyszy spadek zawartości białek DAG w mięśniu, przy równocześnie zachowanym poziomie ich mRNA [27, 45, 46]. Dotyczy to też nosicieli DMD, u których następuje zmniejszenie zawartości białek DAG we włóknach mięśniowych, w których brak dystrofiny [39]. Brak dystrofiny może powodować również zmniejszenie zawartości w mięśniu merozyny [53] oraz niektórych białek cytoszkieletu [80]. Z kolei, brakowi adhaliny towarzyszy spadek zawartości dystrofiny i białek DAG, zwłaszcza białka 35 kD [75]. W dystrofii Fukuyamy stwierdzono spadek zawartości merozyny, białek kompleksu DAG (zwłaszcza β -dystroglikanu), dystrofiny i spektryny [53, 78, 81]. Przyczyny tych współzależności nie są znane. Udowodniono jednak, że nie są one wtórnym, niespecyficznym efektem zmian nekrotycznych i degeneracji mięśnia [68]. Jak się przypuszcza, brak jednej z komponent destabilizuje cały kompleks i powoduje degradację innych białek kompleksu. Reasumując, wspólną cechą dystrofii mięśniowych: Duchenne'a, SCARMD, CMD oraz Fukuya-

my są nieprawidłowości kompleksu dystrofina-DAG-merozyna lub/i zmniejszenie jego ilości w sarkolemie. Jest to spowodowane brakiem lub defektem poszczególnych komponent kompleksu. Uważa się powszechnie, że nieprawidłowe funkcjonowanie kompleksu dystrofina-DAG-merozyna jest przyczyną uszkodzenia sarkolemy i nekrozy włókien mięśniowych [8, 68, 79, 82] (Ryc. 3).

IV-3. Przepuszczalna rola kompleksu dystrofina-DAG

Powszechnie uznaną rolą kompleksu dystrofina-DAG w mięśni prążkowanym jest połączenie aparatu skurczu i cytoszkieletu z macierzą zewnątrzkomórkową, pozwalające na przenoszenie napięcia z aparatu skurczu. Brak kompleksu, lub jego defekt, powodują destabilizację peryferyjnych części włókna mięśniowego i obniżenie siły, jaką może ono rozwijać w czasie skurczu. Prowadzi to do mniejszej efektywności pracy mięśnia, jak też może ułatwiać mechaniczne uszkodzenia włókien w czasie skurczu [8, 27, 79, 83, 84].

Obecność dystrofiny i prawidłowy skład kompleksu dystrofina-DAG są warunkiem prawidłowego funkcjonowania sarkolemy. Defektem kompleksu towarzyszy zmniejszona mechaniczna i osmotyczna odporność i wiotkość sarkolemy, co prowadzi do łatwości jej uszkodzenia [25, 68, 83, 85]. Wydaje się więc, że kompleks dystrofina-DAG jest częścią, rozwiniętego w mięśni prążkowanym, mechanizmu wzmacniającego błonę komórkową. Podobieństwo budowy dystrofiny do spektryny sugeruje jej udział w utrzymywaniu elastyczności błony i ochronie błony przed mechanicznym urazem. Przypuszczalnie utrofina pełni podobną rolę do dystrofiny i może ją częściowo zastępować funkcjonalnie, a także może z nią być syntetyzowana zamiennie, ponieważ przy braku dystrofiny utrofina pojawia się w obrębie całej sarkolemy [8, 38, 68, 79, 83].

Zmniejszona mechaniczna i osmotyczna odporność sarkolemy w mięśni dystroficznych ułatwia jej uszkodzenia i prowadzi do zwiększenia przepuszczalności. Umożliwia to wydostawanie się zawartości z włókna mięśniowego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, i odwrotnie. Efektem uszkodzeń lub/i zwiększonej przepuszczalności sarkolemy jest podwyższenie poziomu enzymów mięśniowych w osoczu (na co wskazuje zwiększona ich aktywność w osoczu), a także przedostawanie się do włókna mięśniowego zawartości przestrzeni międzykomórkowej, w tym jonów Ca^{2+} . Podwyższony poziom jonów Ca^{2+} jest powszechnie stwierdzany w dystroficznych włóknach mięśniowych. Zwiększony napływ jonów Ca^{2+} do komórki jest również uważany za bezpośredni skutek nieprawidłowości kompleksu dystrofina-DAG, ponieważ kompleks uczestniczy w regulacji przepuszczalności kanałów wapniowych sarkolemy [4, 68, 83, 86]. Jak się powszechnie przypuszcza, podwyższony poziom jonów Ca^{2+} w dystroficznym włóknie mięśniowym

przyczynia się do powstawania jego uszkodzeń i zmian nekrotycznych. Może następować to w wyniku zarówno aktywacji kalpain [87, 88], jak i bezpośredniego niszczącego działania jonów Ca^{2+} na włókno mięśniowe [89, 90].

Powszechnie wiadomo, że prawidłowe przekazywanie sygnałów z przestrzeni pozakomórkowej jest warunkiem normalnego funkcjonowania komórki. Można więc przypuszczać, że zaburzenie przekazywania sygnałów, w wyniku defektu kompleksu DAG, staje się przyczyną nekrozy albo apoptozy włókna mięśniowego lub innych zmian spotykanych w dystrofii [60].

Wymienione przypuszczalnie efekty wadliwego funkcjonowania kompleksu dystrofina-DAG-merozyna były w przeszłości przyjmowane jako alternatywne przyczyny powstawania zmian nekrotycznych i degeneracyjnych w dystroficznym mięśni. Wydaje się jednak, że wobec wielofunkcyjności kompleksu, te niekorzystne zjawiska mogą zachodzić równocześnie i wzajemnie się potęgować [79].

Rola dystrofiny i jej izoform, jak też białek DAG w innych tkankach jest bardzo mało poznana. Ze względu na wielofunkcyjność tych białek, trudno jest ekstrapolować wnioski uzyskane z badań mięśni.

V. Uwagi końcowe

Rola dystrofiny i związanego z nią kompleksu glikoproteinowego sarkolemy jest ciągle daleka od pełnego wyjaśnienia. Można przypuszczać, że kompleks ten pełni we włóknie mięśniowym bardzo istotne następujące funkcje.

1) za pośrednictwem kompleksu dystrofina-DAG-merozyna aparat skurczu mięśnia szkieletowego jest połączony z macierzą zewnątrzkomórkową i tą drogą przenoszone zostaje napięcie wytwarzane przez aparat skurczu.

2) Kompleks dystrofina-DAG jest receptorem lamininy, a w obrębie synapsy nerwowo-mięśniowej receptorem agryny. Kompleks jest przekaźnikiem sygnałów, uczestniczącym w kontroli organizacji receptora acetylocholinowego i innych białek w obrębie synapsy nerwowo-mięśniowej, jak też przypuszczalnie w kontroli organizacji cytoszkieletu komórki.

