

Farmaceutski vestnik

STROKOVNO GLASILO SLOVENSKE FARMACIJE • PHARMACEUTICAL JOURNAL OF SLOVENIA

Š T . 4 • S E P T E M B E R 2 0 0 9 • L E T N I K 6 0

Odgovorni urednik

Borut Štrukelj

Častni glavni urednik

Aleš Krbavčič

Glavna urednica

Petra Slanc Može

Uredniški odbor

Janja Marc

Lucija Peterlin Mašič

Alenka Rutar Pariš

Andrijana Tivadar

Jurij Trontelj

Matjaž Tuš

Izdajateljski svet

Mira Abazovič

Mirjana Gašperlin

Mojca Prah Klemenčič

Katja Razinger

Sonja Rupret

Tanja Šegula

Anamarija Zega

Naslov uredništva / Address of the Editorial Office:

Slovensko farmacevtsko društvo,

Dunajska 184a, 1000 Ljubljana, Telefon (01) 569 26 01

Transakcijski račun pri Novi LB d.d. Ljubljana:

02010-0016686585.

Izhaja šestkrat letno.

Letna naročnina je 70 EUR.

Za tuje naročnike 100 US\$.

Tiska: COLLEGIUM GRAPHICUM

Naklada: 3.300 izvodov

Farmaceutski vestnik (Pharmaceutical Journal of Slovenia) is published 6 times a year by the Slovenian Pharmaceutical Society, Subscription rate in inland 70 EUR other countries US\$ 100.

Farmaceutski vestnik is regularly abstracted in:

BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHEMICAL ABSTRACTS, PHARMACEUTICAL ABSTRACTS, MEDICAL & AROMATIC PLANTS ABSTRACTS AND INBASE / Excerpta Medica

UVODNIK

Številka Farmaceutskega vestnika, ki je pred vami, je sestavljena iz dveh tematskih sklopov. V prvem sta dva prispevka, ki ju uvrščamo v skupino biofarmaceutskih znanosti. Tako raziskovalci iz farmacevtske družbe Lek pod vodstvom dr. S. Jevševar nadaljujejo pionirsko delo pokojnega dr. Viktorja Menarta o uporabi inkluzijskih telesc oziroma bakterijskih beljakovinskih agregatov v farmaciji, v drugem prispevku pa mag. P. Draškovič in dr. M. Podobnik opisujeta raznolikost in biološki pomen fosforiliranih derivatov inozitola.

V drugi tematski prilogi pa je predstavljena problematika uporabe zdravil pri mladostnikih. Uvodoma avtorice mag. N. Pisk, M. Pal in T. Stiplovšek ugotavljajo, da slovenski mladostniki prepoznavajo farmacevta kot vir informacij o zdravilih in lekarno kot okolje, kjer se izdajajo zdravila, preko spleta pa nakupujejo predvsem športno prehrano in izdelke za hujšanje. Mag. T. Kogovšek Vidmar opozarja, da se večina slovenskih uporabnikov interneta zanima za informiranje o varni uporabi zdravil na uradno pooblaščenih in akreditiranih spletnih straneh za možnost dvostranske komunikacije s farmaceutom. Avtorji R. Marčič, V. S. Rus in D. Kobal Grum v svojem prispevku izpostavljajo značilnosti mladostnikovega psihosocialnega razvoja in vedenja povezanega z zdravjem ter opozarjajo na dejavne tveganja in zaščite. Poleg tega nakazujejo smernice za učinkovito sodelovanje farmaceutov pri zdravstveni socializaciji mladostnikov. P. Truden Dobrin ugotavlja, da podatki iz anketnih raziskav razkrivajo nezdrav življenjski slog mladostnikov ob sicer relativno dobrem zdravju, kar je pomemben dejavnik pri nastanku bolezni. Zaskrbljujoča je predvsem uporaba zdravil skupaj z alkoholom. V prispevku S. Pečar Čad je potrjena teza o relativnem zdravju mladostnikov preko podatka, da je povprečno število predpisanih receptov na enega mladostnika 2,4 recepta, kar je trikrat manj kot na celotni populaciji. Dekletom, starim med 15 in 19 let so peroralni kontraceptivi najpogosteje predpisana zdravila, kar se manifestira z upadom stopnje splavnosti mladostnic. Sicer pa mladostniki porabijo največ zdravil za sistemsko zdravljenje infekcij, za bolezni dihal, z delovanjem na živčevje in za bolezni kože in podkožnega tkiva. V zadnjih dveh prispevkih mag. M. Abazovičeve in B. Madjarja pa bo bralec našel podrobno analizo uporabe zdravil na recept in recepta prostih zdravil za mladostnike skupaj z napotki kaj in kako svetovati pri izdaji teh zdravil, če pride v lekarno mladostnik sam oziroma skupaj z vrstniki ali s starši.

Verjameva, da tudi tokratna številka Farmaceutskega vestnika predstavlja zanimivo branje in da bodo tako lekarniški kot tudi industrijski farmacevti v njej našli dovolj izhodišč za usmerjanje strokovnega dela v svojem delovnem okolju.

prof. dr. Borut Štrukelj, odgovorni urednik
prof. dr. Aleš Mrhar, gostujoči urednik

