

Węgr. III - dzień 10.11.1974

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

1974
tom 20
nr 2

KWARTALNIK

<http://rcin.org.pl>

PSTBAH 20(2)
97-212 (1974)

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiedzialni są za prawdziwość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły są honorowane według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Autorzy proszeni są o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm. po lewej i ok. 1 cm. po prawej stronie.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, tytuł pracy oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, tytuły naukowe autora(ów), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały i podrozdziały. Wydzielone z tekstu tytuły rozdziałów należy oznaczyć numeracją rzymską, a ewentualne podrozdziały opatrzyć dodatkową numeracją arabską (np. I-2, II-4 itp.). Tytuły podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie powinny być numerowane. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

Autorzy proszeni są o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o nie wprowadzanie do tekstu tworzonych do różnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

POSTĘPY BIOCHEMII

WYDAWANE Z POMOCĄ FINANSOWĄ POLSKIEJ AKADEMII NAUK

1 9 7 4
tom XX
zeszyt 2

KWARTALNIK
PSTBAH 20(2) 97-212 (1974)

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice), J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), T. Szczepkowski (Kraków)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman

KOMITET REDAKCYJNY

B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),
B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), S. Lewak (Warszawa),
P. Masłowski (Toruń), I. Szumieli (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1974

Nakład 2230 (2105+950)	Oddano do składania 24.I.1974 r.
Ark. wyd. 8,75, druk. 7,25	Podpisano do druku w kwietniu 1974 r.
Papier ilustr. kl. V, 70×100	Druk ukończono w maju 1974 r.
Cena zł 20.—	Zam. nr 163/74 W-122

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

EDWARD ANDRZEJ CZURYŁO *

Przestrzenna struktura tRNA

Three-Dimensional Structure of tRNA

Kwasy rybonukleinowe przenoszące aminokwasy — tRNA — odkryto w roku 1957 [1, 2] i od tego czasu stały się one obiektami intensywnych badań ze względu na funkcję biologiczną jaką spełniają w procesie biosyntezy białka. Po ustaleniu przestrzennej struktury DNA przez Watsona i Cricka (1953) wydawało się, że w podobny sposób uda się ustalić przestrzenną strukturę tRNA. Przewidywania te okazały się jednak niesłuszne. Efektem kilkunastoletnich intensywnych badań, w wyniku których zebrano sporą ilość informacji o budowie makrocząsteczek tRNA, było opracowanie kilkunastu modeli przestrzennej struktury tRNA, lecz przydatność tych modeli jest ciągle dyskutowana.

W artykule tym przedstawiono poszczególne modele przestrzennej struktury tRNA i dokonano próby ich oceny.

I. Ogólna charakterystyka tRNA

Makrocząsteczka tRNA składa się z 75—85 nukleotydów (pokazano, że liczba nukleotydów może być większa [3]), a jej ciężar cząsteczkowy wynosi 25 000—30 000 (stała sedymentacji około 4S). Oprócz adeniny, guaniny, cytozyny i uracylu w tRNA występują również inne zasady azotowe zwane ogólnie zasadami rzadkimi. Rola i biosynteza zasad rzad-

* Mgr, Katedra Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Uniwersytet Warszawski.

Wykaz stosowanych skrótów: DNA — kwas dezoksyrybonukleinowy, tRNA — kwas rybonukleinowy przenoszący aminokwasy (transferowy kwas rybonukleinowy), tRNA^{Ser} — kwas rybonukleinowy przenoszący serynę, A — adenina, C — cytozyna, G — guanina, U — uracyl, T — rybotymina, ψ — pseudourydyna, 1meG — 1-metyloguanina, 2me₂G — N²-dwumetyloguanina, H₂U(DHU) — dwuhydrourydyna, I — inozyna, 1meI — 1-metyloinozyna, 5meC — 5-metylocytozyna, 7meG — 7-metyloguanina, thioU — tiourydyna.

kich były tematem jednej z prac opublikowanych w *Postęпах Biochemii* [4]; w niniejszej pracy zagadnienia te zostaną pominięte.

Zawartość tRNA w komórce stanowi około 10% ogólnej ilości kwasów rybonukleinowych, a zawartość tRNA przenoszącego poszczególne aminokwasy waha się od kilku promille do kilku procent ogólnej ilości tRNA. Każda cząsteczka zdolna jest do przenoszenia tylko jednego aminokwasu, natomiast niektóre aminokwasy mogą być przenoszone przez różne cząsteczki tRNA zawierające nawet ten sam antykodon [5]. Okazało się również, że jedna cząsteczka tRNA przenosząca określony aminokwas może odpowiadać dwóm (a być może i więcej) różnym kodonom tego aminokwasu [6]. Zatem w komórkach różnych organizmów liczba tRNA przenoszących aminokwasy może być zróżnicowana. W przypadku *E. coli* udało się zidentyfikować 56 różnych tRNA [7].

Otrzymaną w wyniku wydzielania tRNA mieszaninę należy rozdzielić przede wszystkim pod względem powinowactwa aminokwasowego oraz pod względem składu polinukleotydowego. Dotychczas opracowano wiele metod wydzielania, oczyszczania i rozdzielania tRNA [8, 9], ustalania sekwencji [8, 9, 10, 11]. Równocześnie prowadzono inne badania, a mianowicie badano: rolę tRNA w procesie biosyntezy białka [12], oddziaływanie tRNA z enzymami [8, 13, 14, 15], oddziaływanie kodonu z antykodonom [16, 17], chemiczne modyfikacje tRNA [8, 18].

II. Uporządkowanie struktury tRNA

Badania tRNA przeprowadzone do roku 1959 [19] metodami hydrodynamicznymi i optycznymi wskazywały wprawdzie na istnienie uporządkowanej struktury przestrzennej w cząsteczkach tRNA, jednak nie można było stwierdzić jaki kształt posiada ta cząsteczka [20, 21]. Metod tych bowiem nie można stosować do dokładnej analizy kształtu cząsteczek o małym ciężarze cząsteczkowym. W przypadku tRNA zastosowano zatem metody spektroskopowe [22, 23] pozwalające ocenić asymetrię cząsteczki na podstawie pomiarów czasu relaksacji.

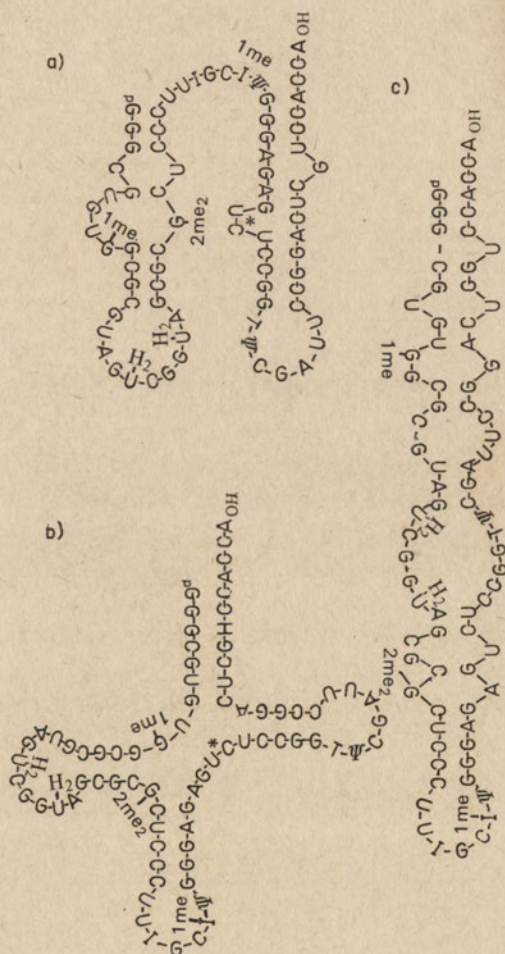
Ogrzewanie roztworów tRNA lub stosowanie innych czynników denaturujących powoduje zmianę kształtu i stopnia sztywności makrocząsteczek [20, 23], wzrost ich elektronowego promienia bezwładności oraz wzrost absorpcji tych roztworów [24]. Wyniki te świadczą o tym, że pod wpływem czynników denaturujących następuje przejście konformacyjne, a więc o istnieniu pewnej uporządkowanej struktury w tych makrocząsteczkach.

Uporządkowanie struktury tRNA jest konieczne do wystąpienia oddziaływań kodonu z antykodonom [25], a więc do tego, aby spełniał on swą funkcję biologiczną.

Przestrzenna struktura tRNA powinna charakteryzować się ścisłym upakowaniem łańcucha polinukleotydowego [26, 27].

II-1. Pierwsze modele przestrzennej struktury tRNA

Próby modelowania przestrzennej struktury tRNA podjęto już w roku 1960 [28], a więc przed ustaleniem sekwencji nukleotydowej w cząsteczce tRNA. Przyjęto pewien statystyczny rozkład czterech podstawowych nukleotydów rybozydowych i szukano struktury stabilizowanej oddziaływaniami wewnątrzcząsteczkowymi. Założono, że struktura tRNA zawiera odcinki spiralne podobne do spirali DNA, lecz utworzone z łańcucha jednej cząsteczki. Między odcinkami spiralnymi mogą występować od-

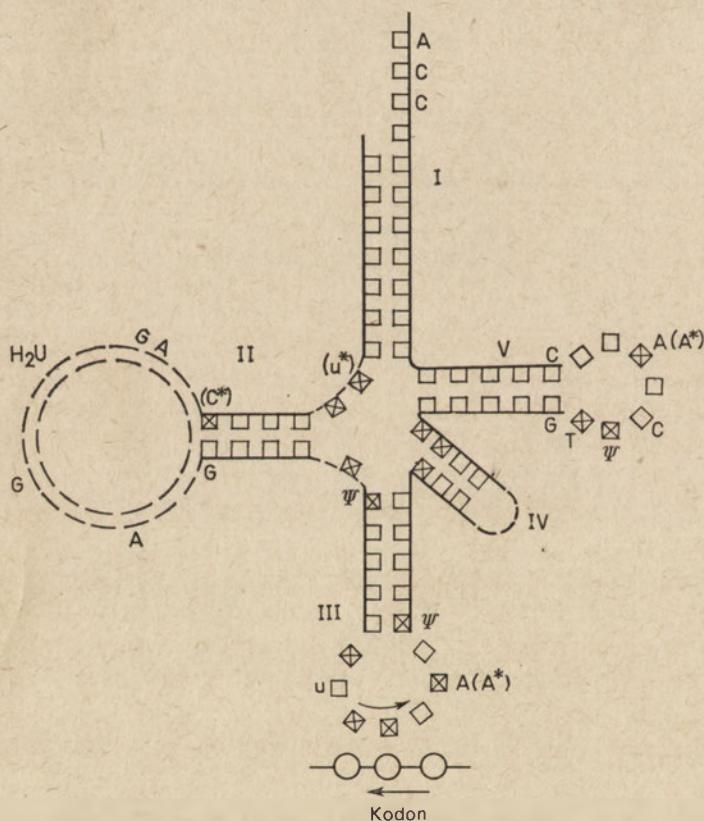


Ryc. 1. Płaskie modele tRNA przenoszącego alaninę według Holley'a i innych [32]

A — adenina, C — cytozyna, G — guanina, U — urydyna, 1meG — 1-metyloguanina, 2me₂G — N²-dwumetyloguanina, H₂U — dwuhydrourydyna, T — rybotymidyna, ψ — pseudourydyna, I — inozyna, 1meI — 1-metyloinozyna.

cinki niespiralne tworzące pętle (wybrzuszenia). Zakładając, że liczba wiązań wodorowych powstałych między komplementarnymi zasadami w cząsteczce powinna być możliwie największa, znaleziono dwa modele cząsteczki tRNA — model rozgwiezdy i model pałeczki — przy czym model rozgwiezdy uznano za bardziej prawdopodobny. Modele przestrzennej struktury tRNA były tematem wielu innych prac, w których przedstawiono model złożony z dwu odcinków spiralnych połączonych odcinkiem niespiralnym [29, 30, 31].

Momentem przełomowym w badaniach tRNA było ustalenie przez Holley'a i jego współpracowników [32] sekwencji nukleotydowej dla tRNA przenoszącego alaninę, wydzielonego z drożdży piekarskich. W pracy [32] zaproponowano trzy różne konformacje (Ryc. 1) badanej cząsteczki nie rozpatrując prawdopodobieństwa ich występowania w rzeczywistości. Największą popularność zyskał płaski model przedstawiony na rycinie 1b



Ryc. 2. Uogólniony model liścia koniczyny

- I — ramię aminokwasowe,
 - II — ramię dwuhydrouracylowe (pętla utworzona z 8–12 nukleotydów),
 - III — ramię antykodonowe,
 - IV — ramię dodatkowe (długość tego ramienia waha się od 4 do 14 nukleotydów),
 - V — ramię TΨC,
 - ☐ — pozycje w których występują najczęściej nukleotydy modyfikowane;
- Gwiazdka oznacza możliwość występowania nukleotydu modyfikowanego.

zwany potocznie modelem liścia koniczyny (ang. *clover leaf*) lub modelem Holley'a.

Model ten umożliwia wygodny zapis sekwencji łańcucha polinukleotydowego oraz ustalenie jego odcinków spiralnych i niespiralnych. Za pomocą modelu liścia koniczyny można też wytłumaczyć szczególną podatność niektórych nukleotydów na modyfikację zarówno chemiczną jak i enzymatyczną.

Wszystkie tRNA, dla których znana jest sekwencja nukleotydowa, można przedstawić za pomocą modelu liścia koniczyny, w którym wprowadzono tzw. ramię dodatkowe. Długość ramienia dodatkowego jest różna w różnych tRNA i zależy od liczby nukleotydów wchodzących w skład tej cząsteczki. Dzięki takiemu modelowi (Ryc. 2) można zachować jednakową odległość końca aminokwasowego cząsteczki od kodonu, wyróżnić tzw. uniwersalne odcinki, w których sekwencje nukleotydów są identyczne we wszystkich tRNA oraz określić miejsca, w których najczęściej występują modyfikowane nukleotydy.

Konformacji natywnego tRNA nie można opisać za pomocą modelu płaskiego, gdyż cząsteczka ta ma kształt elipsoidy obrotowej o stosunku osi równym 1 : 3 [33].

Model liścia koniczyny stał się podstawą prawie wszystkich kolejnych modeli tRNA, które zostaną omówione w następnym rozdziale.

II-2. Podobieństwa i różnice w budowie tRNA przenoszących różne aminokwasy

Posługując się modelem przedstawionym na rycinie 2 i znanymi sekwencjami tRNA można ustalić wiele wspólnych cech, którymi charakteryzują się prawdopodobnie wszystkie cząsteczki tRNA. Na końcu 3' (aminokwasowym) występują zawsze trzy nukleotydy CCA, a na końcu 5' z reguły — nukleotyd guanylowy. W ramieniu aminokwasowym występuje siedem komplementarnych par zasad tworzących spiralę, a w ramieniu dwuhydrouracylowym występują 3 lub 4 pary, natomiast w pętli dwuhydrouracylowej liczba nukleotydów waha się od 8 do 12. W ramieniu antykodonowym odcinek spiralny utworzony jest przez pięć par zasad, a pętla antykodonowa przez 7 nukleotydów. Przed pierwszym nukleotydem antykodonu występuje zawsze nukleotyd urydylowy, a za kodonem z reguły — nukleotyd adenylowy lub jego pochodna. Ramię dodatkowe ma różną długość i może składać się z 4—14 nukleotydów. Ramię TΨC (nazwane tak od stałej trójki nukleotydów występujących w nim) składa się z odcinka spirali utworzonej z 5 par zasad i pętli utworzonej z 7 nukleotydów.

W tabeli I podano odległości (wyrażone liczbą nukleotydów) między niektórymi charakterystycznymi punktami łańcucha tRNA. Z danych tych wynika, że odległość pierwszego nukleotydu antykodonu od końca 5' jest w przybliżeniu stała i równa 35 ± 1 nukleotydów. Odległość nu-

Tabela 1

Niektóre charakterystyczne parametry łańcucha tRNA [9]

Parametr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				<i>Torulopsis utilis</i>				<i>Escherichia coli</i>				Wątroba szczura		Kielki pszenicy
	Ala	Ser	Tyr	Val	Phe	Val	Ile	Tyr	Tyr	Fmet	Met	Val	Phe	Ser	Phe
Długość* łańcucha tRNA	77	85	78	77	76	75	77	78	85	77	77	76	76	85	76
Odległość**: od końca 5' do pierwszego nukleotydu antykodonu	36	35	36	35	34	35	35	36	35	34	35	34	34	34	34
od końca 3' do T	23	23	23	24	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
od 5meC do T	—	7	7	7	6	7	7	7	—	—	—	—	—	7	—
od końca 5' do 1meG	9	—	10	9	10	9	—	9	—	—	—	—	—	—	10
od końca 5' do DHU**	18	16	16	16	16	16	16	16	—	—	16	17	16	16	16
od pierwszego nukleotydu antykodonu do DHU**	19	19	21	20	19	20	20	21	—	—	20	18	18	19	19
od pierwszego nukleotydu antykodonu do 2me ₂ G	9	9	9	—	9	—	9	9	—	—	—	—	—	9	9
od końca 3' do 7meG	—	—	—	—	31	—	—	—	—	31	31	31	31	—	31
od końca 5' do thioU	—	—	—	—	—	—	—	—	8	8	8	8	8	—	—

* długość i odległości podano w liczbach nukleotydów

** rozpatruje się pierwszy DHU licząc od końca 5'.

kleotydu tymidylowego od końca 3' jest w przybliżeniu również stała i równa 23 nukleotydów.

W pętlach wszystkich cząsteczek tRNA można wyróżnić odcinki, w których nukleotydy występują w określonej kolejności (AGH₂U w pętli dwuhydrouuracylu i GTΨC* w pętli TΨC).

Jeśli łańcuch tRNA przedstawić w postaci linii prostej i nukleotydy końcowe umieścić w jednakowej odległości od siebie, to traktując w krótkich łańcuchach pewne miejsca jako delecje, można w przypadku 15 cząsteczek tRNA otrzymać pokrywanie się tych samych nukleotydów w 13 pozycjach [9]. Jeszcze większą liczbę identycznie obsadzonych pozycji można uzyskać, jeśli traktować pochodne niektórych nukleotydów jako nukleotydy podstawowe. Te podobieństwa w sekwencji łańcucha tRNA posłużyły do sformułowania hipotezy dotyczącej zmian ewolucyjnych tRNA. Można przypuszczać [34], że wszystkie tRNA w komórce pochodzą od wspólnego tRNA prototypowego, a występujące różnice są wynikiem mutacji, którym ulegał tRNA prototypowy. Cząsteczka tRNA prototypowego posiadała większą liczbę nukleotydów w łańcuchu niż tRNA obecnie spotykane, które powstały w wyniku delecji części nukleotydów z tRNA prototypowego. Istnieje też inna możliwość, a mianowicie tRNA prototypowy mógł być krótkim łańcuchem (76—78 nukleotydów), a następnie odpowiedni gen powiększył się w wyniku włączenia do DNA dodatkowych nukleotydów [35].