3) Obecność kompleksu dystrofina-DAG wydaje się być warunkiem prawidłowego funkcjonowania sarkolemy. Nieprawidłowości w obrębie kompleksu są przyczyną zmniejszonej mechanicznej i osmotycznej odporności sarkolemy i w efekcie łatwości jej uszkodzenia oraz zwiększenia przepuszczalności.

4) Brak lub ułomność poszczególnych komponent kompleksu prowadzi do niestabilności i zmniejszenia zawartości innych jego składników oraz niektórych innych białek włókna mięśniowego. Wadliwa struktura i/lub funkcjonowanie kompleksu jest wspólną cechą kilku różnych dystrofii mięśniowych i jest uważana za przyczynę najcięższych objawów dystroficznych.

Podziękowanie

Autorki pragną podziękować Prof. Barbarze Grzelakowskiej-Sztaber i Prof. Irenie Niebrój-Dobosz za cenne uwagi oraz Pani Hannie Chomontowskiej za pomoc w przygotowaniu pracy do druku.

Artykuł otrzymano 26 lutego 1996 r.
Zaakceptowano do druku 5 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Kwiatkowska J, Słomski R (1992) *Post Biochem* **38**: 49-55
2. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM (1987) *Cell* **51**: 919-928
3. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) *Cell* **53**: 219-228
4. Fabbrizio E, Pons F, Robert A, Hugon G, Bonet-Kerrache A, Mornet D (1994) *J Muscle Res Cell Motil* **15**: 595-606
5. Levine BA, Moir AJG, Patchell VB, Perry SV (1990) *FEBS Lett* **263**: 159-162
6. Davison MD, Critchley DR (1988) *Cell* **52**: 159-160
7. Koenig M, Kunkel LM (1990) *J Biol Chem* **265**: 4560-4566
8. Ahn AH, Kunkel LM (1993) *Nature Genetics* **3**: 283-291
9. Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE (1989) *Nature (Lond)* **339**: 55-58
10. Wagner KR, Cohen JB, Haganir RL (1993) *Neuron* **10**: 511-522
11. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) *Nature (Lond)* **323**: 646-650
12. Górecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ (1992) *Human Mol Genet* **1**: 505-510
13. Tamura T, Yoshioka K, Jinno Y, Niikawa N, Miike T (1993) *J Neurol Sci* **115**: 214-218
14. Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5346-5350
15. Rapaport D, Lederfein D, den Dunnen JT, Grootscholten PM, Van Ommen G-J B, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D (1992) *Differentiation* **49**: 187-193
16. Matsumura K, Yamada H, Shimizu T, Campbell KP (1993) *FEBS Lett* **334**: 281-285
17. Fabbrizio E, Nudel U, Hugon G, Robert A, Pons F, Mornet D (1994) *Biochem J* **299**: 359-365
18. Górecki DC, Barnard EA (1995) *NeuroReport* **6**: 893-896
19. Man N, Helliwell TR, Simmons C, Winder SJ, Kendrick-Jones J, Davies KE, Morris GE (1995) *FEBS Lett* **358**: 262-266
20. Carr CH, Fischbach GD, Cohen JB (1989) *J Cell Biol* **109**: 1753-1764
21. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J (1995) *TIBS* **20**: 133-135
22. Ohlendieck K, Campbell KP (1991) *FEBS Lett* **283**: 230-234
23. Wakayama Y, Shibuya S, Jimi T, Takeda A, Oniki H (1993) *Acta Neuropathol* **86**: 567-577
24. Ervasti JM, Campbell KP (1991) *Cell* **66**: 1121-1131
25. Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G, Burghes AHM, Belfall B, Klamut HJ, Talbot J, Hodges RS, Ray PN, Worton RG (1988) *Nature (Lond)* **333**: 466-469
26. Yoshida M, Ozawa E (1990) *J Biochem* **108**: 748-752
27. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) *Nature (Lond)* **355**: 696-702
28. Ervasti JM, Campbell KP (1993) *J Cell Biol* **122**: 809-823
29. Miyatake M, Miike T, Zhao J-E, Yoshioka K, Uchino M, Usuku G (1991) *Muscle & Nerve* **14**: 113-119
30. Masuda T, Fujimaki N, Ozawa E, Ishikawa H (1992) *J Cell Biol* **119**: 543-548
31. Straub V, Bittner RE, Leger JJ, Voit T (1992) *J Cell Biol* **119**: 1183-1191
32. Porter GA, Dmytrenko GM, Winkelmann JC, Bloch RJ (1992) *J Cell Biol* **117**: 997-1005
33. Dąbrowska R, Grązewicz MA (1995) *Post Biochem* **41**: 165-174
34. Wessels A, Ginjaar IB, Moorman AFM, Van Ommen G-J B (1991) *Muscle & Nerve* **14**: 1-7
35. Peri V, Ajdukovic B, Holland P, Tuana BS (1994) *Mol Cell Biochem* **130**: 57-65
36. Byers TJ, Kunkel LM, Watkins SC (1991) *J Cell Biol* **115**: 411-421
37. Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SD, Leveille CJ, Campbell KP (1991) *Neuron* **7**: 499-508
38. Mizuno Y, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E (1993) *J Neurol Sci* **119**: 43-52
39. Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8307-8313
40. Apel ED, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP (1995) *Neuron* **15**: 115-126
41. Suzuki A, Yoshida M, Yamamoto H, Ozawa E (1992) *FEBS Lett* **308**: 154-160
42. Fallon JR, Hall ZW (1994) *TINS* **17**: 469-473
43. Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH (1994) *Cell* **77**: 663-674
44. Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP (1993) *J Biol Chem* **268**: 23739-23742
45. Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E (1994) *J Biochem* **115**: 162-167
46. Butler MH, Douville K, Murnane AA, Kramarcy NR, Cohen JB, Sealock R, Froehner SC (1992) *J Biol Chem* **267**: 6213-6218
47. Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC (1994) *NeuroReport* **5**: 1577-1580
48. Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E (1995) *J Cell Biol* **128**: 373-381
49. Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1995) *J Biol Chem* **270**: 4975-4978
50. Belkin AM, Burridge K (1995) *J Biol Chem* **270**: 6328-6337
51. Mercurio AM (1995) *Trends in Cell Biol* **5**: 419-423
52. Leivo I, Engvall E (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 1544-1548
53. Hayashi YK, Engvall E, Arikawa-Hirasawa E, Goto K, Koga R, Nonaka I, Sugita H, Arahata K (1993) *J Neurol Sci* **119**: 53-64
54. Filipek A (1994) *Post Biochem* **40**: 55-58
55. Patthy L, Nikolics K (1994) *Neurochem Int* **24**: 301-316
56. Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S (1994) *Cell* **77**: 675-686
57. Winder SJ, Kendrick-Jones J (1995) *FEBS Lett* **357**: 125-128
58. Shemanko CS, Sanghera JS, Milner RE, Pelech S, Michalak M (1995) *Mol Cellular Biochem* **152**: 63-70
59. Madhavan R, Jarrett HW (1994) *Biochemistry* **33**: 5797-5804
60. Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP (1995) *J Biol Chem* **270**: 11711-11714
61. Hausmanowa-Petrusewicz I (1993) W: Hausmanowa-Petrusewicz (red) Choroby mięśni, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str 189-228
62. Comi GP, Prella A, Bresolin N, Moggio M, Bardoni A, Gallanti A, Vita G, Toscano A, Ferro MT, Bordoni A, Fortunato F, Ciscato P, Felisari G, Tedeschi S, Castelli E, Garghentino R, Turconi A, Fraschini P, Marchi E, Negretto GG, Adobbati L, Meola G, Tonin P, Papadimitriou A, Scarlato G (1994) *Brain* **117**: 1-14
63. Beyenburg S, Zierz S, Arahata K, Mundegar RR, Friedl W, Jerusalem F (1994) *J Neurol* **241**: 210-217
64. Emery AEH (1994) *Neuromusc Disord* **4**: 301-303
65. Oldfors A, Eriksson BO, Kyllerman M, Martinsson T, Wahlstrom J (1994) *Br Heart J* **72**: 344-348
66. Hausmanowa-Petrusewicz I, Zaremba J, Fidziańska A, Zimowski J, Bisko M, Badurska B,