Vsebina

Pregledni znanstveni članki – Review scientific articles

Petra Draškovič, Marjetka Podobnik

Raznolikost in biološki pomen fosforiliranih derivatov inozitola

Diversity and biological significance of phosphorylated derivatives of inositol

195

Špela Jalen, Špela Peternel, Katarina Fidler, Simona Jevševar

Uporabnost bakterijskih beljakovinskih agregatov v farmaciji

Applicability of bacterial protein aggregates in pharmaceutical industry

201

Tematska priloga – Zdravila in mladostniki

Marjetka Pal, Tina Stiplovšek

Zdravila in mladostniki

Medicinal products and adolescents

205

Tatjana Kogovšek Vidmar

Internet, e-lekarniške storitve in mladostniki

Internet, E-pharmacy services and adolescents

211

Marčič Renata, Rus Velko S, Kobal Grum Darja

Značilnosti in različni izidi zdravstvene socializacije v mladostništvu

Characteristics and different outcomes of health socialization in adolescence

215

Polonca Truden Dobrin

Kazalniki zdravja mladostnic in mladostnikov

Health indicators for adolescents

223

Silva Pečar Čad

Poraba zdravil pri mladostnikih

The usage of prescription drugs

226

Miroslava Abazovič

Uporaba zdravil na recept pri mladostnikih

Use of drugs on prescription at adolescents

230

Bojan Madjar

Svetovanje v lekarni ob izdaji izdelkov brez recepta za mladostnike

Pharmaceutical counselling when selling OTC products for adolescents

237

Novi doktorji znanosti

Rok Frlan

Načrtovanje, sinteza in vrednotenje sulfonohidrazidnih inhibitorjev Mur

243

Društvene novice

Nina Pisk

Predavanja lekarniških farmacevtov v šolah in vrtcih ob 4. Dnevu slovenskih lekarn

244

Petra Kocbek, Aleš Obreza, Saša Baumgartner

Poročilo o udeležbi na 2. mednarodnem simpoziju *PharmSciFair*

245

Raznolikost in biološki pomen fosforiliranih derivatov inozitola

Diversity and biological significance of phosphorylated derivatives of inositol

Petra Draškovič, Marjetka Podobnik

Povzetek: Molekula inozitola predstavlja osnovno ogrodje za nastanek številnih biološko aktivnih spojin. Med najbolj razširjenimi derivati so fosforilirane oblike, ki so lahko v vodi netopne, t.i. polifosfoinozitolni lipidi, ter vodotopne oblike, inozitol (poli)fosfati. Stereospecifična razporeditev ter število funkcionalnih skupin, fosfatov in/ali lipidov, vezanih na osnovni šestčlenski inozitolni obroč, pa tudi pogojuje njihovo funkcionalno raznolikost. Najbolj raziskan med inozitol fosfati je inozitol-1,4,5-trifosfat, sekundarna sporočevalna molekula, ki sprošča Ca^{2+} iz intracelularnih zalog. V naravi najbolj razširjen pa je inozitol heksakisfosfat (IP_6) ali fitinska kislina, ki je dobro znana po svojih ugodnih učinkih na organizme, potencialne antikancerogene in antiangiogenetske lastnosti pa kaže tudi njegov prekurzor, inozitol-1,3,4,5,6-pentakisfosfat ($((1,3,4,5,6)\text{IP}_5)$). $(1,3,4,5,6)\text{IP}_5$ in IP_6 sta tudi prekurzorja inozitol pirofosfatov, ki vsebujejo energijsko bogate di-fosfatne in pa tudi v zadnjem času odkrite tri-fosfatne skupine. Te molekule lahko brez pomoči encimov piro-fosforilirajo določene, že predhodno fosforilirane proteine. Tak nastanek pirofosforiliranih proteinov tako lahko predstavlja novo obliko celičnega signaliziranja.

Ključne besede: inozitol, polifosfoinozolid, inozitol fosfat, inozitol pirofosfat, inozitol heksakisfosfat kinaza (IP6K)

Abstract: Six-membered ring of inositol represents a basic scaffold of a number of biologically active substances. Most common are phosphorylated derivatives, which are either water insoluble polyphosphoinositol lipids, or water soluble inositol (poly)phosphates. Stereospecificity of the positioning of the functional groups, e.i. phosphates and/or lipids, as well as their number determine their functional diversity. The most studied among inositol phosphates is the inositol-1,4,5-triphosphate, an important second messenger, which triggers Ca^{2+} release from intracellular stores. However, the most abundant in nature is inositol hexakisphosphate (IP_6) or phytic acid, which positive effects on organisms have been known for years. Medically interesting is also IP_6 precursor, inositol-1,3,4,5,6-pentakisphosphate($((1,3,3,5,6)\text{IP}_5)$), showing specific proapoptotic and antiangiogenic properties. $(1,3,4,5,6)\text{IP}_5$ and IP_6 are precursors of higher inositol pyrophosphates containing energy rich di-phosphate and, as shown recently, three-phosphate groups. These molecules can nonenzymatically phosphorylate specific pre-phosphorylated proteins. Such formation of pyro-phosphorylated proteins can thus represent a novel mode of cell signaling.

Keywords: inositol, polyphosphoinositide, inositol phosphate, inositol pyrophosphate, inositol hexakisphosphate kinase (IP6K)