Oprócz wielu podobieństw, jakie udało się ustalić dla różnych cząsteczek tRNA, istnieje też wiele różnic. Największe różnice związane są z występowaniem nukleotydów rzadkich, które mogą stanowić od około sześciu do dwudziestu kilku procent ogólnej liczby nukleotydów. Można przypuszczać, że nukleotydy modyfikowane mają decydujący wpływ na swoje właściwości poszczególnych tRNA [36].

Nukleotydy modyfikowane występują najczęściej w odcinkach niespiralnych, a więc w odcinkach najbardziej podatnych na działanie czynników zewnętrznych, zwłaszcza enzymów modyfikujących. W ramieniu aminokwasowym nukleotydy modyfikowane nie występują, co może być wynikiem spiralizacji odcinków łańcucha polinukleotydowego wchodzącego w skład tego ramienia lub też wynikiem osłaniania tego ramienia przez inne części łańcucha tRNA.

Makrocząsteczki tRNA przenoszące te same aminokwasy i występujące w różnych organizmach różnią się między sobą tym bardziej, im większa jest odległość taksonomiczna między tymi organizmami. Łańcuchy cząsteczek tRNA^{Ser} z drożdży piekarskich [37] i tRNA^{Ser} z drożdży browarskich [5, 38] mają identyczną sekwencję natomiast sekwencja łańcucha tRNA^{Ser} z wątroby szczura [39] różni się od poprzednich w 21 pozycjach.

Problemowi podobieństw i różnic tRNA poświęcono wiele prac [9, 35, 40, 41]. W miarę poznawania sekwencji kolejnych tRNA można będzie

* p. str. 120.

przekonać się czy ustalone dotychczas prawidłowości potwierdzą się, czy też trzeba będzie je zmodyfikować. Niewątpliwie pozostanie słuszną zasadą odnosząca się do materii żywej, a mianowicie „zasada jedności w różnorodności”.

III. Modelowanie przestrzennej struktury tRNA

Dla pomyślnego rozwoju badań tRNA konieczne jest ustalenie przestrzennej budowy tych cząsteczek. Pracę nad modelowaniem struktury tRNA podjęto w wielu ośrodkach badawczych, a wynikiem tych prac było opracowanie w latach 1966—1969 kilkunastu modeli [42—53]. Modele te wykazują szereg braków i były wielokrotnie krytykowane [50, 54—57]. Prace w tym kierunku prowadzone są nadal, opracowano kilka nowych modeli. Przed przystąpieniem do ich analizy należy ustalić listę wymagań, jakie powinien spełniać model.

III-1. Wymagania stawiane modelowi przestrzennej struktury tRNA

A. Struktura cząsteczki tRNA powinna być korzystna energetycznie, a w przypadku zbliżenia się dwu ujemnie naładowanych grup fosforanowych na odległość mniejszą od odległości standardowej, powinny być one ekranowane przez kationy dwuwartościowe [58, 59].

B. W cząsteczce tRNA występuje około 80 wiązań wodorowych, w których bierze udział około 25 par zasad [43, 60]. Płaszczyzny większości zasad występujących w łańcuchu polinukleotydowym powinny być w przybliżeniu prostopadłe do głównej osi cząsteczki [61, 62].

C. Wartości długości wiązań i kątów dwuściennych w modelu powinny mieścić się w granicach wartości standardowych znalezionych dla łańcuchów poliribonukleinowych [63, 64], a spirala powinna być tzw. spiralą typu A lub, co wydaje się bardziej prawdopodobne, spiralą typu A'.

D. Struktura przestrzenna cząsteczki powinna charakteryzować się ścisłym upakowaniem łańcucha polinukleotydowego [27, 44, 47], posiadać asymetrię równą około 1 : 3, czyli powinna to być cienka i długa cząsteczka [22, 33, 65, 66].

E. Rozmiary cząsteczki niesolwatowanej powinny wynosić $24 \times 32 \times 80 \text{ \AA}$ [67], a elektronowy promień bezwładności (promień Stokesa) około $24 \text{ \AA}$ [44, 47, 52, 68]. Rozmiary cząsteczki mogą zmienić się w wyniku solwatacji (powiększyć się do $40 \times 90 \text{ \AA}$ [67]) oraz na skutek zmian siły jonowej roztworu [69].

F. Struktura przestrzenna tRNA przenoszących różne aminokwasy powinna być jednolita tzn. taka, aby możliwa była ich krystalizacja [70], a kryształy tRNA przenoszącego te same aminokwasy powinny charakteryzować się odpowiednimi parametrami sieci krystalicznej [54, 62, 71, 72].

G. Ułożenie poszczególnych odcinków łańcucha polinukleotydowego powinno być takie, aby umożliwiała fotodimeryzację [73, 74] uracylu znajdującego się na pozycji ósmej z cytozyną znajdującą się na pozycji trzynastej (licząc od końca 5') przynajmniej dla pewnych tRNA [74, 75] oraz takie, aby można było wytłumaczyć właściwości fluorescencyjne makrocząsteczki tRNA [22, 33, 56, 76—78].

H. Przestrzenna struktura tRNA powinna zapewniać odpowiednią odporność tej cząsteczki na działanie nukleaz [26, 27, 79—82].

I. Model przestrzennej struktury tRNA powinien uwzględniać możliwości oddziaływania tej cząsteczki z syntezami [83—86].

J. W modelu powinny być uwzględniane lokalne konformacje łańcucha polinukleotydowego umożliwiające przeprowadzenie określonych modyfikacji chemicznych w cząsteczkach tRNA [87—92].

K. Model struktury przestrzennej tRNA powinien umożliwiać spełnianie funkcji biologicznych związanych z biosyntezą białka, a więc powinien uwzględniać oddziaływanie tej cząsteczki z dwoma centrami aktywnymi rybosomu [93—96] oraz odpowiednie jej oddziaływanie z kodonem. Mechanizm oddziaływania kodonu z antykodonem nie jest jeszcze dokładnie znany [97—101].

L. Rozmiary cząsteczki tRNA powinny pozwalać na równoczesne oddziaływanie co najmniej dwu cząsteczek tRNA z dwoma kolejnymi kodonami [102], a struktura wszystkich cząsteczek tRNA powinna zapewniać takie zbliżenie tRNA aminoacylowanego do tRNA peptydylowego, aby mogło powstać wiązanie kowalencyjne pomiędzy grupą aminową aminokwasu i grupą karboksylową powstającego łańcucha peptydowego [102, 103].

III-2. Jednolita struktura przestrzenna tRNA przenoszących różne aminokwasy

Przy opracowaniu modeli przestrzennej struktury tRNA korzystano bądź to z właściwości ustalonych dla naturalnych mieszanin tego kwasu rybonukleinowego, bądź też niektóre właściwości ustalone dla tRNA przenoszącego określony aminokwas przypisywano cząsteczkom przenoszącym inne aminokwasy. Taki sposób postępowania możliwy jest tylko przy założeniu istnienia jednolitej struktury przestrzennej dla wszystkich cząsteczek tRNA. Do sformułowania takiego założenia nie było jednak przez dłuższy czas dostatecznie przekonujących dowodów. Problem ten przemilczano nawet w pracach przeglądowych poświęconych przestrzennej strukturze tRNA [50, 54, 55, 57].

O istnieniu jednolitej struktury przestrzennej mówi się w pracy Abraham a [102], w której podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu powstawania łańcucha peptydowego w procesie biosyntezy białka na rybosomie. Autor nie szuka jednak dowodu na istnienie jednolitej struktury prze-

strzennej, lecz zakłada jej istnienie na podstawie funkcji jaką spełniają wszystkie cząsteczki tRNA w organizmie.

Wydaje się, że obecnie istnienie jednolitej struktury przestrzennej tRNA przestało już być hipotezą i można je traktować jako jedno z wymagań stawianych modelowi przestrzennej struktury tRNA (patrz III-1. punkt F). Znamy bowiem wiele faktów, które potwierdzają istnienie jednolitej struktury przestrzennej tRNA.

Każda cząsteczka tRNA może przenosić dowolny aminokwas [104, 105], jeśli tylko potrafimy taki aminokwas połączyć z cząsteczką tRNA nie naruszając jej przestrzennej struktury. Wprawdzie sekwencje powstającego łańcucha peptydowego będzie niezgodna z sekwencją łańcucha zakodowanego w mRNA, ale synteza odbywa się bez przeszkód.

Właściwości roztworów mieszaniny naturalnej cząsteczek tRNA są identyczne z właściwościami roztworów tRNA przenoszących określony aminokwas. Świadczy o tym brak różnic w wynikach rozproszenia promieni rentgenowskich pod małymi kątami [66] oraz jednakowe czasy relaksacji dla tych roztworów [23].

Najbardziej przekonującym dowodem na istnienie jednolitej struktury przestrzennej tRNA jest możliwość tworzenia ciekłych kryształów przez stężone roztwory mieszaniny tRNA [66, 106], oraz możliwość tworzenia kryształów „rzeczywistych” zawierających mieszaninę tRNA przenoszących różne aminokwasy [70, 107]. Jak wiadomo, procesy zarówno kryształizacji „rzeczywistej”, jak i tworzenia kryształów ciekłych możliwe są jedynie w przypadku cząsteczek o identycznej strukturze.

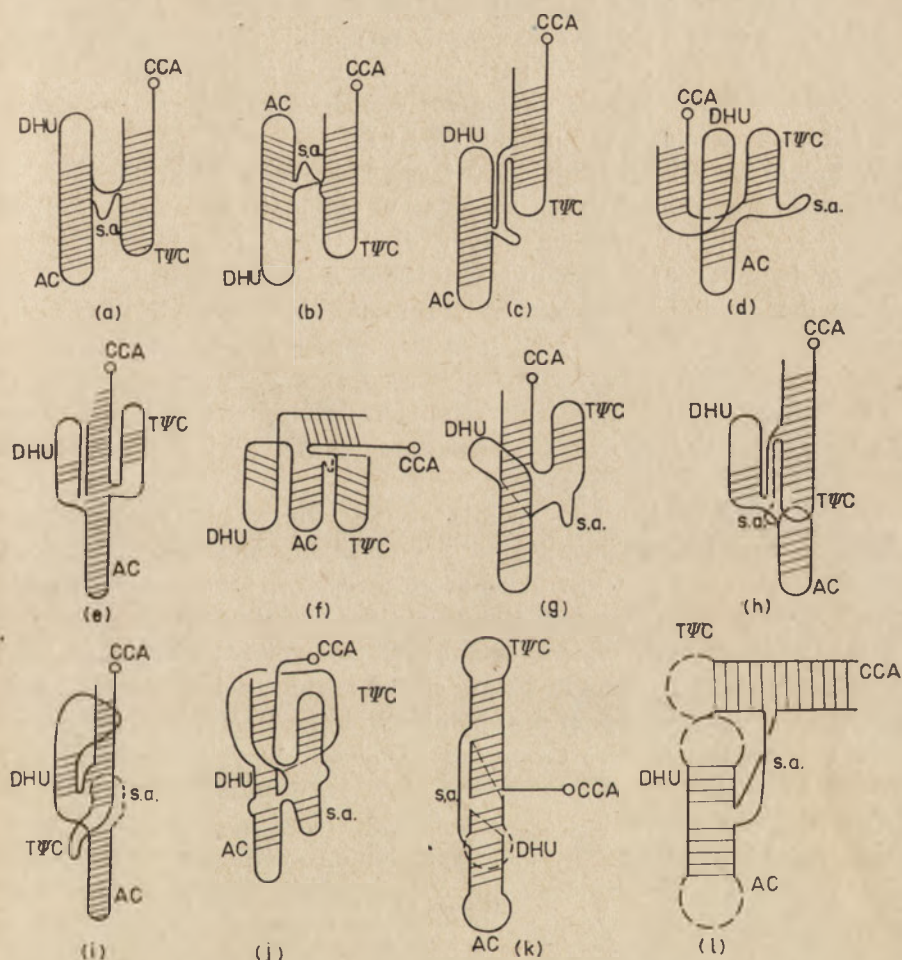
Na istnienie jednolitej struktury przestrzennej cząsteczek tRNA przenoszących różne aminokwasy wskazują nie tylko właściwości fizyczne, lecz również inne fakty wynikające ze znajomości mechanizmów oddziaływania tRNA z centrami aktywnymi rybosomu [108].

Wszystkim tRNA, dla których znana jest sekwencja nukleotydowa (około 30 tRNA) można przypisać odpowiednią płaską strukturę liścia koniczyny, a to pozwala przypuszczać, że ułożenie poszczególnych ramion względem siebie jest podobne, gdyż poszczególne części łańcucha zbudowane są z podobnych elementów.

III-3. Analiza modeli przestrzennej struktury tRNA

Jeden z modeli tRNA — model liścia koniczyny (Ryc. 1b i Ryc. 2) opisano w poprzednim rozdziale (patrz II-1.). Model ten nie spełnia wielu wymagań (punkty B, D, E, H, J, K) i, jak już wspomniano, może być używany jedynie do zapisu sekwencji łańcucha polinukleotydowego tRNA. Przy opracowywaniu następnych modeli zachowano w mniejszym lub większym stopniu podstawowe jednostki strukturalne (ramiona i pętle) występujące w modelu liścia koniczyny. Wyjątek stanowią trzy modele o kształcie pałeczek, utworzonych ze spirali trójpasmowej [42]; postuluje się, że najbar-

dziedzi prawdopodobny jest model pałeczki, w której obok dwu pętli głównych występują pętle boczne. Dotychczas nie stwierdzono jednak występowania naturalnych kwasów nukleinowych w postaci spirali trójpasmowej. Wartość elektronowego promienia bezwładności takiej cząsteczki wyznaczona teoretycznie przekracza znacznie wartość wyznaczoną doświadczalnie [44, 68]. Poza tym model nie spełnia punktów G, H i J z listy wymagań stawianych modelom tRNA.



Ryc. 3. Statyczne modele tRNA według: a) Cantora i innych [43], b) Lake'a i Bemanna [44], Doctora i innych [48], c) Levitta [50], d) Cramera i innych [45, 109], e) Cramera [55], f) Melchera [51], g) Ninio i innych [52], h) Fullera i innych [49], i) Connorsa i innych [47], j) Staehelina [111], k) Abrahama [102], l) Kima i innych [117]

AC — ramię antykodonowe,
CCA — koniec 3' (ramię aminokwasowe),
DHU — ramię dwuhydrouacylowe,
TΨC — ramię TΨC,
s.a. — ramię dodatkowe.

Na rycinie 3 przedstawiono tzw. modele statyczne tRNA. W tym przypadku konformacja natywna cząsteczki tRNA nie zmienia się w zauważalny sposób podczas wykonywania przez cząsteczkę funkcji biologicznej.

Wśród modeli statycznych można wyróżnić tzw. modele H [43, 44, 48] (Ryc. 3a, b). W modelach tych rozróżnia się dwa odcinki spiralne, z których jeden jest utworzony przez ramię aminokwasowe i ramię T Ψ C, a drugi — przez ramię antykodonowe i dwuhydrouracylowe. Odcinki te są przeciwnie zorientowane względem siebie. Modele H nie spełniają wymagań zawartych w punktach G i H oraz częściowo w punktach B, J i L.

Model *Levitt*a [50] przedstawiony na rycinie 3c przez dłuższy okres uważany był za model tRNA najbliższy rzeczywistej strukturze tej cząsteczki [54, 56]; nie spełnia on jednak wymagań zawartych w punktach D, E i H oraz częściowo w punktach B, J i L.

W kolejnych trzech modelach przedstawionych na rycinach 3d, e, f założono, że trzy ramiona skierowane są w jedną stronę, a czwarte ramię, skierowane w stronę przeciwną (Ryc. 3d, e), tworzy wspólną spiralę z ramieniem dwuhydrouracylowym [45, 109] lub z aminokwasowym [55], albo jest prostopadłe do pozostałych trzech ramion [51]. Oba modele (Ryc. 3d, e) opracowane przez *Cramera* i jego współpracowników [45, 55, 109] nie spełniają wymagań zawartych w punktach E, G, L oraz częściowo — B, D i F. Natomiast model [51] przedstawiony na rycinie 3f i model nieco zmodyfikowany [110] nie spełniają punktów A, D, E i częściowo punktów B, J, K i L.

Model przedstawiony na rycinie 3g jest pierwszym modelem, przy opracowywaniu którego odstąpiono nieco od konformacji liścia koniczyny [52]. Model ten podobny jest do modeli przedstawionych na rycinach 3d, e, a zatem teoretyczna wartość elektronowego promienia bezwładności jest większa od wartości doświadczalnej [44, 68]. Również asymetria (punkt D) i rozmiary (punkt E) modelu różnią się od asymetrii i rozmiarów cząsteczek tRNA. Poza tym model nie spełnia punktów B, H, J i L.

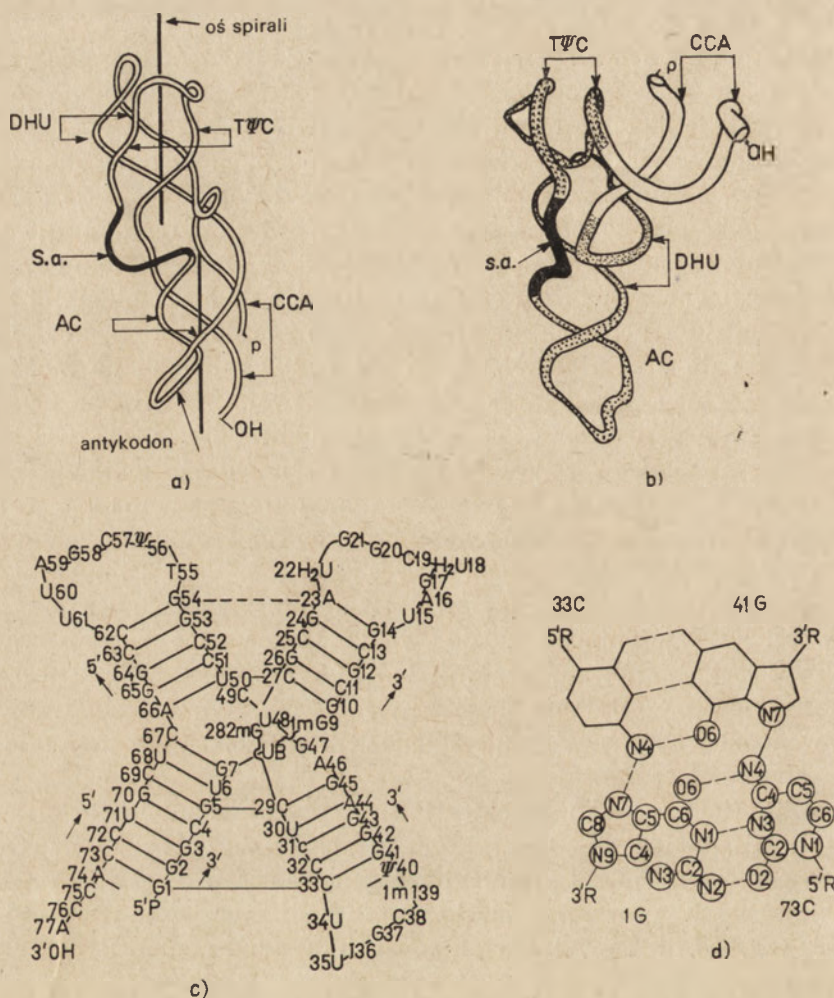
Na rycinie 3h, i przedstawiono dwa podobne modele cząsteczki tRNA [46, 47, 49], które rozpatrywane są często jako modele identyczne [54]. W modelach tych zakłada się istnienie wspólnego odcinka spiralnego dla ramion aminokwasowego i T Ψ C oraz istnienie wspólnej osi dla tego odcinka spiralnego z odcinkiem spiralnym ramienia antykodonowego. Modele różnią się tylko ułożeniem pętli dwuhydrouracylowej. Przyjęte założenia nie są zgodne z wymaganiami fizycznymi zawartymi w punktach D i E, poza tym model nie spełnia części wymagań z punktów B, H, J i L. Podobny model [111] przedstawia ryciną 3j, w którym założono istnienie wspólnego odcinka spiralnego dla trzech ramion: aminokwasowego, dwuhydrouracylowego i antykodonowego. Ramię T Ψ C tworzy wspólny odcinek spirali z ramieniem dodatkowym (model ten opracowano dla cząsteczki tRNA przenoszących serynę, a zatem cząsteczki, która ma długie ramię dodatkowe). Podczas opracowywania tego modelu uwzględniono właściwości che-

miczne i biochemiczne cząsteczki tRNA, nie uwzględniono natomiast jej właściwości fizycznych. Model przedstawiony na rycinie 3j nie spełnia wymagań zawartych w punktach B, D, E i F, a także w punkcie K, gdyż długość cząsteczki tRNA zmienia się wraz ze zmianą liczby nukleotydów wchodzących w skład pętli dwuhydrouracylowej.