- Fidziańska E, Lusakowska A, Borkowska J (1993) *Acta Neurobiol Exp* **53**: 297-303
67. Morandi L, Mora M, Bernasconi P, Mantegazza R, Gebbia M, Balestrini MR, Cornelio F (1993) *Neuromusc Disord* **3**: 65-70
68. Matsumura K, Campbell KP (1994) *Muscle & Nerve* **17**: 2-15
69. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1189-1192
70. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott M-O, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, Williams JR, Schmickel RD, Sylvester JE (1988) *Nature (Lond)* **334**: 154-156
71. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ (1989) *Science* **244**: 1578-1579
72. Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Penettieri RA, Petrof B, Narusawa M, Leforovich JM, Sladky JT, Kelly AM (1991) *Nature (Lond)* **352**: 536-539
73. Pastoret C, Sebillé A (1995) *J Neurol Sci* **129**: 97-105
74. Sharp NJH, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, Bartlett RJ (1992) *Genomics* **13**: 115-121
75. Matsumura K, Tome FMS, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan J-C, Fardeau M, Campbell KP (1992) *Nature (Lond)* **359**: 320-322
76. Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FMS, Romero NB, Fardeau M, Beckmann JS, Kaplan J-C, Campbell KP (1994) *Cell* **78**: 625-633
77. Xu H, Christmas P, Wu X-R, Wewer UM, Engvall E (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5572-5576
78. Sugita H, Hayashi YK, Arikawa-Hirasawa E, Nonaka I, Arahata K (1995) *Acta Cardiomiol* **VII**: 3-9
79. Ohlendieck K (1996) *Eur J Cell Biol* **69**: 1-10
80. Minetti C, Tanji K, Gasparo Ripa P, Morreale G, Cordone G, Bonilla E (1994) *Neurology* **44**: 1149-1153
81. Matsumura K, Nonaka I, Campbell KP (1993) *Lancet* **341**: 521-522
82. Campbell KP (1995) *Cell* **80**: 675-679
83. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3710-3714
84. Pasternak C, Wong S, Elson EL (1995) *J Cell Biol* **128**: 355-361
85. Menke A, Jockusch H (1991) *Nature (Lond)* **349**: 69-71
86. Turner PR, Fong P, Denetclaw WF, Steinhardt RA (1991) *J Cell Biol* **115**: 1701-1712
87. Jakubiec-Puka A (1993) *Post Biochem* **39**: 251-258
88. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994) *FASEB J* **8**: 814-822
89. Duncan CJ (1987) *J Cell Sci* **87**: 581-594
90. Trump BF, Berezesky IK (1995) *FASEB J* **9**: 219-228

*Pani Profesor Zofii Zielińskiej
z wyrazami szacunku i sympatii
Pracownia Białek Wiążących Wapń*

Kalcyklina — Białko wiążące wapń z rodziny S-100

Calyclin — A calcium binding protein of the S-100 family

ANNA FILIPEK¹,
URSZULA WOJDA²,
WIESŁAWA LEŚNIAK¹
JACEK KUŹNICKI³

Spis treści:

- I. Wprowadzenie
- II. Odkrycie kalcykliny i jej występowanie
- III. Struktura kalcykliny
- IV. Funkcja kalcykliny
- V. Uwagi końcowe

I. Wprowadzenie

Kalcyklina jest białkiem wiążącym jony wapnia, posiadającym tzw. motyw "EF-hand" — wyspec-

Contents:

- I. Introduction
- II. Discovery of calyclin
- III. Structure of calyclin
- IV. Function of calyclin
- V. Final remarks

jalizowane struktury umożliwiające wiązanie tego kationu. Pojedynczy motyw "EF-hand" składa się z dwóch odcinków α -helisy połączonych pętlą zawierającą głównie kwaśne reszty aminokwasowe, które poprzez atomy tlenu koordynują jon wapnia tworząc kompleks o strukturze oktaedrycznej.

Analiza sekwencji białek wiążących jony wapnia wykazała, że są one zbudowane najczęściej z dwóch,

¹ Dr, ² mgr, ³ prof. dr hab., Zakład Biochemii Mięśni, Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

czterech lub sześciu motywów "EF-hand". Typowymi przykładami białek zawierających 4 motywy "EF-hand" są kalmomodulina i troponina C. Znane są także parwalbuminy zbudowane z trzech motywów "EF-hand", z których jeden jest niefunkcjonalny. Dotychczas zidentyfikowano ponad 200 białek zawierających motywy "EF-hand". Strukturę i występowanie wielu z nich zbadano, ale tylko dla nieznacznej części tych białek określono funkcję [1].

Białka zbudowane z dwóch motywów "EF-hand" stanowią grupę zwaną rodziną białek S-100 [2-5]. Przykładami białek z tej rodziny są: mózgowie białka S-100 α i S-100 β , kalbindyna D-9k, białka MRP-8 i MRP-14, białko p11, kalwaskulina. Do tej rodziny należy też kalcyklina.