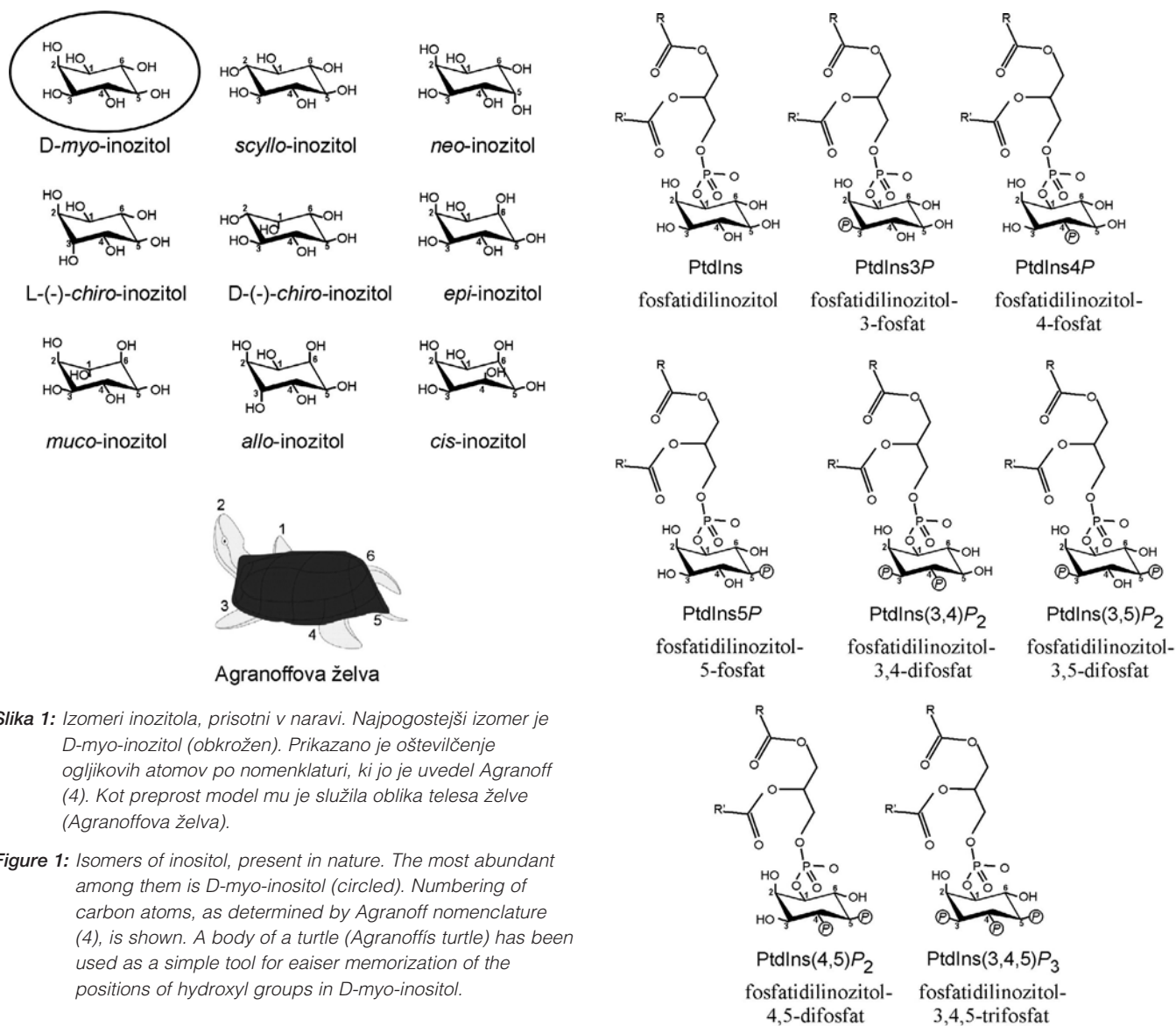
1 Uvod

Molekula inozitola z empirično formulo $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ predstavlja osnovno ogrodje mnogih biološko aktivnih spojin. Pred skoraj 160 leti je inozitol odkril nemški kemik Josef Scherer (1). Izoliral ga je iz mišičnega tkiva in novo molekulo poimenoval *inos*, kar v grščini pomeni 'mišica'. Drug pomen besede inos v grščini je 'vir vitalnosti in moči', kar se navezuje na vlogo inozitola kot vitamina (2).

Danes je v naravi znanih devet izomerov inozitola (Slika 1). Med njimi je najpogosteje zastopan D-*myo*-inozitol, zato se v literaturi za ta izomer uporablja splošen izraz inozitol (3). Za ta izomer je značilno, da

je pet hidroksilnih skupin vezanih v ekvatorialnem položaju na osnovni cikloheksanski obroč, ena (položaj 2) pa je v aksialni legi (Slika 1).

Med najbolj razširjenimi derivati inozitola v naravi so njegove fosforilirane oblike, ki pa so tudi najbolj zastopane organske fosfatne spojine na Zemlji (3). Vsaka izmed šestih hidroksilnih skupin inozitola je lahko zaestrena z vsaj eno ali več fosfatnimi skupinami, lahko pa še dodatno vežejo lipidne molekule in tako postanejo gradniki membranskih lipidnih dvoslojev (5). Do danes so v bioloških sistemih odkrili že preko 47 različnih fosforiliranih derivatov inozitola, 7 od teh je v vodi netopnih, to so t. i. *polifosfoinozitolni lipidi*, ostali predstavljajo v vodi topne oblike, to so t. i. *inozitol fosfat* (2, 6).



Slika 1: Izomeri inozitola, prisotni v naravi. Najpogostejši izomer je D-myo-inozitol (obkrožen). Prikazano je oštevilčenje ogljikovih atomov po nomenklaturi, ki jo je uvedel Agranoff (4). Kot preprost model mu je služila oblika telesa želve (Agranoffova želva).

Figure 1: Isomers of inositol, present in nature. The most abundant among them is D-myo-inositol (circled). Numbering of carbon atoms, as determined by Agranoff nomenclature (4), is shown. A body of a turtle (Agranoff's turtle) has been used as a simple tool for easier memorization of the positions of hydroxyl groups in D-myo-inositol.