Model A b r a h a m a [102] potocznie zwany modelem I przedstawiono na rycinie 3k. Przy opracowywaniu tego modelu uwzględniono po raz pierwszy funkcję biologiczną tRNA w procesie biosyntezy białek. Przyjęto więc stałą długość cząsteczki (ramię T Ψ C i antykodonowe mają stałą liczbę nukleotydów), a poprzeczne rozmiary cząsteczki dopasowano do długości jaką zajmuje tryplet kodonu w łańcuchu mRNA. Dzięki temu możliwe jest oddziaływanie cząsteczki z dwoma centrami aktywnymi rybosomu oraz oddziaływanie równoczesne dwu cząsteczek tRNA z dwoma kolejnymi kodonami. W modelu I koniec 3' (aminokwasowy) znajduje się pośrodku cząsteczki i jest do niej prostopadły, co nie wpływa jednak na możliwość włączania kolejnego aminokwasu do syntetyzowanego łańcucha peptydowego. Jak podkreśla autor pracy [102] dla udowodnienia słuszności tego modelu potrzebne są dalsze badania, a zwłaszcza badania rentgenograficzne i chemiczne. Wydaje się, że odsłonięta pętla T Ψ C powinna być podatna na modyfikacje chemiczne i enzymatyczne, co nie zostało dotychczas potwierdzone doświadczalnie. Obecnie uważa się, że pętla T Ψ C położona jest w pobliżu pętli dwuhydrouracylowej [112]; nie wyklucza się przy tym możliwości ich wzajemnego oddziaływania. Można więc przypuszczać, że pętla T Ψ C jest ekranowana przez pętlę dwuhydrouracylową przed działaniem enzymów i czynników chemicznych. Mimo wymienionych powyżej braków model I był poważnym osiągnięciem w dziedzinie badań struktury przestrzennej tRNA.

W roku 1968 w kilku pracowniach równocześnie udało się otrzymać kryształy tRNA [107, 113—116], które nadawały się do badań strukturalnych za pomocą dyfrakcji promieni rentgenowskich. Do roku 1973 ustalono wiele różnych parametrów sieci krystalicznej kryształów tRNA [71 i literatura tam cytowana, 72]. Wynikiem tych prac był model (Ryc. 3l) opracowany na podstawie wykonanych map gęstości elektrycznej o rozdzielczości 4Å [117]. Model ten różni się znacznie od wszystkich pozostałych modeli i chociaż autorzy uważają, że pewne lokalne konformacje łańcucha będzie można wyjaśnić dopiero po opracowaniu map gęstości elektrycznej o rozdzielczości 3Å, nie wpłynie to jednak na ułożenie poszczególnych ramion liścia koniczyny względem siebie. Model ten nie spełnia punktów B, E, H oraz częściowo D i J, a spełnienie punktów I, K i L jest dyskusyjne. Należy zaznaczyć, że dotychczas krystalizację tRNA prowadzono z mieszanin cieczy organicznych z wodą. Ponieważ procentowa zawartość cieczy organicznych często jest dość duża, może to spowodować częściową, a nawet całkowitą denaturację cząsteczki [118]. Wiadomo, że istnieje możliwość uzyskania kryształów tRNA z roztworów nie zawierających cieczy

organicznych [118]. Dalsze badania rentgenograficzne takich kryształów pozwolą stwierdzić czy konformacja cząsteczki tRNA jest zgodna z modelem przedstawionym na rycinie 3l.



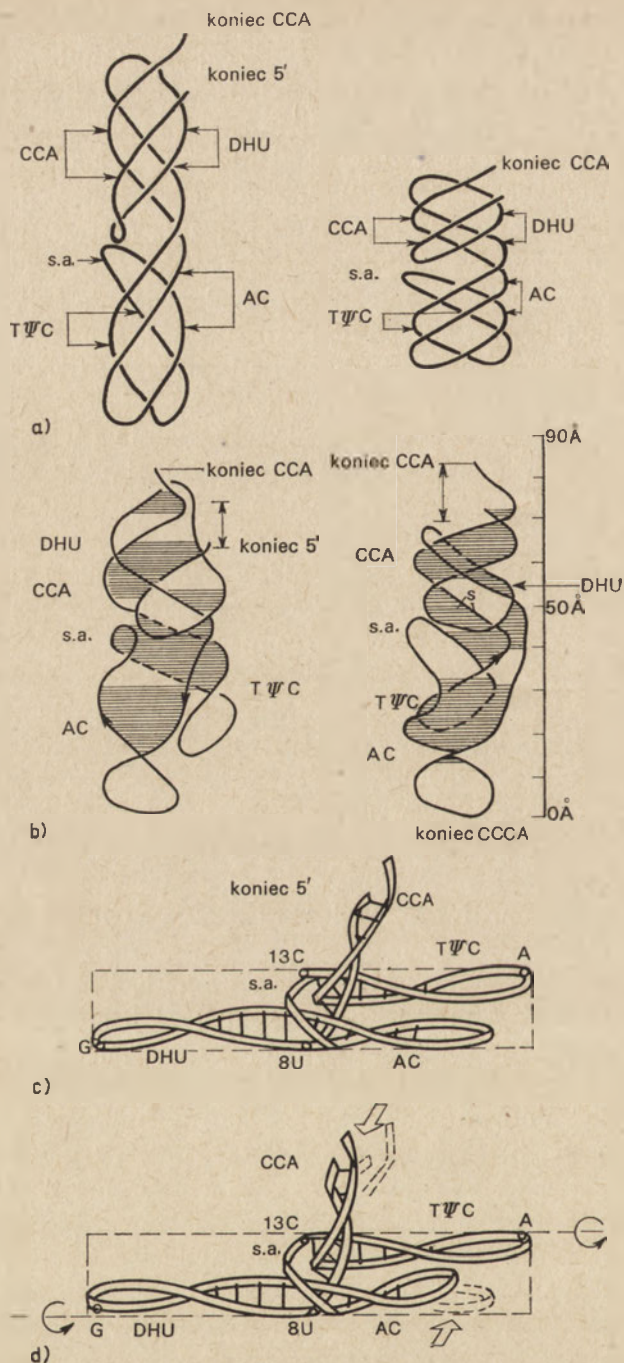
Ryc. 4. Ułożenie łańcucha polinukleotydowego w tRNA

- a) według Janga [67],
 - b) według Kima i innych [117],
 - c) w modelu liścia koniczyny według Janga [67] z zaznaczonymi odcinkami spirali czteropasmowej,
 - d) wiązania wodorowe powstające w spirali czteropasmowej [67];
- Oznaczenia analogiczne jak na rycinach 1 i 3.

Jednym z ciekawszych statycznych modeli tRNA jest model Janga [67] przedstawiony na rycinie 4a. W modelu tym założono, istnienie dwu odcinków spirali czteropasmowej, których osie przesunięte są względem siebie o 7,5Å. Jeden z odcinków spirali czteropasmowej utworzony jest

przez ramiona dwuhydrouuracylowe i T Ψ C, a drugi — przez ramiona antykodonowe i aminokwasowe. Koniec 3' łańcucha polinukleotydowego znajduje się w pobliżu pętli antykodonowej. Ramię dodatkowe znajduje się w połowie cząsteczki i w przypadku, gdy tRNA ma długie ramię dodatkowe, może się ono układać wzdłuż ramienia antykodonowego, co nie powoduje poważniejszych zmian w kształcie makrocząsteczki. Model Janga spełnia wszystkie poprzednio opisane wymagania (patrz III-1.). Poza tym pętla dwuhydrouuracylowa znajduje się tak blisko pętli T Ψ C, że możliwe jest ich wzajemne oddziaływanie, a to prawdopodobnie jest konieczne dla zapewnienia biologicznej aktywności tRNA [112]. Na takie ułożenie obu pętli wskazują też badania rentgenowskie kryształów tRNA [117]. W modelu tym przyjęto również, że w łańcuchu polinukleotydowym tRNA sześć nukleotydów występuje w konformacji *syn* (zgodnie z wcześniejszymi badaniami [81, 119]). Nie założono natomiast istnienia wiązań wodorowych pomiędzy grupą 2'OH rybozy z węglem następnego pierścienia rybozy (propozycja A b r a h a m a [102]), ale istnienie takich wiązań nie zostało dotychczas potwierdzone doświadczalnie, a jego wkład w energię stabilizacji struktury łańcucha polinukleotydowego jest dość dyskusyjny [120, 121]. W modelu przedstawionym na rycinie 4a, oprócz kanonicznych wiązań wodorowych Watsona—Cricka, założono dodatkowo istnienie 24 wiązań wodorowych, które powstają pomiędzy spiralnymi odcinkami poszczególnych ramion liścia koniczyny (patrz Ryc. 4c). W związku z tym założono [67], że w ramieniu dwuhydrouuracylowym istnieje odcinek spiralny utworzony z pięciu par nukleotydów. Wiązania wodorowe powstające między zasadami w spirali czteropasmowej przedstawia rycina 4d. Możliwość powstawania tego rodzaju wiązań wykazano [122] dla kryształów, natomiast na steryczną możliwość istnienia spirali czteropasmowej wskazują wyniki pracy [123].

Oprócz pewnych zasadniczych różnic występujących między modelami proponowanymi przez J a n g a [67] oraz K i m a i jego współpracowników [117], charakteryzują je również pewne cechy wspólne. Przede wszystkim w obu modelach założono niewielką odległość pomiędzy pętlą dwuhydrouuracylową i T Ψ C. Porównując ułożenie przestrzenne łańcucha polinukleotydowego (Ryc. 4a, b) można stwierdzić, że wprowadzie ułożenie ramion dwuhydrouuracylowego, T Ψ C i dodatkowego w obu modelach są nieco różne, lecz wynika to raczej z różnego ułożenia ramion antykodonowego i aminokwasowego. Ponieważ jednak dodanie rozpuszczalników organicznych do roztworu tRNA wpływa na zmianę konformacji tych makrocząsteczek [118], można przypuszczać, że struktura tRNA w kryształach nie jest identyczna ze strukturą natywną tych makrocząsteczek. Nasuwa się więc wniosek, że natywna struktura tRNA jest podobna (a być może i identyczna) do struktury proponowanej przez J a n g a [67], a warunki w jakich tRNA krystalizuje wywołują denaturację, w wyniku której cząsteczka tRNA przyjmuje strukturę nieco inną, a mianowicie taką jaką ustalili autorzy



Ryc. 5. Dynamiczne modele tRNA według:

- a) Wu [53],
b) Danchina [128],
c) i d) Gurela [129].

Oznaczenia analogiczne jak na rycinach 1 i 3.

pracy [117] na podstawie badań rentgenograficznych. Problem ten niewątpliwie wkrótce zostanie rozwiązany.

Ponieważ wśród statycznych modeli struktury tRNA nie znaleźliśmy takiego modelu, który mógłby jednocześnie wyjaśnić wszystkie ustalone właściwości tej makrocząsteczki, należy przeanalizować modele dynamiczne. Przy opracowaniu tych modeli zakłada się, że w makrocząsteczce tRNA podczas wykonywania przez nią funkcji biologicznych występują pewne zmiany strukturalne. Na rycinie 5 przedstawiono trzy dynamiczne modele tRNA.

Dynamiczny model W u [53] (Ryc. 5a) przedstawia cząsteczkę tRNA w dwu formach, tzw. zdenaturowanej i natywnej. Te dwie formy zostały wykryte [58, 124] i rozdzielone za pomocą chromatografii [124] w roku 1966. Ustalono wiele właściwości fizycznych i biologicznych tych dwu form [125—127].

Omawiane modele opisują obie formy: zdenaturowaną (lewy) i natywną (prawy). W obu formach założono, że cząsteczki tRNA mają strukturę spirali czteropasmowej. W formie zdenaturowanej rozmiary cząsteczki wynoszą $20 \times 100 \text{ \AA}$, a w formie natywnej $25 \times 50 \text{ \AA}$ co prowadzi do niezgodności z punktem E wymagań (patrz III-1). Według tych modeli ramiona anty-kodonowe i T Ψ C tworzą jeden z odcinków spirali czteropasmowej, co również wydaje się niewłaściwe [112, 117]. Poza tym modele te nie spełniają punktów B, D i G, a spełnienie punktów H—L jest bardzo dyskusyjne.

Na rycinie 5b przedstawiono dynamiczny model tRNA [128], w którym zakłada się zmianę konformacji cząsteczki tRNA podczas jej oddziaływania z rybosomem. Konformację, jaką przyjmuje cząsteczka tRNA podczas oddziaływania z centrum aktywnym A rybosomu nazwano strukturą A, a konformację, którą przyjmuje ta cząsteczka oddziałując z centrum aktywnym P rybosomu — strukturą P. Modele obu struktur nie spełniają częściowo punktów B, E i J, a ułożenie pętli dwuhydrouuracylowej i T Ψ C, podobnie jak w przypadku poprzednich modeli dynamicznych, wydaje się przemawiać raczej na niekorzyść tych modeli.

Inny dynamiczny model tRNA [129] przedstawiono na rycinach 5c i 5d, na których u góry (Ryc. 5c) przedstawiono konformację łańcucha polinukleotydowego tRNA w początkowym momencie oddziaływania z rybosomem (analogicznie do struktury A po lewej stronie na rycinie 5b) i (u dołu) w momencie oddziaływania z tRNA peptydydowym (analogicznie do struktury P po prawej stronie na rycinie 5b). Takie ułożenie poszczególnych ramion cząsteczki tRNA jak na rycinach 5c i 5d powoduje niespełnienie punktów B, D, E i częściowo J z listy wymagań stawianych modelowi tRNA. Ułożenie pętli dwuhydrouuracylowej i T Ψ C jest niezgodne z wynikami poprzednio omawianych prac [112, 117], a poza tym nie ekranowana pętla T Ψ C musiałaby być podatna na modyfikacje chemiczne i enzymatyczne w większym stopniu, niż to stwierdzono doświadczalnie.

Dotychczas brak jest danych doświadczalnych wskazujących na wy-

stępowanie zmian konformacyjnych tRNA podczas syntezy białka na rybosomie. Jest mało prawdopodobne, aby w najbliższym czasie można było uzyskać taką informację, gdyż proces biosyntezy białka jest bardzo skomplikowany, a struktura rybosomu jest nie mniej złożona, niż struktura tRNA i w dodatku dotychczas nieznana. Natomiast różnic w konformacji form zdenaturowanego i natywnego tRNA należy prawdopodobnie szukać między strukturami przedstawionymi na rycinach 4a, b.

IV. Uwagi końcowe

W badaniach tRNA można wyróżnić trzy podstawowe etapy:

Rezultatem pierwszego etapu (1957—1965) — etapu badań naturalnych mieszanin tRNA — było ustalenie ogólnych właściwości fizycznych, chemicznych i biologicznych tej makrocząsteczki. W tym okresie zidentyfikowano też końcowe nukleotydy łańcucha polinukleotydowego.

Drugi etap (1965—1968) charakteryzują prace dotyczące oczyszczania, rozdzielania, a przede wszystkim ustalania sekwencji łańcucha polinukleotydowego tej makrocząsteczki.

Trzeci etap, który trwa od 1968 roku, to etap badań strukturalnych tRNA. Jak wynika z przedstawionego materiału w badaniach tych odniesiono wiele cennych sukcesów, czego dowodem jest opracowanie kilkunastu modeli struktury tRNA i ustalenie listy wymagań stawianych tym modelom. Etap ten zostanie zakończony z chwilą ustalenia jednoznacznej struktury cząsteczki tRNA. Powinno to nastąpić w ciągu najbliższych kilku lat. Do tak optymistycznego stwierdzenia upoważnia znajomość metod otrzymywania kryształów tRNA z jego wodnych roztworów, co umożliwia zastosowanie najbardziej precyzyjnej metody badania struktury — rentgenografii do badania kryształów utworzonych przez natywne makrocząsteczki. Obok rentgenografii poważną ilość informacji mogą dostarczyć dalsze badania chemiczne oraz coraz intensywniej rozwijane metody numeryczne i kwantowomechaniczne.

Artykuł wpłynął 27.11.1973, po rewizji autorskiej wrócił 8.1.1974.

PISMIENNICTWO

1. Hoagland M. B., Zamecnik P. C., Stephenson M. L., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 215—216.
2. Ogata K., Nohara H., (1957), *Biochim. Biophys. Acta* **25**, 659—660.
3. Ishikura H., Yamada Y., Nishimura S., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 68—70.
4. Janion C., (1971), *Post. Biochem.* **17**, 631—650.
5. Zachau H. G., Dütting D., Feldmann H., (1966), *Angew. Chem.*, **78**, 392—393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **5**, 422—423.