Zmiana konformacji białek wiążących Ca²⁺ jaka dokonuje się po związaniu jonów wapnia sprawia, że białka te mogą łączyć się z białkami efektorowymi — enzymami i białkami strukturalnymi. W ten sposób białka wiążące Ca²⁺ wpływają na różne procesy komórkowe takie jak: skurcz mięśni, ruchliwość komórek niemięśniowych, uwalnianie neurotransmiterów, procesy endocytozy i egzocytozy, metabolizm glikogenu, proteoliza, procesy związane z mitozą i komunikacją międzykomórkową.

II. Odkrycie kalcykliny i jej występowanie

Kalcyklinę po raz pierwszy wyizolowano z komórek raka wysiękowego Ehrlicha w naszym laboratorium [6]. Jednak istnienie tego białka postulowano wcześniej badając geny aktywowane przez czynniki wzrostowe. Zidentyfikowano wówczas gen kalcykliny i pokazano, że poziom mRNA kalcykliny zmienia się w sposób zależny od fazy cyklu komórkowego [7, 8]. Podwyższoną ekspresję kalcykliny zaobserwowano też w ostrych białaczkach szpikowych. Na podstawie tych danych sugerowano, że kalcyklina może brać udział w progresji cyklu komórkowego. Nowsze badania wskazują, że kalcyklina występuje w wielu różnych tkankach i komórkach [9-11]. Jej obecność stwierdzono np., w komórkach nabłonkowych i fibroblastach [12-14], w płytkach krwi u człowieka [15] i w niektórych neuronach mózgu szczura [16]. Izoformy kalcykliny wyizolowano także z tkanki doczesnej myszy [17], z tkanki płucnej królika [18], z mięśni gładkich żołądka kurczęcia [19, 20] oraz z mięśnia sercowego wołu [21].

III. Struktura kalcykliny

Na podstawie sekwencji nukleotydów genu kalcykliny sugerowano, że hipotetyczny produkt tego genu jest białkiem wiążącym jony wapnia [22]. Badania przeprowadzone w naszym laboratorium potwierdziły tę hipotezę. Metodami bezpośrednimi i pośrednimi pokazano, że kalcyklina z komórek raka Ehrlicha wiąże dwa jony wapnia i zmienia swoją konformację

po związaniu tego kationu [6, 23]. Zmiana konformacji pod wpływem jonów wapnia jest cechą charakteryzującą białka wiążące jony wapnia, zawierające motywy "EF-hand". W wyniku zmiany konformacji wzrasta hydrofobowość kalcykliny, co zostało wykorzystane m.in. do oczyszczenia tego białka na kolumnie z hydrofobowym nośnikiem — fenylo-Sepharozą. Wykazano także, że kalcyklina wiąże jony cynku podobnie jak białko S-100 β [24] oraz, że w sposób zależny od stężenia jonów wapnia wiąże się z kwasem sjałowym [25]. Wiązanie ligandów niebiałkowych, hydrofobowość, immunogenność i inne właściwości badano zarówno dla całej cząsteczki kalcykliny jak i dla jej fragmentów otrzymanych po rozszczepieniu bromocyjanem [26].

Izofорма kalcykliny z komórek raka Ehrlicha zawiera jedną resztę cysteiny i, w odróżnieniu od kalcykliny wyizolowanej z płuc królika i z mięśni gładkich żołądka kurczęcia, tworzy dwa rodzaje dimerów: kowalencyjny i niekowalencyjny. Przy zastosowaniu odczynników sieciujących i metody filtracji żelowej pokazano, że formą fizjologiczną kalcykliny jest dimer niekowalencyjny [27]. Wyniki te zostały ostatnio potwierdzone przez Chazina i wsp., którzy opisali strukturę dimeru kalcykliny stosując metodę magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [28]. Wykazano, że wszystkie motywy "EF-hand" w dimerze są w ścisłym kontakcie między sobą. Obie podjednostki łączą się N- i C-końcowymi odcinkami α -helis, co nadaje białku charakter globularny.

IV. Funkcja kalcykliny

Poziom mRNA kalcykliny wzrasta w fazie G₁ cyklu komórkowego po sytmulacji fibroblastów w hodowli czynnikami wzrostowymi [9, 22]. Podwyższony poziom ekspresji kalcykliny związany jest często z transformacją nowotworową [7, 8, 11, 25, 29], a w nowotworach o wysokim stopniu przerzutowości obserwuje się nawet 10-krotny wzrost poziomu kalcykliny [30]. W tkankach prawidłowych kalcyklina występuje głównie w komórkach proliferujących takich jak fibroblasty i komórki nabłonkowe [12], co może wskazywać na (przypuszczalny) udział kalcykliny w procesach związanych z podziałami komórkowymi. Stany patologiczne, które cechuje zwiększona proliferacja tych dwóch typów komórek mogą być diagnozowane na podstawie oznaczenia poziomu kalcykliny [13, 14].

Liczne badania sugerują, że kalcyklina może również pełnić rolę w procesach różnicowania. I tak np. poziom mRNA kalcykliny wzrastał podczas różnicowania się komórek PC12 pod wpływem nerwowego czynnika wzrostowego [31, 32], w komórkach linii neuroblastoma (nerwiaka zarodkowego) po traktowaniu kwasem retinowym [10, 29] oraz w procesach różnicowania komórek mieszka włosowego [33]. Innym przykładem udziału kalcykliny w procesach różnicowania może być jej ekspresja w tkankach narzą-

dów rozrodczych u ciężarnej myszy [34].

Wysoki poziom kalcykliny obserwowany jest też w tkankach wydzielniczych, co sugeruje jej udział w procesie sekrecji [35]. Kalcyklina może być również wydzielana do przestrzeni międzykomórkowej, a zatem może uczestniczyć w różnych procesach na zewnątrz komórki [17, 35-37]. Wykazano m.in., że kalcyklina stymuluje komórki trofoblastów łożyska do wydzielania laktogenu [17], a podana z zewnątrz stymuluje wydzielanie insuliny przez komórki β trzustki [36]. Kalcyklina może też brać udział w procesach wydzielania śluzu [35] oraz w regeneracji komórek nabłonkowych rogówki oka [38].

Zmiana konformacji kalcykliny indukowana jonami wapnia wpływa na jej oddziaływanie z innymi białkami, tak jak ma to miejsce w przypadku kalmoduliny [39]. Zidentyfikowano dwa białka, które reagują z kalcykliną z komórek Ehrlicha po związaniu przez nią jonów wapnia. Są to aneksyna II (p36) i dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego [40-42]. Natomiast kalcyklina wyizolowana z płuc królika wiąże się z aneksyną XI (CAP-50) zależnie od stężenia jonów wapnia [43], a izoforma kalcykliny z mięśni gładkich żołądków kurcząt — z kaldesmonem i kalponiną [19, 20, 44]. Fizjologiczne znaczenie kompleksów kalcykliny z jej potencjalnymi białkami docelowymi

Tabela 1.