2 Polifosfoinozitolni lipidi - polifosfoinozitidi

Polifosfoinozitolni lipidi, imenovani tudi fosfatidilinozitolni lipidi, sodijo poleg fosfatidilholinov, fosfatidiletanolaminov in fosfatidilserinov v družino fosfogliceridov. Le-ti so najbolj razširjena skupina naravnih lipidov in so prisotni v bioloških membranah rastlin in živali. Polifosfoinozitidi predstavljajo približno 10% lipidov v bioloških membranah (7). Udeleženi so pri regulaciji delitve celic, organizacije citoskeleta, vezikularnem transportu in transportu glukoze (8). V evkariontskih membranah poznamo sedem različnih polifosfoinozitidov, poimenovani pa so glede na mesto fosforilacije in število fosfatnih skupin na inozitolnem obroču (Slika 2) (7).

Mnogi polifosfoinozitidi so prekurzorji topnih oblik inozitol fosfatov, ki igrajo pomembno vlogo sekundarnih sporočevalnih molekul pri prenosu signalov v organizmih. Pretvorbo netopnih oblik v topne

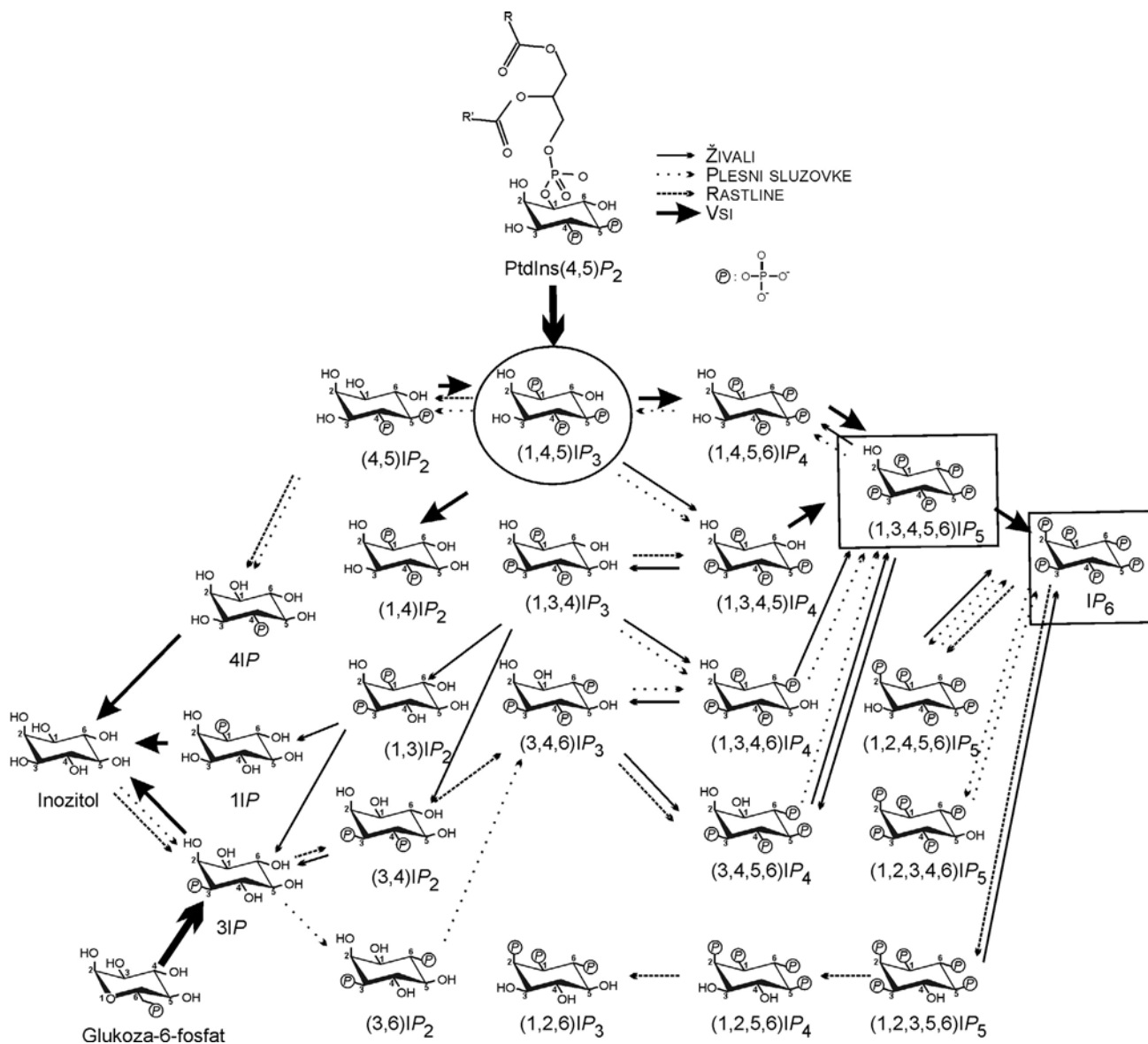
Slika 2: Polifosfoinozitidi, prisotni v eukariotskih membranah. Črka P v krogu predstavlja fosfatno skupino.

Figure 2: Polyphosphoinositides, present in eukaryotic membranes. Encircled letter P represents the phosphate group.

katalizirajo različne fosfolipaze. Npr. fosfatidilinozitol-4,5-difosfat (PtdIns(4,5)P₂) je glavni substrat fosfolipaze C, pri čemer se sprostita 1,2-diacilglicerol in inozitol-1,4,5-trifosfat ((1,4,5)IP₃) (Slika 3) (9).

3 Inozitol fosfati

Med topnimi derivati inozitola je najbolj raziskan inozitol-1,4,5-trifosfat ((1,4,5)IP₃) (Slika 3), sekundarna sporočevalna molekula, ki sprošča Ca²⁺ iz intracelularnih zalog (9). Z odkritjem te pomembne vloge (1,4,5)IP₃ se je povečalo zanimanje za proučevanje struktur, presnove



Slika 3: Presnova inozitol fosfatov v razvojno različnih organizmih. $(1,4,5)IP_3$ nastane s hidrolizo $PtdIns(4,5)P_2$, kjer sodeluje fosfolipaza; pri tem se sprostijo tudi 1,2-diacilglicerol. $(1,4,5)IP_3$ je glavni prekurzor višjih inozitol polifosfatov (povzeto po 10).