6. Yarus M., Barrell B. G., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 729—734.
7. Muench K. H., Saffille P. A., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2799—2808.
8. Gauss D. H., von der Haar F., Maelicke A., Cramer F., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 1045—1078.
9. Wenkstern T. W., (1970), *Pierwiczna Struktura Transportnych Ribonukleynowych Kislot*, str. 258, Nauka, Moskwa.
10. Gilham P. T., (1970), *Ann. Rev. Biochem.*, **39**, 227—250.
11. Holley R. W., (1968), *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **8**, 37—47.
12. Lengyel P., Söll D., (1969), *Bacteriol. Rev.*, **33**, 264—301.
13. Novelli G. D., (1967), *Ann. Rev. Biochem.*, **36**, 449—484.
14. Yarus M., (1969), *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 841—880.
15. Faworowa O. O., Parin A. W., Ławrik O. I. (1972) w *Biofizyka t. 2*. red. Engelgardt W. A. (w serii *Itogi Nauki i Techniki WINITI*), 7—103, Moskwa.
16. Jukes T. H., (1970), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **49**, 178—219.
17. Sadgopal A., (1968), *Advan. Genet.*, **14**, 325—404.
18. Kochetkov N. K., Budowsky E. I., (1970), *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **11**, 403—438.
19. Tissieries A., (1959), *J. Mol. Biol.*, **1**, 365—374.
20. Henley D., Lindahl T., Fresco J., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 191—198.
21. Lubanauskas M., Connors R. G., Young J. D., Block R. M., Anderegg J. W., Beeman W. W., (1969), *Science*, **166**, 1530—1532.
22. Borisowa O. F., Kisielew L. L., Surowaja A. H., Tumerman L. A., Frołowa L. Ju., (1964), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **159**, 1154—1157.
23. Surovaya A., Borisova O., Jilyaeva T., Scheinker V., Kisselev L., (1970), *FEBS Letters*, **8**, 201—204.
24. Pilz I., Kratky O., Cramer F., von der Haar F., Schlimme E., (1970), *Eur. J. Biochem.* **15**, 401—409.
25. Doube S. K., Rudland P. S., Clark B. F., Marcker K. A., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 161—166, Cold Spring Harbor Lab., New York.
26. Borisowa O. O., Kisielew L. L., Tumerman L. A., (1963), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **152**, 1001—1004.
27. Bell D., Russel G., (1967), *Biochemistry*, **6**, 3363—3368.
28. Fresco J. R., Alberts B. M., Doty P., (1960), *Nature*, **188**, 98—101.
29. Fresco J., (1963), w *Informational Macromolecules* red. Vogel H. J., Bryson V., Lampen J. O., 121—142, Academic Press, New York.
30. Brown G. L., (1963), *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **2**, 259—310.
31. Felsenfeld G., Sandeen G., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 587—610.
32. Holley R. W., Apgar J., Everett G., Madison J., Marquisee M., Merrill S., Penswick J., Zamir A., (1965), *Science*, **147**, 1462—1465.
33. Dembo A. T., Sosfenow N. I., Feigin L. A., (1966), *Kristallografia*, **11**, 581—588.
34. Jukes T. H., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **24**, 744—749.
35. Madison G. T., (1968), *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 131—148.
36. Madison G. T., Everett G. A., Kung H. K., (1966), *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.*, **31**, 409—416, Cold Spring Harbor Lab., New York.
37. Neelon F. A., Molinaro M., Inohikura H., Sheiner L. B., Cantoni G. L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4515—4522.
38. Zachau H. G., Düting D., Feldmann H., (1966), *Z. Physiol. Chem.*, **347**, 212—235.

39. Staehelin M., Rogg H., Baguley B. C., Ginsberg T., Wehrli W., (1968), *Nature*, **219**, 1363—1365.
40. Ebel J. P., (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 2255—2276.
41. Zachau H. G., (1969), *Angew. Chem.*, **81**, 645—662; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **8**, 711—727.
42. Guschlbauer W., (1966), *Nature*, **209**, 258—261.
43. Cantor C. R., Jaskunas S. R., Tinoko I., (1966), *J. Mol. Biol.*, **20**, 39—62.
44. Lake J. A., Beeman W. W., (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 115—125.
45. Cramer F., Doepper H. von der Harr F., Schlimme E., Seidel H., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1384—1391.
46. Arnott S., Dover S. D., Wonacott A. J., (1969), *Acta Cryst.*, **B25**, 2192—2206.
47. Connors P. G., Labanauskas M., Beeman W. W., (1969), *Science*, **166**, 1528—1530.
48. Doctor B. P., Fuller W., Webb N. L., (1969), *Nature*, **221**, 58—59.
49. Fuller W., Arnott S., Creek J., (1969), *Biochem. J.*, **114**, 26P—27P.
50. Levitt M., (1969), *Nature*, **224**, 759—763.
51. Melcher G., (1969), *FEBS Letters*, **3**, 185—189.
52. Ninio J., Favre A., Yaniv M., (1969), *Nature*, **223**, 1333—1335.
53. Wu T. T., (1969), *Bull. Math. Biophys.*, **31**, 395—402.
54. Arnott S., (1971), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **22**, 179—213.
55. Cramer F., (1971), *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **11**, 391—421.
56. Kisielow L. L., (1972), w *Biofizyka t. 2*, red. Engelgardt W. A. (w serii *Itogi Nauki i Techniki WINITI AN ZSRR*), 104—145, Moskwa.
57. Rafalski A. J., Barciszewski J., w *Synteza, struktura i własności transferowych kwasów rybonukleinowych*, 5—26, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
58. Lindahl R., Adams A., Fresco J. R., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 941—948.
59. Danchin A., (1972), *Biopolymers*, **11**, 1317—1333.
60. Englander J. J., Kallenbach N. R., Englander S. W., (1972), *J. Mol. Biol.*, **63**, 153—169.
61. Cwietkow W. N., Kisielow L. L., Frołowa L. Ju., Ljubina S. Ja., (1964), *Wysokomol. Sojed.*, **6**, 568—570.
62. Kim H. S., Quigley G., Suddath F. L., Rich A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 841—845.
63. Arnott S., (1970), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **21**, 265—319.
64. Arnott S., Hukins D. W. L., Dover S. D., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1392—1399.
65. Kisielow N. A., Kisielow L. L., (1961), *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **141**, 980—983.
66. Tumanjan W. G., Jesipowa N. G., Kisielow L. L., (1966), *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **168**, 211—214.
67. Jang C.—G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 612—619.
68. Krigbaum W. R., Godwin R. W., (1968), *Macromolecules*, **1**, 375—379.
69. Yoshida M., Ukita T., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 466—475.
70. Blake R. D., Fresco J. R., Langridge R., (1970), *Nature*, **225**, 32—35.
71. Kim S. H., Quigley G., Suddoth F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 421—428.
72. Kim S. H., Quigley G., Suddoth F. L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 429—432.
73. Yaniv M., Favre A., Barell B. G., (1969), *Nature*, **223**, 1331—1333.

74. Yaniv M., Chestiee A., Gros F., Favre A., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 381—388.
75. Chaffin L., Omilianowski D. R., Bock R. M., (1971), *Science*, **172**, 854—855.
76. Beardsle K., Cantor C. R., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 39—46.
77. Favre A., Michelson A. M., Yaniv M., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 367—379.
78. Favre A., Yaniv M., Michelson A. M., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 266—271.
79. Barnard E. A., (1969), *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 677—732.
80. Bobst A. M., Cerutti P. A., Rottman F., (1969), *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1246—1248.
81. Saenger W., Scheit D. H., (1970), *J. Mol. Biol.*, **50**, 153—169.
82. Söll D., (1971), *Science*, **197**, 293—299.
83. Seno T., Kobayashi I., Fukuhara M., Nishimura S., (1970), *FEBS Letters*, **7**, 343—346.
84. Smith J. D., Barnett L., Brenner S., Russell R. L., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 1—14.
85. Dudock B., Diperi C., Scileppi K., Reslbach (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **68**, 681—684.
86. Chambers R. W., (1971), *Progr. Nucl. Acid. Mol. Biol.*, **11**, 489—525.
87. Brostoff S. W., Ingram V. M., (1967), *Science*, **158**, 666—669.
88. Nelson J. A., Ristow S. C., Holley R. W., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **149**, 590—593.
89. Cashmore T. (1970), *FEBS Letters*, **12**, 90—95.
90. Högenauer G., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 527—532.
91. Zhilyaeva T. I., Kisselew L. L., (1970), *FEBS Letters*, **10**, 229—232.
92. Igo-Kemenes T., Zachau H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 292—298.
93. Ofengand J., Henes C., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6241—6253.
94. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 285—303.
95. Abelson J. N., Gefter M. L., Barnett L., Landy A., Russell R. G., Smith J. D., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 15—28.
96. Stewart T. S., Roberts R. J., Strominger J. L., (1971), *Nature*, **230**, 36—38.
97. Crick F. H. C., (1966), *J. Mol. Biol.*, **19**, 548—555.
98. Fuller W., Hodgson A. (1967), *Nature*, **215**, 817—821.
99. Uhlenbeck O. C., Baller J., Doty P., (1970), *Nature*, **225**, 508—510.
100. Ninio J., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 63—82.
101. Eisinger J., Spahr P.-F., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 131—137.
102. Abraham D. J., (1971), *J. Theor. Biol.*, **30**, 83—91.
103. Woese C., (1970), *Nature*, **226**, 817—820.
104. Chapeville F., Lipmann F., v. Erenstein G., Weisblum B., Ray W. J., Jr. Benzer S., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**, 1086—1092.
105. Weisblum B., Benzer S., Holley R. W., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **48**, 1449—1454.
106. Weijnstein B. K., Fejgin L. A., (1965), *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **161**, 1444—1447.
107. Fresco J., Blake R., Langridge R., (1968), *Nature*, **220**, 1285—1287.
108. Spirin A. S., Gawriłowa L. P., (1971), *Ribosoma*, str. 254, Nauka, Moskwa.

109. Cramer F., Edman V. A., von der Haar F., Schlimme E. (1969), *J. Cell. Physiol.*, Suppl. I, 74, 163—178.
110. Melcher G., (1972), *Biophysik*, 9, 13—38.
111. Staehelin M., (1970), *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.*, 25, 65—73.
112. Uhlenbeck O. C., Chirikjian J. G., Fresco J. C., (1972), *Fed. Prof.* 31, 422 Abs.
113. Clark B. F. C., Doctor B. P., Homels K. C., Klug A., Marcker K. A., Morris S. J., Paradies H. H., (1968), *Nature*, 219, 1222—1224.
114. Hampel A., Labanauskas M., Counors P. G., Kirkgard L., RajBhandary U. L., Sigler P. B., Bock R. M., (1968), *Science*, 162, 1384—1387.
115. Kim S. H., Rich A., (1968), *Science*, 162, 1381—1384.
116. Paradies H. H., (1968), *FEBS Letters*, 2, 112—114.
117. Kim S. H., Quigley G. J., Suddath F. L., McPerson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A., (1973), *Science*, 179, 285—288.
118. Prinz H., Maelicke A., Cramer F., informacja prywatna.
119. Haschemeyer A. E. U., Sobell H. M., (1964), *Nature*, 202, 969—971.
120. Żmudzka B., Shugar D., (1971), *Acta Biochim. Polon.* 18, 321—337.
121. Kuśmierek J. T., Kielanowska M., Shugar D., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 53, 406—412.
122. Voet D., Rich A., (1970), *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 10, 183—265.
123. McGavid S., Wilson H. R., Barr G. C., (1966), *J. Mol. Biol.* 22, 187—191.
124. Gartland W. J., Sueoka N., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 55, 948—956.
125. Adams A., Lindahl T., Fresco J. R., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 57, 1684—1691.
126. Gartland W. J., Ishida T., Sueoka N., Nirenberg M. W. (1969), *J. Mol. Biol.*, 44, 403—413.
127. Streeck R.—E., Zachau H. G., (1971), *FEBS Letters*, 13, 329—334.
128. Danchin A., (1971), *FEBS Letters*, 13, 152—156.
129. Gurel O., (1973), *Physiol. Chem. Physics*, 5, 177—182.

Uzupełnienie:

Po oddaniu niniejszej pracy do druku ukazały się dwie prace, w których opisano tRNA nie posiadające uniwersalnego trypletu TΨC. W tych cząsteczkach zamiast tyminy występuje uracyl.

Dokładne dane można znaleźć w pracach:

- Marcu K., Mignery R., Reszelbach R., Roe B., Sirover M., Duddock B., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 477—483.
- Simsek M., Ziegenmeyer J., Heckman J., Rajbhandary U. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 1041—1045.

GRZEGORZ BARTOSZ *, JOLANTA OPAKKA **

Komórkowa naprawa uszkodzeń DNA

Cellular Repair of the DNA Damages

W artykule niniejszym omawiamy niektóre komórkowe mechanizmy naprawy uszkodzeń wywołanych w DNA przez promieniowanie ultrafioletowe (UV) i jonizujące oraz przez pewne chemiczne radiomimetyki. Nie będą natomiast dyskutowane molekularne mechanizmy powstawania uszkodzeń w DNA, gdyż omawiano już je na łamach *Postępów Biochemii* w artykułach K. L. Wierzchowskiego (13, 127, 1967) i B. Lubas (15, 113, 1969).

Mechanizmy naprawy uszkodzeń materiału genetycznego można traktować jako utrwaloną w czasie ewolucji reakcję organizmów żywych na działanie zewnętrznych czynników inaktywujących — takich jak światło, czy promieniowanie kosmiczne.

Badania ostatniego dwudziestolecia wykazały, że w komórkach żywych powszechnie występują systemy usuwające uszkodzenia wywołane w materiale genetycznym przez promieniowanie UV i jonizujące lub przez czynniki chemiczne. Osiągnięcia ostatnich lat przyczyniły się do dokładniejszego poznania mechanizmów komórkowej naprawy uszkodzeń DNA.

Radiooporność komórki zależy w pewnym stopniu od jej struktury, ale przede wszystkim od jej zdolności do naprawy uszkodzeń. Świadczą o tym chociażby znaczne różnice we wrażliwości na działanie promieniowania występujące pomiędzy bardzo nawet zbliżonymi do siebie formami, jakimi są np. szczepy B/r i B_{S-1} *E. coli* (Tabela 1). Wykazano (1), że dimery pirymidynowe powstają z jednakową wydajnością w komórkach obu tych szczepów, lecz w przypadku *E. coli* B_{S-1} już nawet jeden dimer w chromosomie może wywołać efekt letalny. Stosunkowo radiooporne komórki szczepu *E. coli* B/r, w przeciwieństwie do szczepu B_{S-1}, charakteryzują się zdolnością usuwania dimerów ze swego DNA dzięki specyficznym procesom enzymatycznym (2).

* Mgr, Zakład Biofizyki, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Łódź.

** Mgr, Zakład Biochemii, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, Łódź.

Powyższy przykład wskazuje, iż o radiooporności komórki decydują głównie mechanizmy naprawy uszkodzeń jej DNA. Możliwość enzymatycznej naprawy uszkodzeń materiału genetycznego wywołanych działaniem promieniowania jest, jak się wydaje, uniwersalna w świecie żywym poczynając od wirusów, a kończąc na komórkach roślin wyższych i ssaków. Doświadczalnie wykazano szereg różnych mechanizmów naprawy, spośród których najbardziej istotne wydają się być: fotoreaktywacja, naprawa przez wycięcie oraz naprawa poreplikacyjna, zwana również rekombinacyjną.

I. Naprawa uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania UV

I-1. Fotoreaktywacja

Teaminem fotoreaktywacja (ang. *photoreactivation*, skrót PR) określa się reaktywację pod wpływem światła widzialnego (o długości fal 310—440nm) układu biologicznego zainaktywowanego przez promieniowanie ultrafioletowe o długości fal 220—300nm (3). Jest to proces enzymatyczny. Aktywacji poprzez światło widzialne ulega kompleks enzymu fotoreaktywującego z DNA uszkodzonym przez promieniowanie ultrafioletowe.

Za odkrywcę fotoreaktywacji uważa się A. Kelnera, który opisał to zjawisko u *Streptomyces griseus* ATC 3326 (4). Polega ono na enzymatycznym rozszczepieniu dimerów pirymidynowych w DNA napromienionych komórek. Doświadczenia z zastosowaniem układu modelowego, złożonego z DNA *Haemophilus influenzae* napromienionego UV i częściowo oczyszczonego ekstraktu drożdżowego zawierającego enzym fotoreaktywujący (ang. PE — *photoreactivation enzyme*), pozwoliły na stwierdzenie, że w ciemności enzym fotoreaktywujący łączy się z uszkodzonym DNA tworząc stabilny kompleks. Pod wpływem światła kompleks ten rozpada się uwalniając enzym i biologicznie aktywny DNA, gdyż enzym fotoreaktywujący, aktywowany energią świetlną, rozrywa wiązania kowalencyjne dimerów odtwarzając wyjściową strukturę DNA (5, 6, 7).

Enzym fotoreaktywujący otrzymano w postaci czystej między innymi z ekstraktu drożdżowego i zbadano szereg jego własności (8). Częsteczkę enzymu rozdzielono na dwie różne podjednostki określając masę cząsteczkową większej z nich na ok. 30 000. Enzym fotoreaktywujący wykazuje największą aktywność przy pH 7,2, nie wymaga jonów metali dla aktywacji, ulega zahamowaniu przez wysokie stężenie fosforanów.

Substratem enzymu fotoreaktywacji są cyklobutanowe dimery tyminowe w łańcuchu DNA. Są one monomeryzowane z największą szybkością. Dimery innych pirymidyn podlegają w mniejszym stopniu działaniu enzymu: dimery tyminowo-cytosynowe i tyminowo-uracylowe monomeryzowane są wolniej niż tyminowe, najwolniej zaś dimery cytosynowe

i uracylowe (uracyl powstaje w wyniku dezaminacji cytozyny) (3). Szybkość monomeryzacji dimerów pirymidynowych jest wyższa w przypadku DNA natywnego niż zdenaturowanego (9). *In vivo* półokres usuwania dimerów z DNA *Micrococcus lysodeikticus* wynosi 7 minut (10). Najdłuższym trwającym etapem reakcji jest lokalizacja przez enzym fotoreaktywujący uszkodzenia w DNA (11). Badania konkurencji o centrum aktywne enzymu pomiędzy transformującym DNA poddanym ekspozycji na UV i kwasem politymidylowym wykazało, że minimalnym pod względem długości łańcucha substratem dla enzymu fotoreaktywującego jest sekwencja 9 nukleotydów (12).

Obecność enzymu fotoreaktywującego wykryto w bakteriach, drożdżach, niektórych pierwotniakach, glonach, w tkankach roślin wyższych, a także w tkankach bezkręgowców i kręgowców. Wykazano natomiast, że w hodowanych *in vitro* komórkach mysich linii L, komórkach chomika chińskiego i innych liniach komórek ssaków proces fotoreaktywacji nie zachodzi (13). Niedawno stwierdzono jednak występowanie tego zjawiska w komórkach torbaczy (*Potorous tridactylis* — konguroszczur właściwy (14).

Zaznaczyć należy, że fotoreaktywacja nie prowadzi do zlikwidowania wszystkich uszkodzeń powstałych w DNA. W warunkach doświadczalnych usunięciu może ulec ponad 90% biologicznych uszkodzeń DNA. Nie jest natomiast dokładnie dotąd znany charakter uszkodzeń nie podlegający naprawie na drodze fotoreaktywacji.

Zjawisko fotoreaktywacji omawiał szczegółowo artykuł I. Pietrzykowskiej (*Post. Biochem.* 13, 171, 1962).