Białka z rodziny S-100

Nazwa w/g najnowszej nomenklatury	Synonimy	Występowanie	Ekspresja zależna od cyklu komórkowego lub etapu różnicowania	Przypuszczalna funkcja
S100A1	S100 α , S100A	neurony, nerka, tkanka mięśniowa	+	regulacja: cyklu komórkowego, procesów energetycznych, skurczu
S100A2	S100L, CaN19	komórki tkanki płucnej		
S100A3	S100E			
S100A4	Kalwaskulina, CAPL, p9Ka, 42A, pEL98, mts1, metastatyna, 18A2	komórki mioepitelialne, komórki nowotworowe o wysokim stopniu przerzutowości	+	regulacja cyklu komórkowego, różnicowanie, regulacja funkcji cytoszkieletu
S100A5	S100D			
S100A6	Kalcyklina , CACY, 2A9, PRA, CaBP, 5B10	fibroblasty, komórki nabłonkowe	+	różnicowanie, sekrecja, regulacja cyklu komórkowego i funkcji cytoszkieletu
S100A7	PSOR1, psoriasisyna	łożysko ludzkie, zmieniony chorobotwórczo naskórek		
S100A8	Kalgranulina A, MRP-8, p8, MAC387, B8Ag, L1Ag, CP-10, MIF, NIF	granulocyty, monocyty, makrofagi w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych	+	odpowiedź na czynniki chemotaktyczne, regulacja cyklu komórkowego, regulacja aktywności kinaz, różnicowanie
S100A9	kalgranulina B, CFAG, MRP14, p14, MAC387, B8Ag, L1Ag, MIF, NIF	granulocyty, monocyty, makrofagi w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych	+	odpowiedź na czynniki chemotaktyczne, regulacja cyklu komórkowego, regulacja aktywności kinaz
S100A10	p11, lekki łańcuch kalpaktyny, p10, 42C	obszar podbłonowy różnych typów komórek	+	regulacja uwalniania neurotransmiterów, przeciwdziałanie stanom zapalnym
S100B	NEF, S100 β	tkanka glejowa, tkanka tłuszczowa	+	różnicowanie oraz regulacja: cyklu komórkowego, procesów energetycznych, funkcji cytoszkieletu, skurczu
S100C	kalgizaryna	mięśnie gładkie żołądka kurczęcia		
S100P		łożysko ludzkie	+	
CALB3	ICaBP, kalbindyna D9k	komórki nabłonkowe jelita cienkiego		bufor jonów wapnia, regulacja homeostazy wapniowej
S100F-P	profilagryna	komórki naskórka	+	regulacja funkcji cytoszkieletu
S100F-T	trichohialina	komórki naskórka	+	regulacja funkcji cytoszkieletu

mi: dehydrogenazą aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aneksyną II, aneksyną XI, kaldesmonem czy kalponiną nie jest dotychczas jednoznacznie wyjaśnione. Gabius i wsp. [25] oraz Zeng i Gabius [21] wykazali, że kalcyklina wiąże się z kwasem sjałowym, będącym jednym ze składników tzw. błon podstawnych tkanek, co może potwierdzać obecność kalcykliny w błonach komórkowych. Ponieważ Murphy i wsp. [45] wykazali, że kalcyklina jest białkiem połączonym z receptorem prolaktyny gruczołu piersiowego człowieka można spodziewać się udziału tego białka w procesach związanych z regulacją hormonalną.

Uwagi końcowe

Opisane w niniejszym artykule dane dotyczące kalcykliny pokazują jak dużo wiadomo na temat jej struktury, właściwości i występowania, i jak mało na temat rzeczywistych funkcji tego białka. Szczególnie istotną rolę w poznaniu struktury kalcykliny odegrały badania Chazina i wsp., którzy określili przy użyciu NMR jej strukturę trzyczłonową. Potwierdzili oni wyniki uzyskane wcześniej w naszym laboratorium, pokazujące, że w stanie natywnym kalcyklina występuje w postaci niekowalencyjnego dimeru. Kwestia ta ma istotne znaczenie dla wyjaśnienia funkcji kalcykliny, gdyż niektóre białka z rodziny S-100 są aktywne biologicznie tylko w postaci dimeru o odpowiedniej konformacji. I tak np. proliferacja komórek gleju oraz różnicowanie się neuronów zachodzą *in vitro* pod wpływem tylko jednego z dimerów S-100 β i nie zachodzą pod wpływem monomeru S-100 β .

Postulowany udział kalcykliny w takich procesach komórkowych jak proliferacja, różnicowanie, wydzielanie, regulacja hormonalna czy też procesy związane z organizacją cytoszkieletu opiera się na wielu obserwacjach z różnych laboratoriów, ale brak jest dostatecznych dowodów na to, że kalcyklina bierze udział w tych procesach. Mało prawdopodobny jest również udział kalcykliny we wszystkich wspomnianych wyżej procesach chyba, że pełniłaby ona rolę czynnika buforującego Ca²⁺. Problem czy kalcyklina pełni rolę takiego czynnika czy też jest sensorem, który po aktywacji komórki przenosi sygnał na inne białka efektorowe pozostaje do wyjaśnienia.

Badanie kalcykliny i innych białek S-100 jest zagadnieniem pasjonującym i doprowadzi zapewne w najbliższym czasie do wyjaśnienia funkcji tych białek w komórce. Oprócz kalcykliny znanych jest 15 białek S-100 o różnej specyficzności komórkowej i pojawiających się na różnych etapach rozwoju komórki (Tab. 1). Jakże mechanizmy są odpowiedzialne za komórkowo specyficzne występowanie tych białek? Odpowiedź na to i inne pytania przyniosą badania regulacji ekspresji genów białek S-100 oraz badania ich interakcji z białkami docelowymi *in vivo*. Planujemy uczestniczyć w tego typu badaniach, a w szczególności zamierzamy

badać: rekombinowane białka S-100 i ich zmutowane formy, komórki transfekowane plazmidami kodującymi te białka, zwierzęta transgeniczne lub zwierzęta infekowane wektorami wirusowymi zawierającymi gen kalcykliny lub geny innych białek S-100. Wiedza na ten temat może być w przyszłości wykorzystana w praktyce do ukierunkowanej komórkowo ekspresji genów.

Praca wykonana w ramach grantu KBN Nr 6 P207 099 06

Artykuł otrzymano 26 lutego 1996 r.
Zaakceptowano do druku 5 marca 1996 r.