Figure 3: Pathways of metabolism of inositol phosphates in evolutionary different organisms. Hydrolysis of $PtdIns(4,5)P_2$ by phospholipase C releases 1,2-diacylglycerol and $(1,4,5)IP_3$. $(1,4,5)IP_3$ is a precursor of higher inositol phosphates (adapted after 10).

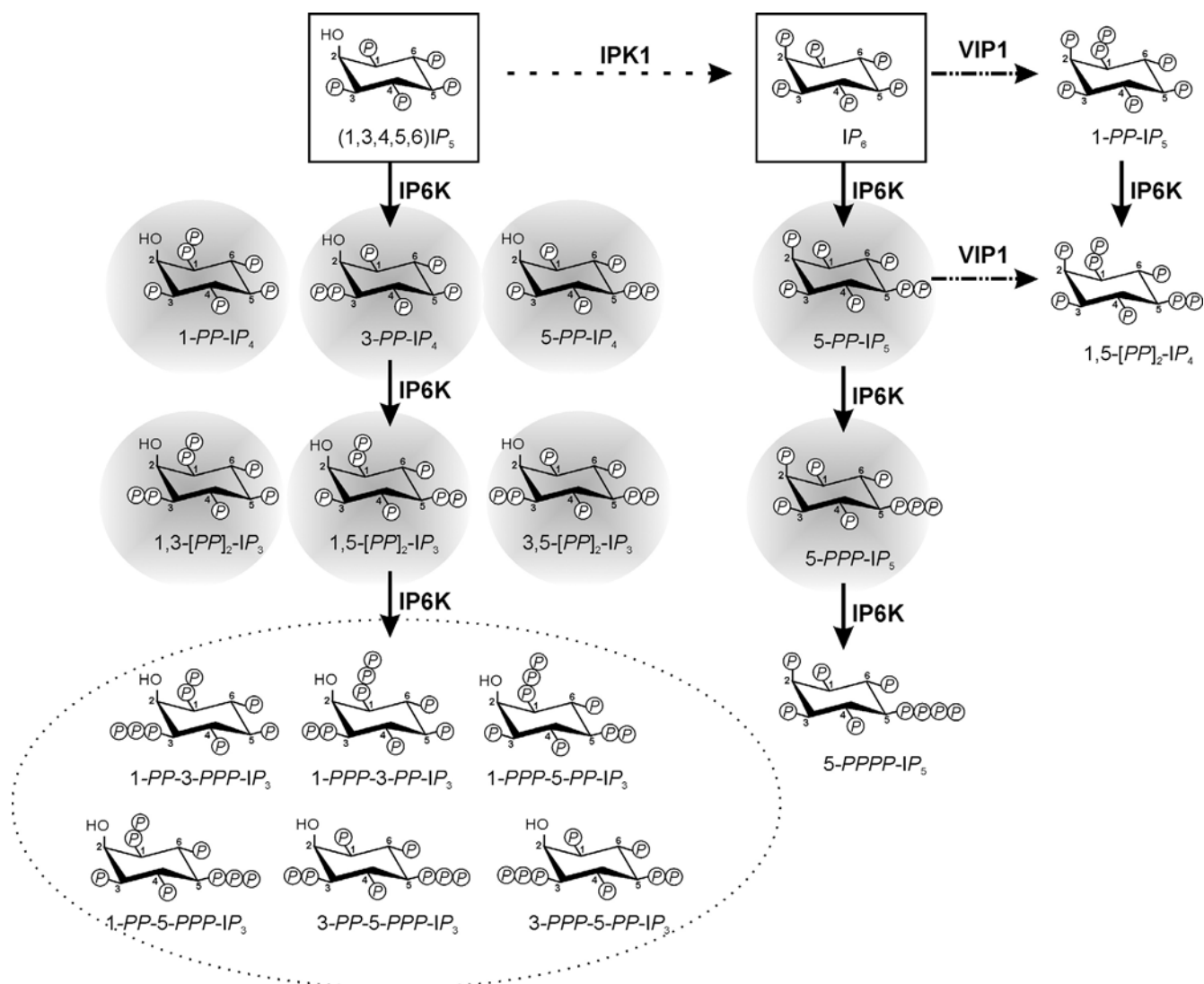
in biološkega pomena topnih derivatov inozitola ter encimov, ki sodelujejo pri tem (10).

Od 60 možnih (teoretičnih) oblik topnih inozitol fosfatov je bilo v naravi do sedaj odkritih že preko 40 različnih inozitol fosfatov (Sliki 3 in 4) (6, 10). Biosintetske poti številnih inozitol fosfatov so izredno kompleksne, nekatere so specifične določenim organizmom, spet druge so univerzalne med vsemi organizmi (Slika 3) (10).

Topni inozitol fosfati so udeleženi pri mnogih bioloških procesih kot npr.: vezikularni transport, apoptoza, regulacija transkripcije,

kemotaksija, delitev celic, vzdrževanje dolžine telomer, regulacija rasti in morfologije celic ter homeostaza fosfata v kvasovkah (2, 10, 11).