I-2. Naprawa przez wycinanie

W odróżnieniu od fotoreaktywacji tzw. ciemna naprawa (ang. *dark repair, excision repair*) uszkodzeń DNA spowodowanych przez działanie UV zachodzi bez udziału światła widzialnego. Odmienny jest też molekularny mechanizm tego procesu. W przeciwieństwie do fotoreaktywacji przebiega on wieloetapowo i jest katalizowany nie przez jeden enzym, lecz najprawdopodobniej przez złożony kompleks enzymatyczny. Podczas naprawy tego typu dimery tyminowe nie są monomeryzowane *in situ*, lecz ulegają usunięciu z cząsteczki DNA. Mechanizm ten określamy przeto jako naprawę przez wycinanie (15).

Wykazanie obecności dimerów pirymidynowych w DNA jest możliwe dzięki ich trwałości w warunkach kwaśnej hydrolizy DNA. Izolowanie dimerów drogą chromatografii bibułowej (15) pozwala na oznaczenie ich zawartości w kwasonierozpuszczalnej i kwasorozpuszczalnej frakcjach komórek.

Stwierdzenie w komórkach *E. coli* szczepów B/r i B_{s-1} zależności pomiędzy opornością na działanie UV a względną ilością usuniętych dime-

rów pirymidynowych pozwala przypuszczać, że wycinanie dimerów zasad pirymidynowych z uszkodzonego DNA leży u podstaw czynnej radiooporności organizmów żywych.

Model naprawy przez wycinanie zakłada, że usunięcie dimerów z DNA komórki bakteryjnej zachodzi w kilkietapowym procesie, na który składają się:

- nacięcie, tj. rozerwanie wiązania fosfodwuestrowego w pobliżu dimeru;
- wycięcie, tj. usunięcie defektywnego odcinka łańcucha dzięki rozerwaniu wiązania fosfodwuestrowego po przeciwnej stronie uszkodzenia;
- degradacyjne rozszerzenie luki w uprzednio uszkodzonym przez UV łańcuchu polinukleotydowym;
- zapelnianie luki w etapie syntezy naprawczej przez prawidłową sekwencję nukleotydów, komplementarną do nieuszkodzonego odcinka drugiego łańcucha;
- wytworzenie wiązania fosfodwuestrowego pomiędzy nowosyntetyzowanym odcinkiem a resztą łańcucha (9, 16).

Poszczególne stapy tej naprawy katalizują odpowiednie enzymy. Na etapie nacięcia działa endonukleaza rozrywająca wiązanie fosfodwuestrowe w pobliżu uszkodzonych zasad. Taką endonukleazę, prawdopodobnie enzym nacinający, wykryto między innymi w *M. lysodeikticus* [17]. Kolumnowa analiza chromatograficzna ekstraktu komórkowego wykazała obecność w komórkach tych bakterii dwu frakcji nukleaz oznaczonych jako A i B. Frakcja A wywoływała jednołańcuchowe pęknięcia DNA *E. coli* i transformującego DNA *Bacillus subtilis* eksponowanych uprzednio na działanie UV. Była ona aktywna jedynie wobec napromienionego, natywnego DNA. Optymalne pH dla działania tego enzymu wynosiło 7,0—7,5. Enzym inaktywowały jony Mg^{2+} , nie hamowały go zaś EDTA i kofeina. Jego masa cząsteczkowa wynosi ok. 15 000 (18).

Sposób działania endonukleazy nacinającej był przedmiotem żywej dyskusji. Enzym ten mógłby rozpoznawać bądź dimery zasad pirymidynowych, bądź też — będącą następstwem dimeryzacji — lokalną denaturację podwójnego heliksu DNA. W tym drugim przypadku enzym mógłby rozrywać nie tylko uszkodzony, lecz i komplementarny łańcuch, co jednak nie zostało potwierdzone. Doświadczalnie wykazano ponadto, że endonukleaza nacinająca nie działa na DNA, który nie zawiera dimerów (19).

Bezbłędny i precyzyjny przebieg procesu nacinania, zdeterminowany specyficznością enzymu nacinającego, ogranicza znacznie możliwość pomyłek na tym etapie naprawy. Wyniki badań genetycznych wykazują, że na 10^6 usuniętych dimerów zachodzi nie więcej niż jedna mutacja (20).

Badanie procesu naprawy przez wycinanie w komórkach *E. coli* infekowanych fagiem T4 wykazało w ekstrakcie komórkowym obecność enzymu powodującego jednoniciowe pęknięcia w DNA napromienionym

ultrafioletem. Enzymowi temu, określanemu jako endonukleaza V faga T4, przypisuje się udział w etapie nacinania zachodzącego w czasie procesu naprawy w zainfekowanych fagiem T4 napromienionych UV komórkach *E. coli*. Synteza tego enzymu kontrolowana jest przez gen V^+ faga T4. Sugeruje się również, że etap nacinania w normalnych komórkach *E. coli* katalizuje enzym w sposób podobny do działania endonukleazy V faga T4 (21). Badania genetyczne wskazują, że proces ten kontrolują *in vivo* przynajmniej 4 geny: *uvr A*, *uvr B*, *uvr C* i *uvr D*.

Usunięcie dimeru pirymidynowego z DNA wymaga rozerwania wiązania fosfodwuestrowego w łańcuchu polinukleotydowym również i po drugiej stronie uszkodzenia (9, 16, 19, 22). Enzymy wycinające różnią się swym działaniem od innych nukleaz atakujących natywny i zdenaturowany DNA (23), DN-aza trzuskowa, fosfodwuesteraza z jadu węży i handlowe preparaty nukleaz z mikrokoków nie wycinają bowiem dimerów z DNA. Aktywność nukleazową w stosunku do DNA zawierającego dimer wykazuje ekstrakt z *M. lysodeikticus* (17), ściślej wspomniana wyżej frakcja B. Dimery przechodzą do frakcji kwasorozpuszczalnej tylko w następstwie kolejnego działania na napromieniony DNA frakcji A (endonukleazowej) i frakcji B. Wykazano, że enzym wycinający, wyizolowany z komórek mięsaka limfatycznego chomika chińskiego nie działa na DNA, który nie zawiera dimerów pirymidynowych (23).

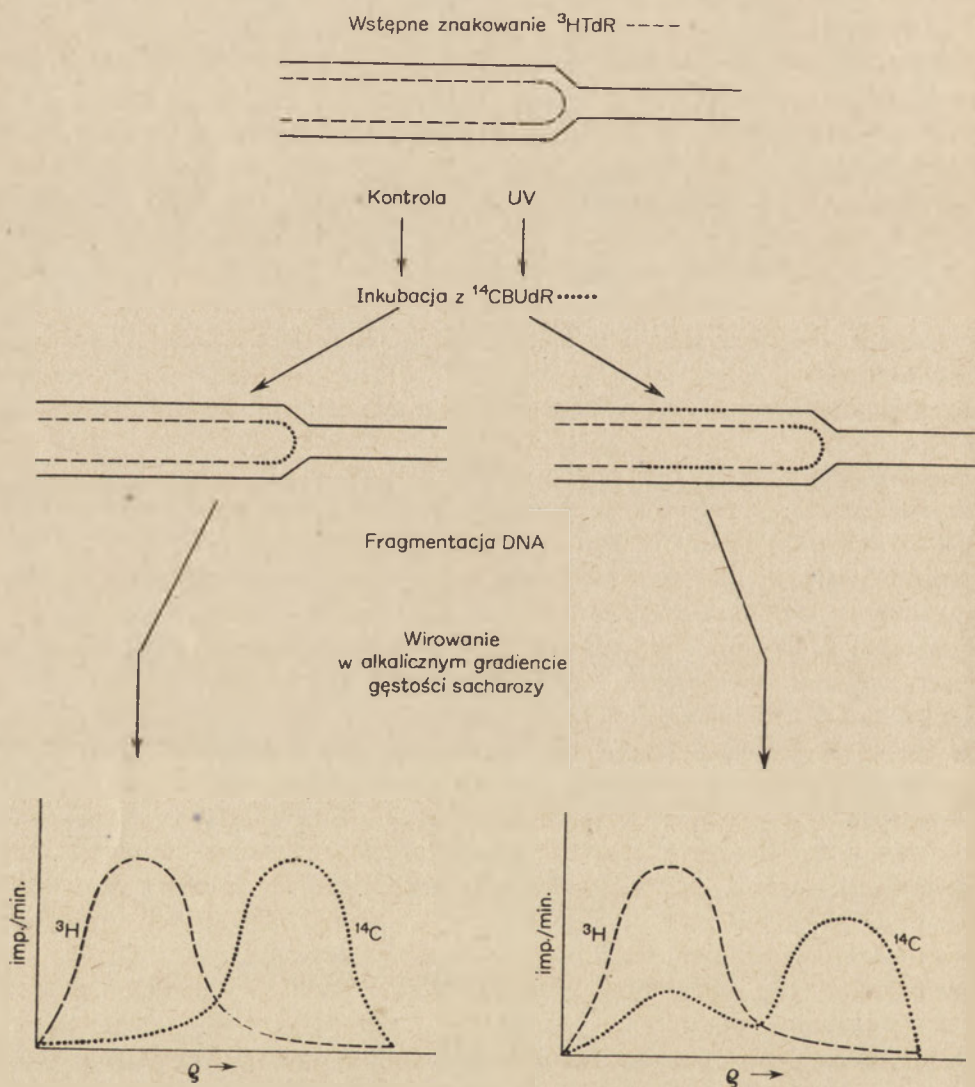
Dwuetaповość procesu wycinania dimerów potwierdzają wyniki doświadczeń, w których na te same komórki działano promieniowaniem ultrafioletowym i jonizującym (20). Komórki szczepu *E. coli* B_{S-1} γR niezdolne do wycinania dimerów usuwają je po napromienieniu promieniowaniem jonizującym. Powoduje ono między innymi powstawanie jednołańcuchowych pęknięć w DNA (24), co zastępuje w pewnym stopniu działanie enzymu nacinającego, defektywnego w tym szczepie. Pęknięcie łańcucha DNA indukuje falę degradacji dochodzącą do dimeru, który staje się w tej postaci dostępny dla enzymu wycinającego.

In vivo dimery usuwane są głównie w postaci trój- i czeronukleotydów, przy czym procesowi temu towarzyszy degradacja części łańcucha przyległej do dimeru (9, 15). Ilość nukleotydów wycięta *in vivo* na etapie degradacji zawarta jest w granicach od trzydziestu do kilkuset na jeden dimer (25), jednak *in vitro* nie przekracza na ogół pięciu. Wiele danych przemawia za udziałem I polimerazy DNA w enzymatycznej kontroli tego procesu (26). Enzym ten obok aktywności typu polimerazy posiada także aktywność egzonukleazy prowadząc hydrolityczną degradację DNA w kierunku 5' → 3' z wytworzeniem mononukleotydów i 3'-P-oligonukleotydów. Może on także uwalniać oligonukleotydy zawierające dimery pirymidynowe, jeśli w pobliżu dimeru znajduje się pęknięcie łańcucha posiadające koniec 5' w części przyległej do dimeru (27).

Nie wiadomo dotąd, co sprawia iż proces degradacji ulega zatrzymaniu. Być może decydują o tym pewne własności samej nukleazy, nie moż-

na jednak wykluczyć istnienia specjalnego mechanizmu regulacyjnego, zapobiegającego zbędnej degradacji DNA, np. polegającego na enzymatycznej modyfikacji zasad w łańcuchu DNA (11).

Bardziej prawdopodobne wydaje się drugie przypuszczenie, gdyż komórkowe ekstrakty różnych mutantów bakteryjnych, wykazujących zdolność do niejednakowo posuniętej degradacji DNA, cechuje podobna aktywność egzonukleazowa *in vitro* (28).



Ryc. 1. Schemat metody badania replikacji naprawczej, (95)

Kulturę komórkową inkubowaną w obecności $^3\text{HTdR}$ w celu wyznakowania nowosyntetyzowanego DNA dzielono na części napromieniowywaną i kontrolną. Obie części inkubowano następnie w obecności $^{14}\text{CBuUdR}$ dla wyznakowania fragmentów DNA syntetyzowanych po napromieniowaniu. Wyizolowany i poddany fragmentacji DNA wirowano w alkalicznym gradiencie gęstości sacharozy. Kontrolny DNA sedymentuje w innym paśmie niż hybryd zawierający w łańcuchu odcinki z $^{14}\text{CBuUdR}$.

Ograniczenie degradacji jest zasadniczym momentem naprawy, warunkującym syntezę naprawczą i reaktywację komórki. Nie wiadomo ponadto, czy degradacja jest w ogóle niezbędna w procesie naprawy DNA.

Luki powstające w łańcuchu polinukleotydowym w wyniku wycięcia oligonukleotydów zawierających dimery pirymidynowe, poszerzone następnie na etapie degradacji, zostają zabudowane nukleotydami komplementarnymi do fragmentów nieuszkodzonego odcinka drugiego łańcucha.

Syntezę naprawczą poszczególnych fragmentów uszkodzonego DNA określa się mianem syntezy niesemikonserwatywnej w odróżnieniu od replikacyjnej syntezy semikonserwatywnej. Możliwe jest doświadczalne odróżnienie syntezy naprawczej od semikonserwatywnej syntezy DNA, m.in. dzięki metodzie wirowania znakowanego DNA w gradiencie gęstości CsCl (Ryc. 1).

Dzięki tej metodzie oceniono, iż podczas syntezy naprawczej, w odpowiedzi na wcześniejsze usunięcie jednego dimeru (9), wbudowywane jest do DNA ok. 50 nukleotydów. Potwierdza to raz jeszcze istnienie poprzedzającego ten etap procesu degradacji uszkodzonych fragmentów DNA.

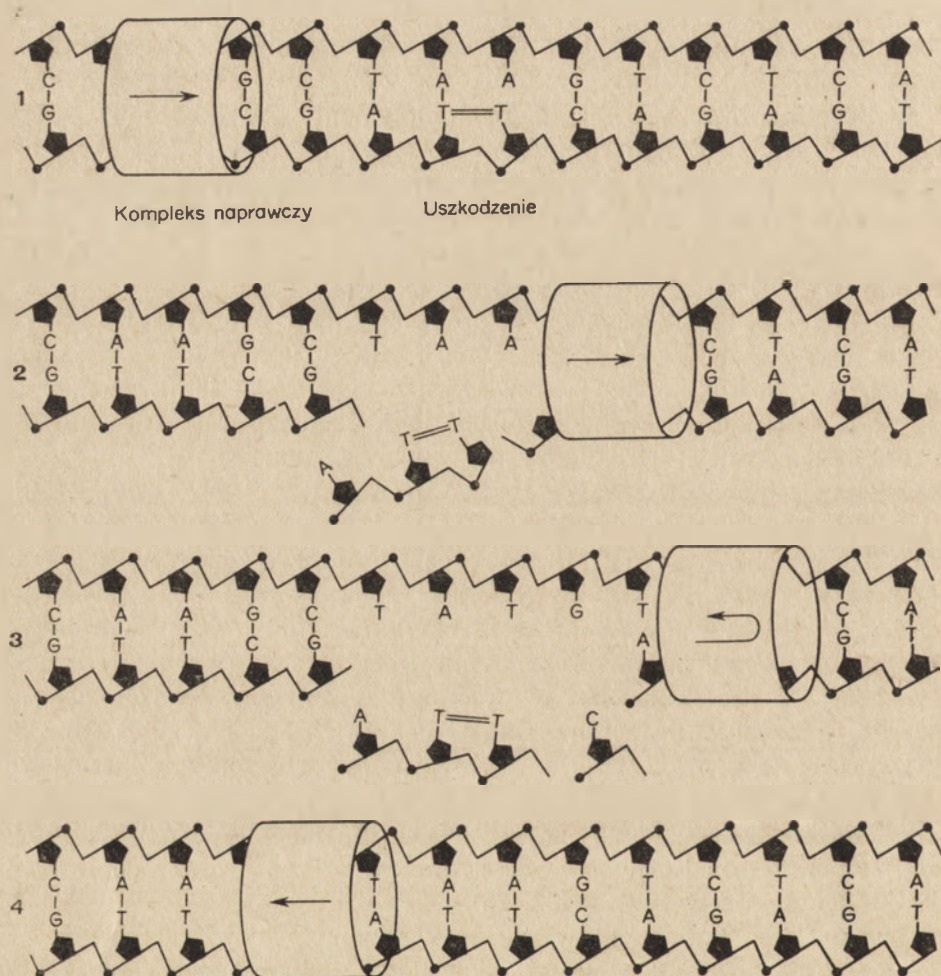
Polimeraza DNA katalizująca proces syntezy naprawczej różni się od polimerazy odpowiedzialnej za replikacyjną syntezę DNA. Nie hamują jej na przykład inhibitory replikacji: 10^{-3} – 10^{-2} M hydroksymocznik, kofeina (30), ani puromycyna (31). Być może polimerazą naprawczą jest tzw. polimeraza Kornberga, wykazująca, jak już wspomniano również własności egzonukleazowe. Polimeraza ta mogłaby katalizować dwa następujące po sobie etapy naprawy: wycinanie i resyntezę.

Udział I polimerazy DNA w procesie naprawy przez wycinanie potwierdzają badania mutantów pol A, charakteryzujących się obniżoną aktywnością tego enzymu (0,5–1% normalnego poziomu). Mutanty te, przy niezmienionej zdolności do podziału i replikacji materiału genetycznego, wykazują zwiększoną wrażliwość na działanie UV. Wnioskuje się stąd, że polimeraza Kornberga jest istotna raczej dla syntezy naprawczej niż dla semikonserwatywnej (32, 33).

W ostatnim etapie naprawy przez wycinanie ma miejsce połączenie końców —5'P i —3'OH nowoodbudowanego odcinka i pozostałej części naprawionego łańcucha. Proces ten zachodzi prawdopodobnie przy udziale ligazy polinukleotydowej obecnej w ekstrakcie *E. coli* (34). Enzym ten naprawia też część jednołańcuchowych pęknięć DNA spowodowanych przez promieniowanie X. Za udziałem ligazy polinukleotydowej w procesie naprawy przemawia wzrost wrażliwości na promieniowanie mutantów bakteryjnych wykazujących obniżoną aktywność tego enzymu (35).

Dla wyjaśnienia szczegółowej sekwencji etapów naprawy przez wycinanie zaproponowano dwa prawdopodobne modele: wycinanie i zastępowanie (ang. *cut and patch*) oraz zastępowanie i wycinanie (ang. *patch and cut*) (36).

Model wycinania i zastępowania omówiony w szczegółach powyżej postuluje, że enzym wycinający krótkie segmenty nukleotydowe z jednego łańcucha, pozostawia luki, które powiększone w wyniku degradacji, są następnie zabudowywane (Ryc. 2).