Piśmiennictwo

1. Heizmann CW, Hunziker W (1991) W: Bronner F (red) Intracellular Calcium Regulation Alan R Liss Inc, 211-247
2. Kligman D, Hilt DC (1988) *TIBS* **13**: 437-443
3. Donato R (1991) *Cell Calcium* **12**: 713-726
4. Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W (1995) *Brain Res Bull* **37**: 417-429
5. Fano G, Bioeca S, Fulle S, Mariggio MA, Belia S, Callisano P (1995) *Progress in Neurobiol* **46**: 71-82
6. Kuźnicki J, Filipek A (1987) *Biochem J* **247**: 663-667
7. Calabretta B, Kaczmarek L, Mars W, Ochoa D, Gibson CW, Hirschhorn RH, Baserga R (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 4463-4467
8. Calabretta B, Venturelli D, Kaczmarek L, Narni F, Talpaz M, Anderson B, Beran M, Baserga R (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 1495-1498
9. Guo X, Chambers AF, Parfett CLJ, Waterhouse P, Murphy LC, Reid RE, Craig AM, Edwards DR, Denhardt DT (1990) *Cell Growth Diff* **1**: 333-338
10. Tonini GP, Antonella C, Cara A, Di Martino D (1991) *Cancer Res* **51**: 1733-1737
11. Weterman MAJ, Stoopen G M, van Muijen G NP, Kuźnicki J, Fuiter DJ, Bloemers HPJ (1992) *Cancer Res* **52**: 1291-1296
12. Kuźnicki J, Kordowska J, Puzianowska M, Woźniewicz BM (1992) *Exp Cell Res* **200**: 425-430
13. Woźniewicz BM, Kordowska J, Kluge P, Puzianowska M, Kuźnicki J (1993) *Acta Histochem Cytochem* **26**: 397-404
14. Kordowska J, Apel A, Brand IA, Kuźnicki J (1994) *Acta Histochem Cytochem* **27**: 205-218
15. Tomida Y, Terasawa M, Kabayashi R, Hidaka H (1992) *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1310-1316
16. Filipek A, Puzianowska M, Cieślak B, Kuźnicki J (1993) *NeuroReport* **4**: 383-386
17. Thordarson G, Southard JN, Talamantes F (1991) *Endocrinology* **129**: 1257-1265
18. Tokumitsu H, Kabayashi R, Hidaka H (1991) *Arch Biochem Biophys* **288**: 202-207
19. Mani RS, McCubbin WD, Kay CM (1992) *Biochemistry* **31**: 1398-1404
20. Filipek A, Zasada A, Wojda U, Makuch R, Dąbrowska R (1996) *Comp Biochem Physiol* **113B**: w druku
21. Zeng F-Y, Gabius HJ (1992) *Biochem Int* **26**: 17-24
22. Calabretta B, Battini R, Kaczmarek L, DeRiel JK, Baserga R (1986b) *J Biol Chem* **261**: 12628-12632
23. Kuźnicki J, Filipek A, Hunziker PE, Huber S, Heizmann CW (1989) *Biochem J* **263**: 951-956
24. Filipek A, Heizmann CW, Kuźnicki J (1990) *FEBS Lett* **264**: 263-266
25. Gabius HJ, Bardosi A, Gabius S, Hellmann KP, Karas M, Kratzin H (1989) *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 506-512
26. Wojda U, Kuźnicki J (1993) *Int J Biochem* **25**: 999-1007
27. Wojda U, Kuźnicki J (1994) *Biochim Biophys Acta* **1209**: 248-252
28. Potts BCM, Smith J, Akke M, Macke TJ, Okazaki K, Hidaka H, Case DA, Chazin WJ (1995) *Nat Struct Biol* **2**: 790-796

29. Tonini GP, Fabretti G, Kuźnicki J, Massimo L, Scaruffi P, Brisigotti M, Mazzocco K (1995) *Eur J Canc* **31A**: 499-504
30. von Groningen JJM, Weterman MAJ, Swart GW M, Bloemers HPJ (1995) *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 1122-1131
31. Leonard DB, Ziff EB, Greene LA (1987) *Moll Cell Biol* **7**: 3156-3167
32. Thompson MA, Ziff EB (1989) *Neuron* **2**: 1043-1053
33. Wood L, Carter D, Mills M, Hatzenbuehler N, Vogeli G (1991) *J Invest Dermatol* **96**: 383-387
34. Waterhouse P, Parhar RS, Guo X, Lala PK, Denhardt DT (1992) *Molec Reprod Devel* **32**: 315-323
35. Timmons PM, Chan C-TJ, Rigby PWJ, Poirier F (1993) *J Cell Sci* **104**: 187-196
36. Okazaki K, Niki I, Iino S, Kabayashi S and Hidaka H (1994) *J Biol Chem* **269**: 6149-6152
37. Celis JE, Gesser B, Rasmussen HH, Madsen P, Leffers H, Dejgaard K, Honore B, Olsen E, Ratz G, Lauridsen JB, Basse B, Mouritzen S, Hellerup M, Andersen A, Walbum E, Celis A, Bauw G, Puype M, Damme JV, Vandekerckhove J (1990) *Electrophoresis* **11**: 989-1071
38. Bazan HEP, Allan G, Bazan NG (1992) *Exp Eye Res* **55**: 173-177
39. Leśniak W (1989) *Post Biochem* **35**: 63-88
40. Filipek A, Gerke V, Weber K, Kuźnicki J (1991) *Eur J Biochem* **195**: 795-800
41. Zeng FY, Gerke V, Gabius HJ (1993) *Int J Biochem* **25**: 1019-1027
42. Filipek A, Wojda U, Leśniak W (1995) *Inter J Biochem Cell Biol* **27**: 1123-1131
43. Tokumitsu H, Mizutani A, Minami H, Kobayashi R, Hidaka H (1992) *J Biol Chem* **267**: 8919-8924
44. Wills FL, McCubbin WD, Kay CM (1993) *Biochemistry* **32**: 2321-2328
45. Murphy LC, Murphy LJ, Tsuyuki D, Duckworth ML, Shiu RPC (1988) *J Biol Chem* **263**: 2397-2401