V naravi najbolj zastopan inozitol polifosfat je inozitol-1,2,3,4,5,6-heksakisfosfat (IP_6 ali fitinska kislina) (Slika 4). Fitinska kislina predstavlja pri rastlinah največjo zalogo fosfata v semenih, plodovih in koreninah, pomembno vlogo pa igra tudi med kalitvijo in razvojem. IP_6 , ki ga zaužijemo iz žit in sočivja, lahko pomaga pri preprečevanju tvorbe ledvičnih kamnov, zaščiti proti diabetesu, kariesu, arterosklerozi in boleznim srca ter različnim oblikam raka. Zaradi



Slika 4: (1,3,4,5,6)IP₅ in IP₆ sta prekursorja številnih inozitol polifosfatov, ki vsebujejo di-fosfatne in tri-fosfatne skupine. Danes najbolj znana encima, ki sodelujeta pri sintezi takih inozitol polifosfatov, sta IP6K (inozitol heksakisfosfat kinaza) in VIP1 (kvasna inozitol pirofosfat sintaza). Osenčeni so produkti IP6K, ki smo jih strukturno karakterizirali v naši skupini (6). Produkti, označeni znotraj elipse, nastajajo v zelo nizkih količinah, in so bili zato samo delno okarakterizirani; predstavljene vse možne kombinacije njihovih struktur (6).

Figure 4: (1,3,4,5,6)IP₅ and IP₆ as precursors of a number of higher inositol polyphosphates containing di- and tri-phosphate groups. To date, enzymes IP6K (inositol hexakisphosphate kinase) and VIP1 (yeast inositol pyrophosphate synthase) have been found to be involved in the synthesis of these inositol polyphosphates. Structures of inositol polyphosphates, determined by our group, are marked by gray background (6). Products within the ellipse can be obtained in very limited amounts and were therefore only partially characterized; all theoretically possible combinations of structures are shown (6).

njegovih sposobnosti keliranja kovin mu pripisujejo antioksidantne lastnosti, vendar pa kelacija ni vedno samo pozitivna. Fitinska kislina namreč tvori komplekse s številnimi dvovalentnimi in trivalentnimi kovinskimi ioni, njihovo pomanjkane na račun prekomerne kelacije pa lahko pripelje do številnih anomalij (2, 12).

IP₆ lahko sintetizirajo vsi evkariontski organizmi. Eden glavnih prekurzorjev IP₆ je ((1,3,4,5,6)IP₅ (Slika 3). Tudi ta je zelo zanimiva biološko aktivna molekula, s potencialno antikancerogeno in antiangiogenetsko vlogo: (1,3,4,5,6)IP₅ okrepi proapoptotsko delovanje antitumorskih učinkovin cisplatina in etopozida v rakastih celicah (13).

4 Inozitol pirofosfati

Inozitol polifosfati z naraščajočim številom fosfatnih skupin so zaradi visokega naboja ter slabe topnosti v prisotnosti določenih kationov težavne molekule za raziskovanje. Kljub temu pa je v zadnjih 15 letih prišlo do veliko vznemirljivih odkritij na tem področju. Eno ključnih je bilo, da sta (1,3,4,5,6)IP₅ in IP₆ prekursorja inozitol fosfatov, ki lahko vsebujejo sedem, osem ali več fosfatnih skupin, vezanih na inozitolni obroč (Slika 4) (2, 6). Prve analize struktur teh oblik inozitol polifosfatov so pokazale, da te molekule vsebujejo visoko energijske pirofosfatne vezi, zato jih v literaturi imenujemo *inozitol pirofosfati*. To so npr. difosfo-inozitol tetrakisfosfat (PP-IP₄), ki je derivat IP₅ z eno pirofosfatno skupino; difosfo-inozitol pentakisfosfat (PP-IP₅), ki je derivat IP₆ z eno pirofosfatno skupino, poenostavljeno imenovan kar IP₇; in bis-difosfo-inozitol tetrakisfosfat ((PP)₂-IP₄) oz. IP₈, ki je derivat IP₆ z dvema pirofosfatnima skupinama (Slika 4). Raziskave v zadnjem času intenzivno odkrivajo njihovo pomembno vlogo pri prenosu signalov in celični regulaciji (npr. DNK rekombinacija, regulacija dolžine telomer, endocitoza, fosfatni metabolizem, uravnavanje izločanja inzulina, rast celic ter spermiogeneza) (2, 14, 15).

Vse več raziskav potrjuje, da inozitol pirofosfati delujejo kot signalne molekule (15), kjer sta ključni dve posebni lastnosti teh molekul. To sta hitra presnova (v sesalskih celicah se približno 20 % razpoložljivega (1,3,4,5,6)IP₅ in 50 % razpoložljivega IP₆ v 1 uri pretvori v inozitol pirofosfate, kot je npr. PP-IP₄ oz. PP-IP₅), ter visoka energija pirofosfatne vezi (16). Izračunan energijski potencial pirofosfatne vezi v IP₇ je enak ali celo večji od ATP, kar je bilo eno pomembnih izhodišč raziskovalcem, da morda ti inozitol pirofosfati opravljajo podobno funkcijo v celicah kot ATP (17, 18). Možna sta dva mehanizma prenosa signalov s pomočjo inozitol pirofosfatov (15). Namreč, inozitol pirofosfati se lahko vežejo na določene proteine in s tem povzročijo konformacijske spremembe ter aktivacijo teh proteinov (podobno kot v primeru cAMP). Drug, do nedavno nepoznan mehanizem pa je kovalentna post-translacijska modifikacija, ki vodi v nastanek pirofosforiliranih proteinov. Substrati inozitol pirofosfatov so npr. proteini jedrca, ki so udeleženi v sestavljanju ribosomskih podenot in njihovem prenosu v citoplazmo (19). Ti proteini vsebujejo regije, bogate s serini ter obdane s kislimi aminokislinskimi preostanki. V prvi stopnji te modifikacije pride do fosforilacije točno določenih serinov, kar katalizirajo ustrezne kinaze v prisotnosti ATP. V drugi stopnji pa inozitol pirofosfati skupaj z Mg²⁺ vendar brez pomoči encimov dodajo še eno fosfatno skupino na fosforiliran serin in tako nastanejo pirofosforilirani proteini (20). Tako modificirani proteini imajo posebne lastnosti: manj so odporni proti nizkim pH vrednostim ter bolj odporne na proteinske fosfataze v primerjavi z ATP-fosforiliranimi proteini, in tako predstavljajo novo obliko celičnega signaliziranja (20).