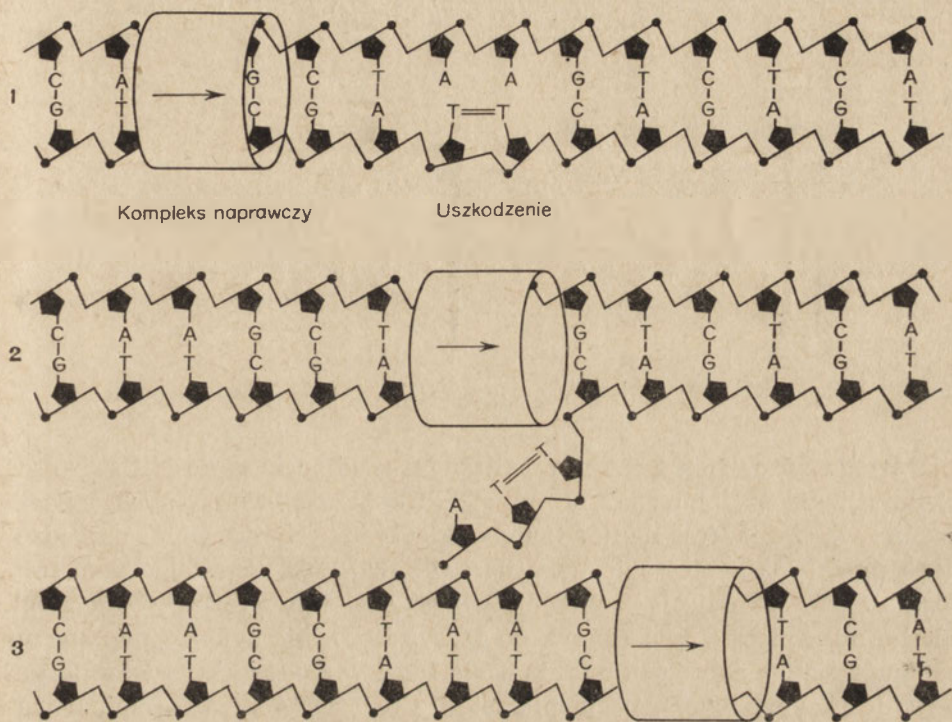


Ryc. 2. Mechanizm wycinania i zastępowania w naprawie przez wycinanie (16)

- 1) Dimery tyminowe jako defekt podlegający naprawie;
- 2) i 3) Usuwanie dimeru przez kompleks enzymatyczny;
- 4) Replikacja naprawcza.

W modelu zastępowania i wycinania zakłada się, że proces naprawy zaczyna się od pojedynczych nacięć łańcucha DNA w pobliżu uszkodzenia. Bezpośrednio w miejscu nacięcia rozpoczyna się replikacja naprawcza, której towarzyszy złuszczenie (ang. *peeling back*) uszkodzonego odcinka w miarę, jak wbudowywane są nukleotydy o prawidłowej sekwencji (Ryc. 3).

Naprawa zachodząca według tego schematu mogłaby przebiegać pod działaniem jednego kompleksu enzymatycznego przesuującego się wzdłuż łańcucha DNA i nie towarzyszyło by jej powstawanie długich jednołańcuchowych fragmentów cząsteczki DNA.



Ryc. 3. Mechanizm zastępowania i wycinania w naprawie przez wycinanie (16)

- 1) Naprawiany defekt w postaci dimeru tyminowego;
- 2) Wycięcie uszkodzonego odcinka przebiegające równocześnie z syntezą naprawczą;
- 3) Efekt naprawy.

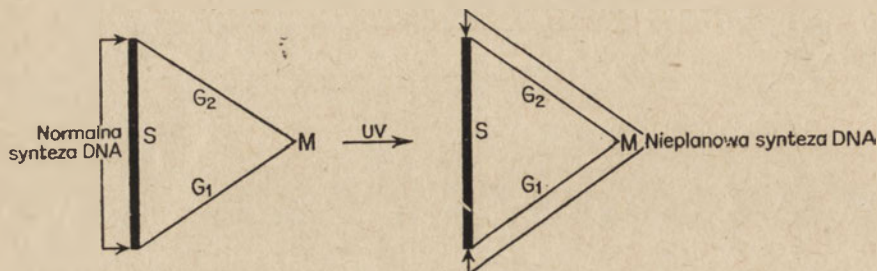
Aby zweryfikować słuszność hipotezy zastępowania i wycinania należałoby wykazać, że wycinanie *in vivo* jest niemożliwe bez jednoczesnej syntezy DNA. Tymczasem badania mutantów pol^+ i pol^- *E. coli* różniących się aktywnością I polimerazy wskazują, że wydajność wycinania dimerów z DNA jest jednakowa w przypadku komórek obu tych szczepów.

Badania komórek ssaków eksponowanych na działanie UV wykazały zachodzenie w tych komórkach naprawy przez wycinanie, niezupełnie identycznej w szczegółach ze schematem naprawy bakteryjnej.

W komórkach chomika chińskiego nie stwierdzono wycinania dimerów (37), wykryto natomiast ten proces w kilku liniach komórek ludzkich; efektywność jego była jednak znacznie niższa niż w komórkach bakteryjnych.

Występowanie syntezy naprawczej DNA w komórkach ssaków wykazano przy zastosowaniu dwu odrębnych technik. Przy pomocy metod autoradiograficznych stwierdzono, że pod wpływem UV zachodzi włączanie znakowanego prekursora ($^3\text{HTdR}$) do DNA komórek znajdujących się w fazach G_1 i G_2 lub w stadium mitozy (38).

Proces ten odpowiada syntezie naprawczej, a nazwano go nieplanową syntezą DNA (ang. *unscheduled DNA synthesis*) (Ryc. 4).



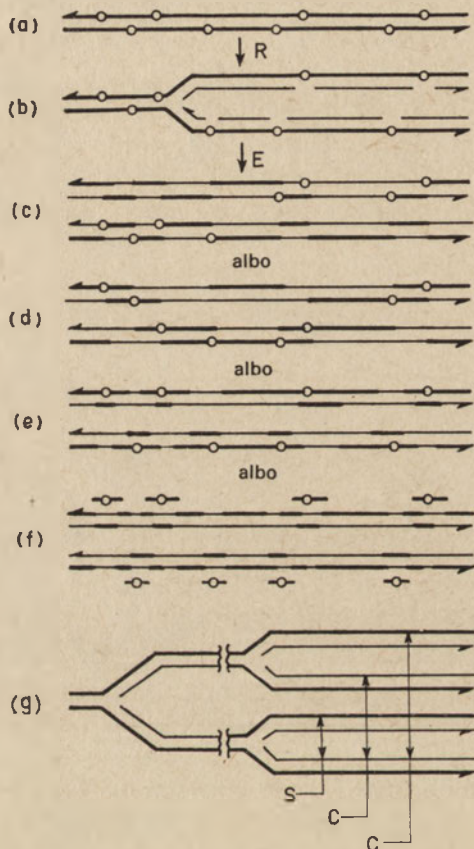
Ryc. 4. Schemat nieplanowej syntezy DNA. (wg 95, zmodyfikowane)

Metoda wirowania DNA w alkalicznym gradiencie gęstości CsCl (Ryc. 1) umożliwiła, podobnie jak w przypadku komórek bakteryjnych, stwierdzenie włączania fragmentów oligonukleotydowych do DNA uszkodzonego przez promieniowanie ultrafioletowe (39). Dla określenia tego procesu używa się pojęcia replikacji naprawczej (ang. *repair replication*). Liczbę nukleotydów włączanych do DNA w procesie syntezy naprawczej badano stosując popromienną inkubację DNA w środowisku zawierającym 5-Br-dezoksyurydynę, a następnie fotolizę tego DNA przez promieniowanie o długości fali 313nm. W miejscach włączenia do polinukleotydu 5-Br-dezoksyurydyny w procesie replikacji naprawczej następuje wtedy przerwanie łańcucha polinukleotydowego; liczbę tych pęknięć można ocenić poprzez określenie długości pozostałych odcinków, wirując DNA w gradiencie gęstości sacharozy. Tak obliczona przeciętna długość wbudowanego odcinka wynosi ok. 80 nukleotydów (40, 41). Wydajność nieplanowej syntezy DNA jest różna w różnych komórkach, np. w przypadku komórek mysich linii L jest znacznie niższa aniżeli w liniach komórek ludzkich (38).

I-3. Naprawa poreplikacyjna (rekombinacyjna)

Wyniki badań Rupp'a i Howard-Flandersa nad promienioczułym mutantem *E. coli* K-12 *uvr 6* niezdolnym do wycinania dimerów (42) wykazały możliwość jeszcze innego mechanizmu naprawy uszkodzeń DNA. DNA komórek szczepu K-12 *uvr 6* poddanych działaniu UV może

ulegać replikacji, lecz DNA potomne wykazuje w początkowym okresie fragmentację, przy czym liczba fragmentów cząsteczki odpowiada liczbie dimerów powstałych w macierzystym DNA. Po 90 minutach od napromienienia stwierdza się już obecność DNA o masie cząsteczkowej właściwej dla DNA komórek nienapromienionych, nie zawierających dimerów pirymidynowych (43). U podstaw tych procesów leży naprawa rekombinacyjna, zależna od genu *rec A*.



Ryc. 5. Hipotetyczne struktury DNA powstające w efekcie naprawy rekombinacyjnej (43)

Cienkimi liniami oznaczono łańcuchy syntetyzowane po napromienieniu. Kółka symbolizują dimery pirymidynowe. R — replikacja, E — wymiana rekombinacyjna, S — wymiana między siostrzanymi nićmi, C — wymiany między niesiostrzanymi nićmi. Dalsze objaśnienia w tekście.

Rycina 5 pokazuje kilka struktur DNA, które mogą powstać w efekcie wymiany rekombinacyjnej pomiędzy siostrzanymi nićmi DNA. Rycina 5c przedstawia strukturę powstającą w wyniku rozerwania, a następnie połączenia obu łańcuchów każdej z podwójnej nici powstających w wyniku replikacji napromienionej cząsteczki DNA. Postuluje się, że

proces ten ma miejsce w przypadku niektórych form *crossing-over*. Rycina 5d obrazuje strukturę tworzącą się wtedy, gdy wymianie ulega jeden łańcuch nici, a wymiana łańcuchów zachodzi aż do następnego dimeru; rycina 5e zaś ilustruje strukturę powstającą wówczas, gdy taka wymiana dotyczy odcinków o ograniczonej długości; w obu tych wypadkach łańcuch przeciwny do dimeru ulega wymianie rekombinacyjnej. W sytuacji pokazanej na rycinie 5f dimery ulegają usunięciu z łańcucha DNA podczas rekombinacji, lecz znajdują się w łańcuchach polinukleotydowych wystarczająco długich, by pozostać we frakcji kwasonierozpuszczalnej. Rycina 5g przedstawia możliwości wymiany rekombinacyjnej w komórce o bardziej skomplikowanych zależnościach replikacyjnych.

Model 5e tłumaczy najlepiej istniejące dane eksperymentalne.

Naprawa rekombinacyjna jest bardziej złożona, niż naprawa przez wycinanie i mniej od niej efektywna. Może ona usunąć z chromosomu bakteryjnego jedynie 50-100 dimerów podczas, gdy naprawa przez wycinanie nawet kilka tysięcy.

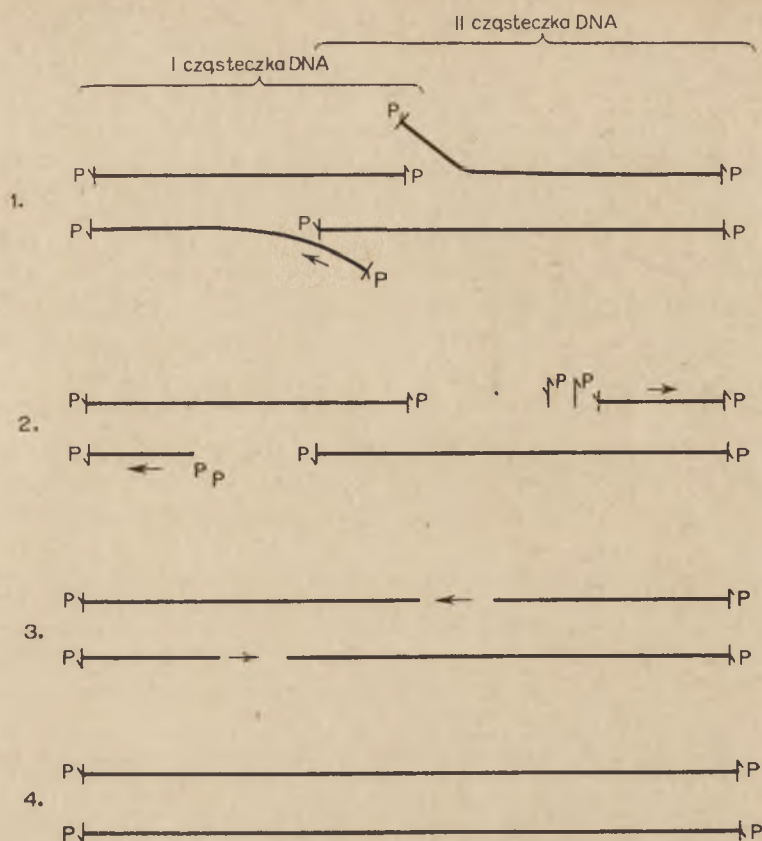
Masa cząsteczkowa wymienionych łańcuchów polinukleotydowych może być większa niż 5×10^5 daltonów (43).

Naprawę rekombinacyjną obserwowano w komórkach ssaków: chomika chińskiego (45) i mysich (46). Istnieją dane wskazujące na to, że w napromienionych komórkach mysich linii L potomny DNA nie posiada przerw, lecz jego synteza ulega przejściowemu zahamowaniu gdy enzym replikujący natrafia na dimer pirymidynowy. Jednakże w komórkach tej samej linii stwierdzono również fragmentaryzację DNA (47).

Fakt, że w wielu napromienionych komórkach ssaków nie stwierdzono wycinania dimerów pirymidynowych może wskazywać na doniosłą rolę naprawy poreplikacyjnej w usuwaniu powodowanych przez UV uszkodzeń DNA w tych komórkach (44).

Udział rekombinacji w naprawie poreplikacyjnej jest ważną, ale nie jedyną koncepcją o związku pomiędzy rekombinacją a naprawą DNA (Ryc. 6). Na istnienie tego związku wskazują badania nad mutantami *E. coli* K-12. Mutanty *rec*⁻ (niezdolne do rekombinacji) są bardzo wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego, UV i innych mutagenów. Po inkubacji w warunkach optymalnych dla przebiegu naprawy wykazują one trzydziestokrotnie więcej indukowanych przez promieniowanie jonizujące pęknięć w łańcuchach DNA, niż kontrolne komórki macierzyste. Podwójne mutanty *uvr*⁻ *rec*⁻ są piętnastokrotnie bardziej wrażliwe na UV niż mutanty *rec*⁻, mutanty *uvr* zaś czterystokrotnie bardziej odporne niż *uvr*⁻ *rec*⁻ (28).

Niektóre etapy rekombinacji i naprawy przez wycinanie mogą być katalizowane przez te same enzymy, np. przez ligazę polinukleotydową (48). Enzym ten uczestniczący w procesach replikacji i rekombinacji, prawdopodobnie bierze też udział w mechanizmach naprawczych.



Ryc. 6. Mechanizm rekombinacji pomiędzy cząsteczkami DNA (18)

- 1) Łańcuchy sparowane i pojedyncze z 5'-końcowymi „zakładkami”,
- 2) Egzonukleazowa degradacja końców 3’.
- 3) Wbudowywanie przez polimerazę DNA nukleotydów komplementarnych do znajdujących się w łańcuchach przeciwnych.
- 4) Połączenie odcinków łańcuchów polinukleotydowych.

I-4. Inne mechanizmy naprawy

Kielkujące zarodniki (spory) *Bacillus subtilis* wykazują 2 mechanizmy naprawy: przez wycinanie, funkcjonujący podczas niezakłóconego kiełkowania, oraz tzw. swoisty sporowy mechanizm naprawy (ang. *spore repair mechanism*) działający w warunkach, które ograniczają wzrost kiełkujących spor. Za ten drugi typ naprawy odpowiedzialny jest gen *ssp₁* (49, 50).

Odrębny problem stanowi naprawa wirusowego DNA. U bakteriofagów stwierdzono kilka możliwych typów naprawy, m.in. reaktywację liczebnościową, reaktywację krzyżową oraz tzw. reaktywację przez komórkę gospodarza (ang. *host cell reactivation*, Hcr), a także reaktywację v- i x-genową (51, 52). Zjawisko reaktywacji przez komórkę gospodarza

spotyka się nie tylko u bakterii, ale i w komórkach zwierzęcych, między innymi w komórkach ssaków (53, 54). Nie znamy dotąd współzależności między mechanizmami naprawy własnego DNA komórki i naprawy wirusowego DNA przez komórkę gospodarza; wiadomo jednak, że po napromienieniu UV zasadniczą rolę odgrywa naprawa przez wycinanie (53). Komórki *E. coli* B, B/r i K-12 *uvr*⁺ reaktywują napromienione nieparzyste fagi T i fagi λ ; komórki *E. coli* B_{S-1}, B_{S-1} γ R i K-12 *uvr*⁻ pozbawione są tej zdolności. Mutanty *E. coli* K-12 *rec*⁻ wycinające dimery pirymidynowe naprawiają również fagowy DNA.

Stopień wrażliwości parzystych fagów T na działanie UV zależy od posiadania genów *x* i *v*. Najbardziej wrażliwe są fagi typu *v*⁻ *x*⁻, najbardziej odporne zaś *v*⁺ *x*⁺. Gen *v* jest odpowiedzialny za syntezę endonukleazy (55), gen *x* natomiast nie jest związany z układem naprawy przez wycinanie; sugerowano funkcjonalne podobieństwo genu *x* do genu *recA* *E. coli* (56). W komórkach mutantu T₄*x*⁻ dimery pirymidynowe praktycznie nie są usuwane.

Zahamowanie naprawy DNA wirusa *Herpes simplex* przez komórki ludzkie w obecności kofeiny (nie hamującej replikacji naprawczej w innych komórkach) sugeruje istnienie jeszcze innego typu naprawy wirusowego materiału genetycznego, być może związanego z kontrolowaną przez wirusa syntezą DNA (57).

Wiadomo było od dawna, że RNA fagów nie ulega naprawie na drodze fotoreaktywacji prowadzonej przez komórkę gospodarza. Zjawisko to mogłoby być wynikiem różnic strukturalnych pomiędzy DNA i RNA, lub też małej, w porównaniu z innymi fotoproduktami, wydajności tworzenia cyklobutanowych dimerów pirymidynowych w RNA pod wpływem UV. Odpowiedź przyniosły badania układu modelowego składającego się z:

- napromienionego UV drożdżowego RNA poddanego działaniu promieniowania w warunkach, w których powstają wyłącznie dimery typu cyklobutanowego ($\lambda = 313\text{nm}$, w obecności acetofenonu),
- transformującego DNA z *H. influenzae* i
- enzymu fotoreaktywującego z *S. cerevisiae*.

Doświadczenia także wykazały, że RNA nie współzawodniczy z DNA o enzym, co potwierdza pierwszą z podanych hipotez (58).

II. Naprawa uszkodzeń DNA powodowanych przez promieniowanie jonizujące

Odkrycie, że niektóre mutanty bakteryjne, charakteryzujące się zaburzeniami procesów naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez UV, są bardzo wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego (59)

nasunęło przypuszczenie, że mechanizmy naprawy obu typów uszkodzeń DNA mogą być wzajemnie podobne. Promieniowanie jonizujące wywołuje np. taką samą jak promieniowanie UV liczbę jednołańcuchowych pęknięć w kwasie dezoksyrybonukleinowym szczepów *E. coli* B/r i B_{S-1}. Pęknięcia jednołańcuchowe DNA mogą być następnie naprawione przez szczepy promieniooporne (60).