Nauczycielom pisania

Po raz pierwszy uczyłem się pisać w szkole podstawowej, w której dyrektorką i polonistką w jednej osobie była pani Genowefa Starzykowa. Lubiła Ona by wypracowania były długie i kwieciste. Ale ja woląłem grać w piłkę nożną. Po raz drugi uczyłem się pisać w liceum ogólnokształcącym, w którym polonistką była pani profesor Maria Bąbalina. Wymagała ona by wypracowania były krótkie i rzeczowe. Ale ja woląłem grać na gitarze. Po raz trzeci uczyłem się pisać gdy przyniosłem do redakcji „Postępów Biochemii” swój pierwszy maszynopis. Ale wtedy już woląłem by artykuł przyjęto do druku... Okazało się jednak, że to co według mnie było gotowym maszynopisem, było tylko zbiorem informacji wymagających radykalnych zmian i poprawek. Poprawiony przez Redaktora „Postępów Biochemii” tekst roił się od słusznych sugestii, zmian, znaków zapytania przy żargonowych lub angielsko-języcznych określeniach. I choć nie było to miłym przeżyciem dla mego „ego”, to dzięki temu, że wszystkie uwagi były pełne życzliwości i fachowej rzetelności, przyjąłem je bez problemu. Następną wersję pracy spotkał ten sam życzliwy profesjonalizm, i każdy — kto przez to przeszedł — wie, że nie była to ostatnia wersja mojej pracy. Ale dzięki temu artykuł w ostatecznej wersji był taki jak być powinien: napisany poprawną polszczyzną, bez żargonu laboratoryjnego, zawierał istotne informacje i był zrozumiały dla nie specjalistów. Był to rok 1979. Życzliwą Redaktorką, która zajmowała się wtedy moim artykułem, i tak wiele mnie nauczyła, była pani Profesor Zofia Zielińska. Bardzo dziękuję Pani Profesor!

Od tego czasu minęło już siedemnaście lat, a od objęcia przez panią Profesor Zielińską funkcji Redaktora Naczelnego — prawie ćwierć wieku. 24. rok w służbie słowa, w służbie poprawnego porozumiewania się biochemików. Jeśli rocznie drukowano w „Postępach Biochemii” 25—30 artykułów, to przez 23 lata było ich ponad 600! A przecież, stanowi to mniej więcej 50% tych artykułów, które docierają do Redaktora Naczelnego, reszta nie zostaje przyjęta do druku. Jeśli tak liczyć, a jest to wyliczenie ostrożne, przez ręce pani Profesor Zielińskiej przeszło 1200 artykułów przeglądowych ze wszystkich dziedzin nauki związanych z biochemią i biologią molekularną! Każdy artykuł to co najmniej 20 stron tekstu, czyli... po raz pierwszy uczyłem się matematyki. W Postępach opublikowano ponadto wiele reguł polskiego słownictwa biochemicznego, wykaz nazw enzymów, leksykon wprowadzanych aktualnie terminów biochemicznych, recenzje blisko 150 książek, liczne materiały biograficzne oraz nie dające się zliczyć sprawozdania.

Przed kilkoma tygodniami otrzymałem kolejny zeszyt „Postępów Biochemii” (4/95) i z zaciekawieniem spojrziałem na spis treści. Znalazłem w nim m.in. takie tytuły: „Czy znamy już gen śmierci?”, „Diagnostyka molekularna”, „Terapia genowa”; czyli najbardziej „gorące” tematy współczesnej biologii. Treść i forma graficzna tych i innych artykułów okazała się być równie ciekawa, na wysokim poziomie merytorycznym i redakcyjnym. Słowem — jest to bardzo dobry, naukowo znaczący, zbiór artykułów przeglądowych. Co równie istotne, poprzednie zeszyty „Postępów Biochemii” reprezentowały podobnie wysoki poziom. Wszystko to świadczy o tym, że Redakcja

wypracowała już właściwą formułę pisma, a Autorzy dostarczają odpowiednio dobry materiał. Cieszy to ogromnie, bo kwartalnik „Postępy Biochemii” na naszym rynku wydawniczym ma do spełnienia bardzo istotne funkcje.

Po pierwsze, stanowi zbiór artykułów przeglądowych na temat współczesnych zagadnień biochemii i biologii molekularnej, czytany i wykorzystywany nie tylko przez pracowników nauki, ale również przez studentów. Artykuły te są często wykorzystywane przez pracowników dydaktycznych szkół wyższych. Kilka razy osobiście doświadczyłem miłej satysfakcji, gdy nie znani mi wcześniej młodzi pracownicy naukowcy wspominali moje artykuły z „Postępów Biochemii”, z którymi zapoznali się w czasie studiów. Niektórzy z nich, czasem studenci drugiego lub trzeciego roku studiów, publikują w „Postęпах Biochemii” znakomite artykuły. I to jest dodatkowy aspekt dydaktycznej funkcji „Postępów Biochemii”. Jest to miejsce, gdzie młodzi, utalentowani ludzie mogą opublikować swe pierwsze artykuły naukowe, opisując zagadnienia, które ich interesują i którymi chcą się zajmować. Mogąc uzyskać życzliwą pomoc i rady od Redaktorów tej klasy co profesorowie Andrzej Jerzmanowski, Grażyna Palamarczyk i Zofia Zielińska autorzy ci szybciej opanowują trudną sztukę pisania. A bez umiejętności panowania nad słowem pisany i mówiony, żaden uczonec nie może wypełnić ważnej społecznej funkcji. Nie może właściwie przekazać swej wiedzy, ani młodszemu pokoleniu pracowników naukowych, ani specjalistom z innych dziedzin, ani społeczeństwu.

Po drugie, oprócz funkcji dydaktycznych „Postępy Biochemii” mają do spełnienia istotną funkcję jaką jest kreowanie i wspieranie polskiej terminologii w nowych gałęziach nauk biologicznych. Gdyby nie istnienie tego forum kształtującego standardy w nazewnictwie, wprowadzającego polskie lub spolszczone terminy, nasze rozmowy laboratoryjne i teksty pisane po polsku pełne byłyby angielskich słów, żargonowych określeń, różnie lub niewłaściwie tłumaczonych terminów, określeń niezgodnych z międzynarodowymi ustaleniami. Stała współpraca Redakcji z panią Profesor Janiną Kwiatkowską ma dla spełnienia tej misji szczególne znaczenie. „Postępy Biochemii” są trwałym i istotnym punktem odniesienia dla polskiej terminologii biochemicznej i biologii molekularnej. Pani Profesor Zielińska jest autorytetem w wielu kwestiach językowych, do którego stale zwracają się zarówno młodzi jak i starsi pracownicy naukowcy.

Trzecią funkcją „Postępów Biochemii” jest tworzenie forum dla wymiany myśli i informacji dotyczących środowiska, takich jak informacje o działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, o krajowych i międzynarodowych zjazdach naukowych i szkołach, o problemach wydawniczych i o ofertach pracy.