Prvi encim, za katerega so pokazali, da lahko iz (1,3,4,5,6)IP₅ in IP₆ ob prisotnosti ATP/Mg²⁺ katalizira sintezo inozitol pirofosfatov, je inozitol heksakisfosfat kinaza (IP6K) (Slika 4), ki v sesalskih celicah obstaja v treh izooblikah: IP6K1, IP6K2 in IP6K3 (21). Poleg kinazne aktivnosti tega encima, je znana tudi od kinazne aktivnosti neodvisna interakcija IP6K z drugimi proteini. Tako se npr. izooblika IP6K1 (ne pa tudi IP6K2 in IP6K3) veže s proteinom GRAB, ki uravnava sproščanje neurotransmiterjev (22). Za izoobliko IP6K2 pa je bilo pokazano, da regulira celično smrt (23) tudi preko interakcij s proteini kot sta TRAF2 (24) in šaperon HSP90 (25). Za IP6K1 in inozitol pirofosfate je bilo

pokazano, da sodelujejo pri nastajanju in izločanju inzulina, uničenje gena za IP6K1 pa lahko vodi v diabetes tipa 2 in pa motnjo v spermiogenezi (15). Pred kratkim so tudi odkrili inhibitor, N2-(m-trifluorometil)benzil-N6-(p-nitrobenzil)purin (TNP) (26), ki selektivno inhibira encime IP6K, kar lahko predstavlja novo učinkovito orodje pri preučevanju bioloških procesov, kjer sodelujejo ti encimi ter njihovi metabolni produkti.

Poleg IP6K pa tudi drugi encimi sodelujejo pri sintezi inozitol pirofosfatov v celici (Slika 4). Tako inozitol polifosfat multikinaza (IPMK) katalizira sintezo inozitol pirofosfatov iz (1,3,4,5,6)IP₅ (27). Sposobnost tvorbe inozitol pirofosfatov pa imajo tudi člani družine encimov VIP/PP-IP₅-kinaz. Sem sodijo v kvasovki *Sacharomyces cerevisiae* odkrit protein VIP1 in njegova sesalska analoga VIP1/PP-IP₅-kinaza 1 in VIP2/PP-IP₅-kinaza 2, ki fosforilirajo IP₆ in IP₇ (1(3)-PP-IP₅) (28, 29). Analize z nuklearno magnetno resonanco (NMR) so pokazale, da je struktura IP₇, katerega sintezo katalizirajo VIP1-podobne kinaze, 1(3)-PP-IP₅ (27); struktura IP₇, ki je produkt katalize IP6K, pa je 5-PP-IP₅ (Slika 4) (6, 28).

V naši skupini na Kemijskem inštitutu smo se osredotočili na proučevanje inozitol pirofosfatov, katerih sintezo v sesalskih celicah iz naravnih substratov (1,3,4,5,6)IP₅ in IP₆ katalizirajo vse tri izooblike IP6K. S pomočjo analiz z NMR in masno spektroskopijo smo prvi pokazali, da so produkt katalize z vsemi tremi izooblikami IP6K številni inozitol polifosfati z različnimi kombinacijami in števili difosfatnih in tudi presenetljivo, trifosfatnih skupin (6). Čeprav pri tej reakciji nastane cela množica produktov, pa je vezava fosfatnih skupin omejena na določena mesta na inozitolnem obroču (pri (1,3,4,5,6)IP₅ na mestih 1 in/ali 3 ter 5, pri IP₆ pa le na položaju 5) (6) (Slika 4). Stereospecifičnost dodajanja novih fosfatnih skupin je očitno določena s strukturo aktivnega mesta encima. Možno je, da vse različne oblike visoko fosforiliranih oblik inozitol polifosfatov sodelujejo pri fosforilaciji proteinov (20). Pomen tako velike strukturne raznolikosti teh novo odkritih molekul, specifičnost ter mehanizem njihovega delovanja pa je pomembno izhodišče nadaljnjih raziskav.

5 Sklep

Številni inozitol fosfati v naravi igrajo pomembno vlogo pri celični regulaciji in prenosu signalov. Vse več zanimanja pa v zadnjem času vzbujajo višji inozitol polifosfati, derivati (1,3,4,5,6)IP₅ in IP₆, ki vsebujejo energijsko bogate di-fosfatne in tri-fosfatne skupine. Še posebej zanimiva je sposobnost teh molekul, da lahko pirofosforilirajo proteine in to brez sodelovanja encimov in tako na poseben način sodelujejo pri prenosu signalov v organizmih. Ker je mehanizem delovanja višjih inozitol polifosfatov netipičen, je na tem področju potrebnih še veliko raziskav za boljše razumevanje njihovega mehanizma delovanja. Z raziskavami v našem laboratoriju smo razložili strukture velikega števila teh inozitol polifosfatov in pokazali, da se tudi dejansko nahajajo v celicah (6). Ker so koncentracije teh spojin v organizmih zelo nizke, bodo ravno te znane strukture inozitol pirofosfatov v pomoč organskim kemikom kot osnova za pripravo sintetičnih inozitol pirofosfatov in njihovih analogov, ki jih bodo potem biokemiki in celični biologi lahko uporabili pri raziskovanju njihovih vlog tako *in vitro* kot *in vivo*. Še več, ker so inozitol pirofosfati in s tem tudi encimi, ki jih sintetizirajo, pomembni dejavniki v mnogih fizioloških in tudi patoloških procesih, lahko služijo tudi kot osnova oziroma tarča

za razvoj zdravil. Zaradi odkritja derivatov, ki vsebujejo tudi trifosfatne skupine, pa bo potrebno v prihodnosti temu prilagoditi tudi nomenklaturu, saj trenutno veljaven izraz »inozitol pirofosfat« upošteva samo spojine z di- oz. pirofosfatno vezjo. Ravno tako pa kratica IP_3 ni samo oznaka za $[PP]_2-IP_4$, ampak tudi za $PPP-IP_5$.