Ze snuciem analogii należy być jednak ostrożnym, izolowano bowiem szczepy bakteryjne (np. *H. influenzae* DB117) zdolne do naprawy defektów DNA powodowanych przez UV, lecz nie mogące naprawiać pęknięć powstałych pod działaniem promieniowania X (9).

Na podstawie badań kinetycznych sugeruje się, że w komórkach *E. coli* istnieją 3 typy procesów naprawy jednołańcuchowych pęknięć DNA (61).

Pierwszy typ naprawy, najszybszy, zachodzi w czasie kilku sekund w temperaturze 0°C. Ten krótki czas wystarcza, by rozerwane fragmenty łańcucha powstałe w warunkach beztlenowych uległy wtórnemu powiązaniu, co wymaga jedynie obecności ligazy polinukleotydowej (62, 63). Badania *in vitro* wykazały, że ok. 40% pęknięć jednołańcuchowych powstałych w DNA napromienionym w warunkach beztlenowych może być naprawione właśnie przez ligazę polinukleotydową, przy czym połączeniu ulegają nie tylko pęknięcia -3'OH i 5'P-, lecz również -3'P i 5'OH- (64).

Naprawa drugiego typu stosunkowo szybka, przebiega w czasie kilku minut w temperaturze pokojowej i wymaga między innymi obecności I polimerazy DNA, jest bowiem ledwie wykrywalna u mutantów pol A⁻.

Naprawa trzeciego typu, powolna, trwająca 30—60 minut w temperaturze 37°C, prawdopodobnie zatem najbardziej skomplikowana, wiąże się z rekombinacją genetyczną i nie występuje w komórkach mutantów recA *E. coli*.

Obecność tlenu modyfikuje pęknięcia jednołańcuchowe tak, że nie mogą one ulegać prostej naprawie pierwszego typu.

Naprawa drugiego typu odpowiada zapewne naprawie przez wycinanie, niekiedy nieco zmodyfikowanej (np. brak etapu nacinania) i prawdopodobnie może powodować usuwanie również innych uszkodzeń DNA (wiązania poprzeczne, uszkodzenia zasad itp.) (65).

Badania komórek ssaków w większości przypadków nie wykazują typowej dla bakterii degradacji naprawczej (24, 66). Być może w komórkach ssaków proces degradacji nie występuje, lub też jego zakres jest ograniczony (66). Porównania teoretycznie wyliczonych dla poszczególnych dawek promieniowania ilości jednołańcuchowych pęknięć w DNA komórek mysich linii L i eksperymentalnie wyznaczonej ilości znakowanych zasad włączonych po napromienieniu do tego DNA wykazują, że na jedno łańcuchowe pęknięcie włączeniu ulega średnio 2,5 cząsteczki zasady.

Minimalne dawki promieniowania rentgenowskiego, po których obserwowano replikację naprawczą w komórkach ssaków są bardzo różni-

cowane, zależnie od obiektu. W przypadku komórek P388 F potrzebne jest napromienienie dawką rzędu 150 radów promieniowania X, w przypadku komórek L dawką 250 radów, w przypadku zaś komórek HeLa dawką 50 radów (67).

Tabela 1

Wrażliwość różnych komórek i wirusów na działanie promieniowania (52)

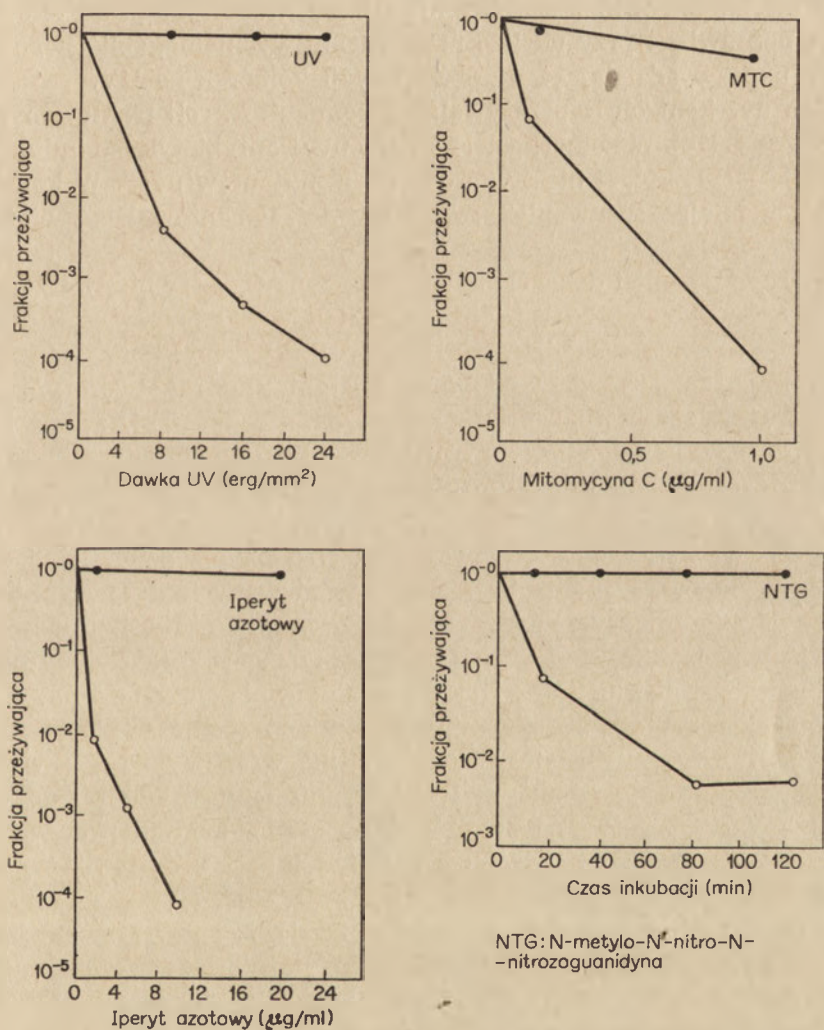
	UV		Promieniowanie jonizujące	
	Kryterium	Dawka (erg/mm ²)	Kryterium	Dawka (krad)
Fag λ XI74 (z jednołańcuchowym DNA)	DL ₉₀	90	D ₀	380
Fag T ₂ (z dwułańcuchowym DNA)	"	65	"	40—52
Wirus opryszczki			"	6,2
<i>Micrococcus radiodurans</i>	DL ₉₀	8—16 × 10 ³	DL ₉₀	1000
	D ₀	6000		
<i>E. coli</i> B/r		308	"	10
<i>E. coli</i> B _{s-1}	"	4	"	3,6
<i>Pseudomonas seruginosa</i>	"	180—360	"	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :				
formy haploidalne	"	840	"	5—10
formy diploidalne	"	3000	"	50—70
<i>Sedum tricarpum</i>			DL ₅₀	75
<i>Amoeba proteus</i>	DL ₅₀	2,2 × 10 ³	"	120
<i>Paramaecium caudatum</i>	"	5,5 × 10 ³	"	340—380
<i>Tetrahymens pyriformis</i>	"	7,8 × 10 ³	"	120—480
Komórki HeLa	"	3,0 × 10 ²	D ₀	0,09—0,18
	D ₀	108		
Komórki L	"	4,2 × 10 ²	"	0,03—0,24
Komórki chomika chińskiego	"	1—2,7 × 10 ²	"	0,12—0,20

Komórki jednego z najbardziej radioopornych gatunków bakterii *M. radiodurans* (Tabela 1) (68) są zdolne do naprawy dwułańcuchowych pęknięć DNA, co wiąże się zapewne z charakterem wielopunktowego przyczepu chromosomu do błony komórkowej (69). Pęknięcia dwułańcuchowe mogą być naprawione również w komórkach ssaków (70).

I na koniec, badania nad mutantami *M. radiodurans* UV17 i UV38 — stosunkowo wrażliwymi na działanie promieniowania X i UV a opornymi na działanie cząstek α — dają podstawy do przypuszczeń że defekty DNA powodowane przez promieniowanie o dużej gęstości jonizacji mogą być usuwane przez mechanizm naprawczy odmienny od dotąd omówionych (9).

III. Naprawa uszkodzeń DNA wywołanych przez niektóre czynniki chemiczne

Podobnie jak w przypadku wspomnianej korelacji efektów promieniowania jonizującego i ultrafioletowego istnieje także zależność między opornością komórek na działanie UV i radiomimetyków. Szczepy *E. coli* *uvr*⁻ są, w porównaniu ze szczepami *uvr*⁺, bardziej wrażliwe na działanie iperytu azotowego, mitomycyny i N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyny (23, 28, 71). Obserwacje te potwierdzono także dla *E. coli* B_{S-1} (71, Ryc. 7) porównując go ze szczepem B/r.



Ryc. 7. Krzywa przeżycia szczepów *E. coli* B/r i B_{S-1} eksponowanych na działanie UV i czynników chemicznych (28)

○—○ *E. coli* B_{S-1}
●—● *E. coli* B/r.

W przypadku szczepu B/r zwraca uwagę zbliżona oporność komórek na UV, mitomycynę C, iperyt azotowy i N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidynę, a naprawa uszkodzeń DNA przebiega na drodze ich wycinania (72). Na przykład w przypadku komórek szczepu *E. coli* B/r traktowanych iperytem siarkowym (dwufunkcyjny czynnik alkilujący), zauważono usuwanie produktu alkilowania zawierającego dwie reszty guanilowe i resztę siarczanową.

Zjawiska tego nie stwierdza się w komórkach szczepu B_{s-1} (13).

Usuwanie z DNA znakowanych produktów stwierdzono także w komórkach HeLa traktowanych iperytem siarkowym zawierającym ³⁵S (73). Sugeruje to, że również uszkodzenia DNA powodowane przez te substancje są naprawiane przy udziale mechanizmu wycinania, zbliżonego do systemu naprawy działającego po ekspozycji komórek na UV.

Gen *uvr* kontroluje przeżywalność komórek *E. coli* traktowanych mitomycyną C (74). W komórkach szczepów *uvr*⁺ antybiotyk ten indukuje degradację DNA, której nie stwierdza się u mutantów *uvr*⁻. W komórkach *uvr*⁺ ma miejsce usuwanie uszkodzonych fragmentów DNA w następstwie działania jednofunkcyjnych pochodnych mitomycyny C takich jak 7-metoksymitozyna i dekarbamoilomitomycyna C, które nie tworzą wiązań międzylańcuchowych ze względu na zablokowanie jednej z grup alkilujących. Proces ten zachodzi również po potraktowaniu komórek szczepów *uvr*⁺ innymi związkami o podobnym działaniu, np. rakotwórczym N-acetoksy-2-acetyloaminofluorenem (40). Są dane sugerujące, że mechanizm naprawy przez wycinanie (75) usuwa również uszkodzenia spowodowane przez wiązanie jednofunkcyjnych pochodnych mitomycyny.

Naprawa uszkodzeń DNA powodowanych przez wspomniane czynniki chemiczne wymaga dalszych wyjaśnień. Nie ma np. pewności, jaka jest kolejność etapów wycinania uszkodzeń powodowanych przez czynniki tworzące wiązania międzylańcuchowe w DNA. W przypadku naprawy zachodzącej równocześnie i naprzeciwko w obu łańcuchach musiałoby nastąpić przerwanie cząsteczki DNA. Nie wiadomo również, czy ta sama endonukleaza działa na dimery pirymidynowe i poprzeczne wiązania międzylańcuchowe. Fakt, że ekstrakt z *B. subtilis* wrażliwy na UV wykazuje dużą oporność na działanie metylosiarczanu metylu (76) przemawia za odrębnością endonukleaz działających na różne modyfikowane substraty (DNA), lub też za zachodzeniem naprawy innego rodzaju niż wycinanie uszkodzeń.

Podobnie zinterpretować można obserwacje, że komórki pochodzące od osób chorych na *Xeroderma pigmentosum* nie posiadające endonukleazy aktywnej wobec dimerów pirymidynowych (str. 139) naprawiają uszkodzenia powodowane przez metylosiarczan metylu (77). Defekty DNA wywołane działaniem hydroksyloaminy (głównie pęknięcia jednołańcuchowe) ulegają usunięciu w procesie odpowiadającym naprawie poreplikacyjnej.

IV. Niektóre biologiczne implikacje enzymatycznej naprawy DNA

Kwestia biologicznej roli procesów naprawy uszkodzeń DNA wydaje się być równie interesująca co niejasna. Niepełność informacji o mechanizmie procesów, zwłaszcza zachodzących w komórkach ssaków, uniemożliwia jednolitą interpretację danych doświadczalnych. Istnieją rozbieżne opinie dotyczące relacji między nieplanową syntezą DNA a replikacją naprawczą. W komórkach HeLa wykrywano nieplanową syntezę DNA po napromienieniu dawką 5 kR promieniowania X, podczas gdy do indukcji replikacji naprawczej konieczna była dawka 50 kR (78). W komórkach mięsaka limfatycznego P388F po ekspozycji na napromieniowanie X (w zakresie dawek 150—400 radów) stwierdzono zachodzenie replikacji naprawczej i brak nieplanowej syntezy DNA (78). Na ogół uważa się jednak, że oba pojęcia odzwierciedlają ten sam proces syntezy naprawczej, a niezgodność pewnych wyników jest raczej skutkiem błędów metodycznych (38, 39, 79).

Istotnym zagadnieniem jest powiązanie danych o molekularnej naprawie DNA z danymi dotyczącymi przeżywalności napromienionych komórek, co nie zawsze jest tak łatwe, jak w przypadku mutantów *E. coli* czy bakteriofagów. Nie wykazano np. związku pomiędzy wrażliwością różnych linii komórek ssaków na działanie UV i promieniowania jonizującego a ich zdolnościami do naprawy uszkodzeń DNA (38). Jedynym wyjątkiem wydawały się być do niedawna komórki pochodzące od osób chorych na dziedziczną chorobę *Xeroderma pigmentosum* (skóra pergaminowata i barwnikowa), charakteryzujące się nadmierną wrażliwością na UV. Wrażliwość tę obrazują dane dotyczące przeżywalności komórek nabłonkowych eksponowanych na działanie UV (D_0 : 9 i 30 ergów/mm² odpowiednio dla osób chorych i zdrowych, (80)). Komórki osób cierpiących na tę chorobę nie są zdolne do usuwania dimerów pirymidynowych lub usuwają je w minimalnym stopniu (25, 81) wskutek braku, lub obniżenia aktywności, endonukleazy nacinającej (82).

Ostatnio udało się wyizolować kilka linii komórek ssaków wrażliwych na UV i charakteryzujących się równocześnie zmniejszeniem sprawności naprawy uszkodzeń DNA (83, 84). W przypadku komórek HeLa 53 oraz otrzymanych z nich wrażliwych na UV linii S-1M i S-2M wartości D_0 wynoszą odpowiednio: 87, 68 i 45 ergów/mm², zaś szybkość początkowa wycinania dimerów tyminowych w komórkach linii wrażliwych na UV wynosi ok. 20% szybkości charakterystycznej dla komórek linii wyjściowej. Komórki S-2M charakteryzują się, podobnie jak komórki osób chorych na *Xeroderma pigmentosum*, obniżoną aktywnością enzymu nacinającego lub jego całkowitym brakiem.

Dane powyższe wydają się potwierdzić pogląd, że radiooporność komórki jest wypadkową oporności biernej (zależnej od struktury komórki) i oporności czynnej (sprawności mechanizmów naprawczych).

Znamienny jest fakt działania mechanizmów naprawczych w komórkach nie poddanych wpływowi czynników uszkadzających (66, 85). Wykazano na przykład, że w normalnie rosnących komórkach linii L liczba zasad wymienianych przez mechanizm wycinający wynosi 6×10^9 μg DNA w ciągu godziny (66). Enzym fotoreaktywujący występuje także w tych częściach organizmów, które w warunkach fizjologicznych nie są ekspozowane na działanie UV (86). Dimery pirymidynowe usuwane są *in vivo* również z mitochondrialnego DNA (87).

Aktywność enzymów naprawczych niejednokrotnie zależna jest od cyklu komórkowego. I tak komórki *Saccharomyces cerevisiae* znajdujące się w stacjonarnej fazie wzrostu wykazują wyższą aktywność enzymu fotoreaktywacji niż komórki w fazie logarytmicznej (88). Intensywność naprawy przez wycinanie jest mniejsza w kompetentnych komórkach *H. influenzae* (89). Fakty te, jak też powszechność występowania mechanizmów naprawiających uszkodzenia DNA, przemawiają za ich istotną rolę w normalnym metabolizmie komórki. Być może ich ciągłe działanie gwarantuje małą liczbę spontanicznych mutacji DNA w trakcie zachodzenia takich procesów i zjawisk jak: replikacja, rekombinacja, obecność mutagenów i fluktuacje termiczne (90).

Zasadnicze znaczenie mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA sugeruje istnienie związku pomiędzy ich działaniem a procesami starzenia się, wskazuje również na perspektywy ich wykorzystania w praktyce geriatrycznej (91). Wyniki badań komórek hodowanych *in vitro* (92) zdają się jednak temu przeczyć, gdyż długość życia fibroblastów pochodzących od osób cierpiących na *Xeroderma pigmentosum* jest równa długości życia odpowiadających im komórek nie posiadających defektu naprawy DNA.

Zagadnienie naprawy uszkodzeń DNA i jej hamowania jest również ważne w radioterapii (93). Zahamowanie czy upośledzenie procesów naprawczych może bowiem mieć w pewnych wypadkach związek z powstawaniem nowotworów. Zwraca ponadto szczególną uwagę duża częstotliwość powstawania nowotworów skóry u chorych na *Xeroderma pigmentosum*. Okazało się również, że niektóre inhibitory procesów naprawy posiadają własności rakotwórcze (94).

Artykuł wpłynął 20.1.1973, po rewizji autorskiej wrócił 30.11.1973.

PIŚMIENNICTWO

1. Setlow R. B., Swenson P. A., Carrier W. L., (1963), *Science* **142**, 1464—1466.
2. Setlow R. B., Carrier W. L., Williams R. W., (1966), *Science* **152**, 676.
3. Setlow J. K., (1966), *Radiat. Res. Suppl.*, **6**, 141—155.
4. Kelner A., (1949), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **35**, 73—80.