Obecny wysoki poziom „Postępów Biochemii” cieszy mnie nie tylko dlatego, że doceniam wagę tego czasopisma i potrzebę jego istnienia. Cieszy mnie również dlatego, iż byłem jednym ze współorganizatorów wielu zmian w piśmie i redaktorem współodpowiedzialnym za pierwsze zeszyty zmodernizowanych „Postępów Biochemii”. Razem z Panią Profesor Zielińską — Redaktorem Naczelnym i mgr Bożeną Szymanowską — Redaktorem Technicznym — i mając życzliwe poparcie ówczesnej Prezes Towarzystwa pani Profesor Zofii Poremskiej — doprowadziliśmy do tego, że pismo, które było wydawane w nieatrakcyjnej szacie graficznej i formacie (kto jeszcze pamięta małe, zielone książeczki?) zaczęło być wydawane w formacie A4, w kolorowych okładkach i z kolorowymi reklamami. W 1989 roku kwartalnik miał dwuletnie zaległości, ale doprowadziliśmy do tego, iż wszystko co zostało wcześniej przyjęte do druku zostało opublikowane i że nowo przyjmowane artykuły były drukowane na bieżąco. Rezygnacja ze współpracy z PWN i bezpośredni kontakt z Drukarnią Naukowo-Techniczną, stworzenie własnego zespołu redakcyjnego, wprowadzenie limitu na długość artykułów, rezygnacja z Rady Programowej na rzecz publikowania nazwisk recenzentów i wiele innych drobniejszych zmian zostało wprowadzonych z myślą o wydawaniu lepszego pisma. Obecny zespół redakcyjny: Jolanta Grzybowska, Andrzej Jerzmanowski, Grażyna Palamarczyk, Anna Szakiel, Barbara Zarzycka i Zofia Zielińska tworzy wyśmienite pismo, w którym interesujące artykuły opisują najnowsze problemy biochemii i biologii molekularnej.

Od moich pierwszych kontaktów z Redakcją „Postępów Biochemii” i osobiście z Panią Profesor Zielińską minęło wiele lat. Zmieniło się pismo, natomiast Pani Profesor pozostała taka sama: ogromnie życzliwa ludziom, skromna, pracowita i rzetelna w swej pracy, choć jest to przecież cały czas praca społeczna. Jej ogromny profesjonalizm językowy i redakcyjny idzie w parze z odwagą i patriotyzmem. W czasach, gdy polityka wtrącała się również i do życia naukowego niełatwo było przemycić informacje o wielkich Polakach, biochemikach, którzy zginęli na Wschodzie. Niewiele

osób wie, ile serca i pracy włożyła Pani Profesor w to by ukazały się artykuły o Jakubie Parnasie. Podziwiam również u Pani Profesor młodzieńczą odwagę i otwartość na zmiany i nowości. To między innymi dzięki tym cechom możliwe było przełamanie oporu niektórych osób, które chciały, by „Postępy Biochemii” były takie jak dawniej. Myślę, że ta otwartość na zmiany doprowadzi do tego, że nie tylko na naszych biurkach będziemy mieli coraz lepsze numery naszego pisma, ale również, że już niedługo będziemy czytać artykuły z „Postępów ...” na ekranach naszych monitorów. „Postępy Biochemii” w Internecie? Czemu nie, z Panią Profesor nawet konie ...

Jacek Kuźmicki

Drodzy Czytelnicy

Materiały przedstawione w bieżącym zeszycie nie uszły, oczywiście, mej redaktorskiej uwadze. Niektóre z nich zdążyłam przejrzeć lub przeczytać jeszcze przed złożeniem w drukarni.

Dedykacje są miłe i wzruszające. Bogactwo zaś tematyczne i merytoryczne artykułów skłania do refleksji. Nasz kwartalnik jest dziełem wielu osób. Przede wszystkim Autorów, którzy zafascynowani odkryciami współczesnej biologii przysyłali do Redakcji „*Postępów Biochemii*” artykuły i recenzje książek, lub przekazywali tłumaczenia zasad słownictwa biochemicznego, materiały biograficzne, informacyjne i sprawozdawcze. Także, oczywiście, Redaktorów. Warto tu wspomnieć, że pierwsze zeszyty „*Postępów Biochemii*” ukazały się w połowie lat pięćdziesiątych. Redaktorem był wówczas Józef Heller, zastępcami Irena Chmielewska i Jerzy Medulski, sekretarzem zaś Maria Piechowska. Następnie kolejnymi redaktorami byli Irena Chmielewska i Witold Brzeski, oraz Zofia Lassota i Maria Monika Jezewska, a w pracach adiutorskich i korektorskich wspomagali ich Barbara Bulhak-Jachymczyk, Ewa Lityńska i Andrzej Rabczenko. Więcej danych o początkach kwartalnika można znaleźć w 12-tym jego tomie z 1966 roku, str. 3.

Gdy w 1973 roku podejmowałam obowiązki redaktora naczelnego kwartalnika — za zgodą Zarządu Głównego Towarzystwa Biochemicznego jako Wydawcy — utworzyłam kilkusobowy zespół redakcyjny. Skład zespołu zmieniał się z biegiem lat. Byli to, podaję według alfabety: Wojciech Ardelt, Barbara Czartoryska, Edward Czuryło, Magdalena Fikus, Barbara Grzelakowska-Sztabert, Danuta Hulanicka, Witold Jachymczyk, Andrzej Jerzmanowski, Jacek Kuźnicki, Stanisław Lewak, Piotr Masłowski, Grażyna Palamarczyk, Joanna Rytko, Jolanta Skangiell-Kramka, Anna Szakiel, Irena J. Szumiel, Józef Zborowski. Sekretarzami Redakcji oraz Adiustatorami byli kolejno: Małgorzata Balińska, Andrzej Wieraszko, Małgorzata Skup, Joanna Tępińska-Gondowicz, Bożena Kamińska, Małgorzata Szyszko, Bożena Szymanowska, a obecnie są: Jolanta Grzybowska, Krystyna Jesiotr i Barbara Zarzycka. Każdy z nich współdziałał w redagowaniu kwartalnika według swej wiedzy, specjalności i talentów. A ileż pismo zawdzięcza kompetencji Recenzentów i ich gotowości do współpracy z Redakcją.

Myślę, że mogę, Drodzy Czytelnicy, w Waszym i swoim imieniu serdecznie podziękować wszystkim: Autorom, Redaktorom, Recenzentom, Adiustatorom i Sekretarzom za społeczną, przyjazną współpracę w tworzeniu naszego kwartalnika.

Ze swej strony szczególnie dziękuję Autorom i Redaktorom bieżącego — urodzinowego zeszytu.

Zofia Zielińska

Wskazówki dla autorów

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

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

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

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

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

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

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

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

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

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

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

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

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

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499—502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: 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 „górną-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

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

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