6 Literatura

1. Scherer J. Über eine neue, aus dem Muskelfleische gewonnene Zuckerart. Liebigs Ann Chem 1850; 73: 322-328.
2. Bennett M, Onnebo SMN, Azevedo C et al. Inositol pyrophosphates: metabolism and signaling. Cellular Mol Life Sci 2006; 63: 552-564.
3. Michell RH. Evolution of the diverse biological roles of inositols. Biochem Soc Symp 2007; 74: 223-246.
4. Agranoff BW. Textbook errors: cyclitol confusion. Trends Biochem Sci 1978; 3: 283-285.
5. Alc-zar-Rom-n AR & Wente SR. Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression. Chromosoma 2008; 117: 1-13.
6. Draškovič P, Saiardi A, Bhandari R et al. Inositol hexakisphosphate kinase products contain diphosphate and triphosphate groups. Chem Biol 2008M; 15: 274-286.
7. Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. Annu Rev Biochem 1998; 67: 481-507.
8. De Matteis MA, Di Campli A, Godi A. The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. Biochim Biophys Acta 2005; 1744: 396-405.
9. Streb H, Irvine RF, Berridge MJ et al. Release of Ca²⁺ from A Nonmitochondrial Intracellular Store in Pancreatic Acinar-Cells by Inositol-1,4,5-Trisphosphate. Nature 1983; 306: 67-69.
10. Irvine RF & Schell MJ. Back in the water: The return of the inositol phosphates. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2: 327-338.
11. Shears SB. Understanding the biological significance of diphosphoinositol polyphosphates ('inositol phosphates'). Biochem Soc Symp 2007; 74: 211-221.
12. Greiner R, Konietzny U, Jany K-D. Phytate – an undesirable constituent of plant-based foods? Journal f_r Ern%hungsmedizin 2006; 8: 18-28.
13. Maffucci T, Piccolo E, Cumashi A et al. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by inositol pentakisphosphate results in antiangiogenic and antitumor effects. Cancer Res 2005; 65: 8339-8349.
14. Bhandari R, Juluri KR, Resnick AC et al. Gene deletion of inositol hexakisphosphate kinase 1 reveals inositol pyrophosphate regulation of insulin secretion, growth, and spermiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 2349-2353.
15. Burton A, Hu X, Saiardi A. Are inositol pyrophosphates signalling molecules? J Cell Physiol 2009, 220: 8-15.
16. Menniti FS, Miller RN, Putney JW et al. Turnover of Inositol Polyphosphate Pyrophosphates in Pancreatoma Cells. J Biol Chem 1993; 268: 3850-3856.
17. Stephens L, Radenberg T, Thiel U et al. The Detection, Purification, Structural Characterization, and Metabolism of Diphosphoinositol Pentakisphosphate(S) and Bisdiphosphoinositol Tetrakisphosphate(S). J Biol Chem 1993; 268: 4009-4015.
18. Hand CE & Honek JF. Phosphate transfer from inositol pyrophosphates InsP(5)PP and InsP(4)(PP)(2): A semi-empirical investigation. Bioorg Med Chem Lett 2007; 17: 183-188.
19. Saiardi A, Bhandari R, Resnick AC et al. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. Science 2004; 306: 2101-2105.
20. Bhandari R, Saiardi A, Ahmadibeni Y et al. Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104: 15305-15310.
21. Saiardi A, Caffrey JJ, Snyder SH et al.. The inositol hexakisphosphate kinase family - Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. J Biol Chem 2000; 275: 24686-24692.
22. Luo HR, Saiardi A, Nagata E et al. GRAB: A physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. Neuron 2001; 31: 439-451.
23. Morrison BH, Bauer JA, Kalvakolanu DV et al. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. J Biol Chem 2001; 276: 24965- 24970.
24. Morrison BH, Bauer JA, Lupica JA et al. Effect of inositol hexakisphosphate kinase 2 on transforming growth factor beta-activated kinase 1 and NF-kappa B activation. J Biol Chem 2007; 282: 15349-15356.
25. Chakraborty A, Koldobskiy MA, Sixt KM et al. HSP90 regulates cell survival via inositol hexakisphosphate kinase-2. Proc Natl Acad Sci U S A 2008; 105: 389-90.
26. Padmanabhan U, Dollins DE, Fridy PC, York JD, Downes CP Characterization of a selective inhibitor of inositol hexakisphosphate kinases: use in defining biological roles and metabolic relationships of inositol pyrophosphates. J Biol Chem 2009, 284:10571-10582.
27. Saiardi A, Nagata E, Luo HBR et al. Mammalian inositol polyphosphate multikinase synthesizes inositol 1,4,5-trisphosphate and an inositol pyrophosphate. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 2306-2311.
28. Mulugu S, Bai WL, Fridy PC, et al. A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. Science 2007: 316: 106-109.
29. Lin H, Fridy PC, Ribeiro AA et al. Structural analysis and detection of biological inositol pyrophosphates reveals that the VIP/PPIP5K family are 1/3-kinases. J Biol Chem 2008; 284: 1863-1872.