5. Rupert C. S., (1962), *J. Gen. Physiol.*, **45**, 703—724.
6. Rupert C. S., (1962), *J. Gen. Physiol.*, **45**, 725—741.
7. Setlow J. K., Setlow R. B., (1963), *Nature* **197**, 560—562.
8. Muhammed A., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 516—523.
9. Waldsztein E. A., (1970), w *Sowremiennye problemy radiobiologii*, t. 1. Postradiacjonna reparacja, red. W. F. Paribok, Atomizdat, Moskwa, s. 25—71.
10. Proctor W. L., Cook J. S. (1972), IV IBC (IV International Biophysics Congress, Abstracts of Contributed Papers, Moscow 1972), t. 1, s. 148—149.
11. Harm H., Rupert C. S., (1968), *Mutat. Res.*, **6**, 355—370.
12. Setlow J. K., Bollum F. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 233—237.
13. Klimek M., (1965), *Neoplasma* **12**, 459—460.
14. Lytle C. D., Benane S. G., (1972), *Radiat. Res.* **51**, 527—527.
15. Setlow R. B., Carrier W. L., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 226—231.
16. Hanawalt P. C., Haynes R. H., (1967), *Sci Amer.*, **216**, (2), 36—43.
17. Nakayama H., Okubo S., Sekiguchi M., Takagi Y., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 217—223.
18. Kaplan J., Kushner S. R., Grossman L., (1971), *Biochemistry* **10**, 3315—3324.
19. Waldsztein E. A., Żestjanikow W. D., (1967), *Citologija* **9**, 3—20.
195, 489—492.
21. Taketo A., Yasuda S., Sekiguchi M., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 1—14.
22. Paribok W. P., Waldsztein E. A., Tomilin N. W., (1969), *Citologija* **11**, 93—103.
23. Caputo A., Tupi G., (1972), 9th AMESRB (9th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology, Rome 1972, Book of Abstracts, s. 27—28.
24. Lubas B., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 113—134.
25. Cleaver J. E., (1968), *Nature*, **218**, 652—655.
26. Kornberg A., (1969), *Science*, **163**, 1410—1418.
27. Kelly R. B., Atkinson M. R., Huberman I. A., Kornberg A., (1969), *Nature*, **224**, 495—500.
28. Howard-Flanders P., Boyce R. P., (1966), *Radiat. Res. Suppl.*, **6**, 156—184.
29. Couch J., Hanawalt P. C., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 779—784.
30. Evans R. G., Norman A., (1968), *Radiat. Res.*, **36**, 287—298.
31. Hand R., Tamm J., (1971), *J. Virol.*, **8**, 579—600.
32. DeLucia P., Cairns J., (1969), *Nature*, **224**, 1164—1166.
33. Gross J., Gross M., (1969), *Nature*, **224**, 1166—1167.
34. Gellert M., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 148—155.
35. Pauling C., Hamm L., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 1495—1502.
36. Haynes R. H., (1966), *Radiat. Res. Suppl.*, **6**, 231.
37. Trosko J. E., Kasschau M. R., (1967), *Photochem. Photobiol.*, **6**, 215—220.
38. Painter R. B., Cleaver J. E., (1969), *Radiat. Res.*, **37**, 451—466.
39. Resmussen R. E., Painter R. B., (1966), *J. Cell. Biol.*, **29**, 11—19.
40. Regan J. D., Setlow R. E., (1972), IV IBC, t. 1, s. 117—118.
41. Regan J. D., Setlow R. E., Ley R. D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 708—712.
42. Rupp W. D., Howard-Flanders P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 291—302.
43. Rupp W. D., Wilde E. III, Reno D. L., Howard-Flanders P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 25—44.
44. Painter R. B., (1971), *Curr. Top. Radiat. Res.*, **7**, 45—70.
45. Cleaver J. E., Thomas G. H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 203—208.

46. Lehmann A., (1972), *J. Mol. Biol.*, **66**, 319—338.
47. Fujiwara Y., Kondo T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 557—564.
48. Fodor I., (1971), *Usp. Sowl. Biol.*, **71**, 331—335.
49. Donnellan J. E., Stafford R. S., (1972), IV IBC, t. 1. s. 209—210.
50. Munakata N., Rupert C. S., (1972), IV IBC, t. 1, s. 136—137.
51. Luria S. E., Darnell J. E., (1970), *Wirusologia ogólna*, PWN, Warszawa.
52. Żestjanikow W. D., Zacharow I. A., Kożina T. N., (1970), w *Sowremiennyye problemy radiobiologii*, t. I Postradiacjonnaja reparacja, red. W. P. Paribok, Atomizdat, Moskwa, s. 105—153.
53. Lytle C. D., Aaronson S. A., Harvey E., (1972), *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 159—166.
54. Lytle C. D., Benane S. G., (1972), IV IBC, t. 1. S. 131.
55. Friedberg E. C., King J. J., (1971), *J. Bacteriol.*, **106**, 500—507.
56. Friedberg E. C., Clayton D. A., Mortelmants K., Goldman K., (1972), IV IBC, t. 1, s. 134.
57. Lytle C. D., (1972), *Inst. J. Radiat. Biol.*, **22**, 167—174.
58. Menningmann H. D., Pons F. W., (1972), 9th AM ESRB, s. 112.
59. Moseley B. E., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, **49**, 293—300.
60. McGrath R. A., Williams R. W., (1966), *Nature*, **212**, 534—535.
61. Town C. D., Smith K. C., Kaplan H. S., (1972), *Radiat. Res.* **51**, 529—530.
62. Humphrey R. M., Steward D. L., Sedita B. A., (1968), *Mutat. Res.* **6**, 459—465.
63. Ormerod M. G., Stevens U., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 72—82.
64. Jacobs A., Bopp A., Hagen U., (1972), *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 431—435.
65. Hariharan P. V., Cerutti P. A., (1972), *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 301—306.
66. Painter R. B., (1971), I EBC, t. 2, s. 123—127.
67. Painter R. B., Cleaver J. E., (1967), *Nature*, **216**, 369—370.
68. Kitayama S., Matsuyama A., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 418—422.
69. Dean C. J., Feldschreiber P., Burrell A. D., (1971), I. EBC, t. 2, s. 197—201.
70. Corry P. M., Cole A., (1972), IV IBC, t. 1, s. 211.
71. Kondo S., Ichikawa H., Kazuhiro I., Kato T., (1970), *Genetics* **66**, 187—217.
72. Friedberg E. C., (1972), *Mutat. Res.*, **15**, 113—153.
73. Crathorn A. R., Roberts J. J., (1966), *Nature* **211**, 150—153.
74. Boyce R. P., Howard-Flanders P., (1964), *Z. Vererbungslehre* **95**, 345—349.
75. Otsuji N., Murayama I., (1972), *J. Bacteriol.*, **109**, 475—483.
76. Searashi T., Strauss B., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 680—687.
77. Cleaver J. E., (1971), *Mutat. Res.*, **12**, 453—462.
78. Fox M., Fox B. W., (1971), I EBC, t. 2, s. 135—141.
79. Paribok W. P., Siemionowa E. G., (1970), *Citologija* **12**, 1423—1432.
80. Cleaver J. E., (1970), *Int. J. Radiat. Biol.*, **18**, 557—566.
81. Bootsma D., Mulder M. P., Pot F., Cohen J. A., (1970), *Mutat. Res.*, **9**, 507—516.
82. Cleaver J. E., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 428—435.
83. Cleaver J. E., (1969), *Int. J. Radiat. Biol.*, **16**, 277—286.
84. Horikawa M., Isomura K., Nikaido O., Sugahara T., (1972), *Radiat. Res.*, **51**, 522.

85. Djordjovic E., Evans R. G., Perez A. G., Weill M. K., (1969), *Nature*, **224**, 803—804.
86. Regan J. D., Cook J. S., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 2274—2279.
87. Clayton D. A., Friedberg E. C., (1972), IV IBC, t. I, s. 210—211.
88. Boling M. E., Setlow J. K., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, 502—505.
89. Setlow J. K., Boling M. E., (1972), *J. Mol. Biol.*, **63**, 349—362.
90. Rasmussen R. E., Reisner B. L., Painter R. B., (1970), *Int. J. Radiat. Biol.*, **17**, 285—290.
91. Wilenczik M. M., (1970), *Molekularnyje mechanizmy starenija*, Nauka, Moskwa, s. 136—137.
92. Goldstein S., (1971), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 730—734.
93. Gaudin D., Yielding K. L., Stabler A., Brown J., (1971), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **137**, 202—206.
94. Mouton R. F., (1971), IEBC, t. 2, s. 241—250.
95. Rauth A. M., (1970), *Curr. Top. Radiat. Res.*, **6**, 195—248.

ANNA LIPIŃSKA*, LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ**

Pierwszorzędowa struktura histonów

Primary Structure of Histones

I. Sekwencja aminokwasowa histonów

Histony, obok DNA i białek niehistonowych, stanowią główny składnik chromatyny jąder komórek wyższych roślin i zwierząt. Białka zasadowe bardzo podobne do histonów ssaków izolowano również z organizmów jednokomórkowych, np. glonów, drożdży oraz bakterii (1).

Metody frakcjonowania histonów (2) pozwoliły rozdzielić te niejednorodne białka na pięć głównych frakcji, z których trzy reprezentują histony lizynowe (F1, F2a2 i F2b) a dwie — histony argininowe (F2a1 i F3). Rozwój metod selektywnego otrzymywania pojedynczych, czystych frakcji histonowych przyczynił się do szybkiego postępu w dziedzinie poznawania ich struktury, głównie pierwszorzędowej, co z kolei ma ważne znaczenie w zrozumieniu interakcji DNA-histon.

I-1 Histon lizynowy F1

Histon lizynowy F1 wyróżnia się spośród innych frakcji histonowych nie tylko unikalnym składem aminokwasowym (stosunek Liz/Arg ≥ 10), ale również molekularną niejednorodnością oraz pewnym stopniem specyficzności tkankowej i gatunkowej. Wykazano różnice pomiędzy histonami F1 ekstrahowanymi 50% roztworem kwasu trójchlorooctowego z grasicy, gruczołów mlecznych i wątroby królika oraz wątroby kurczęcia i grasicy cielęcia (3). Różnice te dotyczyły ilości podfrakcji otrzymywanych w roz-

* Mgr, Zakład Biochemii Instytutu Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

** Prof. dr habil., Zakład Biochemii Instytutu Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki

Wykaz stosowanych skrótów: RTL-3 — frakcja 3 histonu lizynowego F1 z grasicy królika; RTL-4 — frakcja 4 histonu lizynowego F1 z grasicy królika; CTL-1 — frakcja 1 histonu lizynowego F1 z grasicy cielęcej; Ac — grupa acetylowa; Me — grupa metylowa; pCMB — p-chlorortęciobenzoesan; cAMP — cykliczny adenozynomonofosforan.

dziale tej frakcji na Amberlite IRC-50 (np. 5 podfrakcji histonu. F1 z grasicy królika i 3 podfrakcje w histonie F1 z grasicy cielęcia). Obserwowana niejednorodność wydaje się być wyrazem różnic w sekwencji aminokwasowej podfrakcji histonu F1.

Badania zmierzające w kierunku ustalenia sekwencji aminokwasowej rozpoczęto nad frakcją 3(RTL-3) uzyskaną w wyniku rozdziału histonu F1 z grasicy królika na Amberlite IRC-50. Frakcja ta zawierała 61 lizyn, 56 alanin i 22 proliny, które w sumie stanowiły 65% wszystkich reszt aminokwasowych cząsteczki. We frakcji tej natomiast brak histydy, tryptofanu i aminokwasów siarkowych (5).

Rozszczepienie histonu RTL-3 za pomocą N-bromoimidu kwasu bursztynowego i następczy rozdział produktów na żelu Sephadex G-100 dostarczył dwóch peptydów oznaczonych jako N₁ i N₂. Peptyd N₁ o masie cząsteczkowej 15 000 daltonów odpowiadał C-końcowemu, zaś peptyd N₂ (m.c. 6 000 daltonów) — N-końcowemu obszarowi histonu RTL-3 (5).

Wstępne prace B u s t i n a i wsp. (5) nad składem tych peptydów wykazały interesujące rozmieszczenie w nich pewnych aminokwasów. Peptyd N₁ cechował się przewagą lizyny, proliny i alaniny oraz wysoką wartością (ok. 6,7) stosunku aminokwasów zasadowych do kwaśnych. Stosunek ten w peptydzie N₂ wynosił zaledwie 2,8. Trawienie histonu F1(RTL-3) chymotrypsyną dostarczyło czterech peptydów (III, VI, VIIb i VIIc) (6). C-końcowa sekwencja (Liz—Liz) peptydu III oraz jego rozmiary i skład aminokwasowy odpowiadające opisanemu peptydowi N₁ wskazywały, że peptyd III reprezentował C-końcowy fragment cząsteczki RTL-3. Peptyd VI prawdopodobnie odpowiadał N-końcowej części tego białka, środkowy peptyd VIIc zawierał tyrozynę, a VIIb fenyloalaninę. Intensywne trawienie chymotrypsyną dostarczało trzynastu peptydów, które składały się na łańcuch o długości 216 aminokwasów (4).

Rozmieszczenie aminokwasów w cząsteczce histonu F1 jest wysoce niesymetryczne. Wyróżniamy w niej: 1) obszar N-końcowy kończący się w sąsiedztwie tyrozyny w pozycji 72, 2) obszar zawarty między tyroziną (poz. 72) i fenyloalaniną (poz. ok. 100) z małą ilością lizyn, całkowicie pozabawiony proliny oraz 3) fragment C-końcowy.

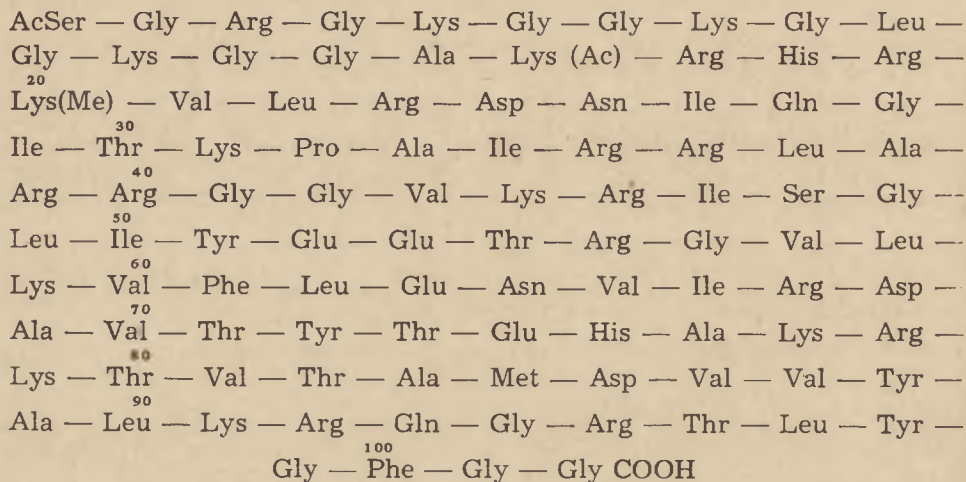
N-końcowy odcinek łańcucha polipeptydowego histonu F1 (RTL-3) także okazał się asymetryczny. N-końcowa jego część zawiera większość lizyn i wszystkie proliny. W C-końcu N-końcowego obszaru histonu RTL-3 nie ma proliny a stosunek aminokwasów zasadowych do kwaśnych równy jest jednoci.

C-końcowy fragment histonu F1 stanowi połowę cząsteczki tego białka, zawiera dużą ilość lizyn, prolin oraz charakteryzuje się stosunkiem aminokwasów zasadowych do kwaśnych równym 15.

Pierwsza kompletna sekwencja (schemat 1) 72-aminokwasowego N-końcowego peptydu N₂ uzyskanego po rozszczepieniu histonu F1 (RTL-3) grasicy królika za pomocą N-bromoimidu kwasu bursztynowego potwierdza

I-2. Histon argininowy F2a1

Histon F2a1 z grasicy cielęcia znany również jako frakcja glicynowo-argininowa był histonem, którego pełną sekwencję aminokwasową rozszyfrowano najwcześniej. Prace nad pierwszorzędową strukturą tego białka prowadzono niezależnie w laboratoriach Bonnera i Buscha. Z tych dwóch ośrodków (10, 11) pochodzi podana w 1969 r. pełna 102-aminokwasowa sekwencja najmniejszej frakcji histonowej o masie cząsteczkowej 11 300 daltonów (schemat 2).



Schemat 2. Sekwencja aminokwasowa histonu F2a1 z grasicy cielęcia (11)

Frakcję tę charakteryzuje występowanie sześciu zespołów reszt zasadowych (cztery zespoły po 2 aminokwasy zasadowe, jeden zespół 3- i jeden 5-aminokwasowy). Obszar N-końcowy tego histonu cechuje przewaga aminokwasów zasadowych. W części tej występuje zaledwie jedna reszta aminokwasu kwaśnego w porównaniu z sześcioma analogicznymi aminokwasami oraz wolną grupą -COOH w odcinku C-końcowym. Interesującą cechą sekwencji jest przewaga aminokwasów hydrofobowych w odcinku bliskim C-końca (22 reszty) w zestawieniu z ośmioma analogicznymi aminokwasami w odcinku bliskim N-końca.

W histonie F2a1 z grasicy cielęcej zidentyfikowano dwa zmodyfikowane aminokwasy, tj. ϵ -N-metylolizynę i ϵ -N-acetylolizynę. Ustalono, że są one usytuowane na krańcach pentapeptydu (pozycja 16—20 licząc od N-końca), który zawiera tylko reszty zasadowe symetrycznie rozmieszczone wokół histydyny, Lys(Ac)—Arg—His—Arg—Lys(Me).

Histon F2a1 był również pierwszym histonem, którego sekwencję porównano z homologicznym histonem z innego źródła. Podana przez De Lange'a i wsp. (12) sekwencja aminokwasów w histonie F2a1 z kielków grochu była podobna do sekwencji aminokwasowej w histonie F2a1

z grasicy cielęcej. Obydwa białka pochodzące z tak odległych filogenetycznie źródeł zawierają po 102 aminokwasy i posiadają identyczną sekwencję z wyjątkiem dwóch pozycji. W pozycji 60 w histonie F2a1 z grasicy cielęcej stwierdzono walinę, a w histonie z kielków grochu izolucynę, zaś w pozycji 77 w histonie F2a1 z grasicy cielęcej występuje lizyna, a w histonie z kielków grochu arginina. Ponadto w histonie F2a1 z grasicy cielęcej dwudziesta reszta lizynowa jest metylowana, co nie ma miejsca w homologicznym histonie z kielków grochu.

W ostatnich latach przeprowadzono szereg badań sekwencji histonów F2a1 wyizolowanych z bardzo różnorodnego materiału. Badania pierwszorzędowej struktury histonu F2a1 z grasicy wieprza (13) i chloroleukemicznego guza szczura (14) wykazały identyczność tych białek z histonami F2a1 grasicy cielęcia.

Analiza porównawcza struktury i składu aminokwasowego histonu F2a1 izolowanego z tkanek prawidłowych (grasica cielęca), embrionalnych (cielęca grasica płodowa) oraz nowotworowych (leukemiczne limfoblasty ludzkie, mięsakorak wołu oraz wątrobiak Novikoffa) wykazała również daleko idące analogie (15). We wszystkich tych histonach w obszarze N-końcowym stwierdzono występowanie sekwencji Ac—Ser—Gly—Arg oraz zespołu dwóch glicyn w C-końcowej części cząsteczki.

Identyczność sekwencji aminokwasowej histonu F2a1 z tkanek prawidłowych i nowotworowych wskazują na całkowity brak specyficzności gatunkowej oraz unikalną konserwatywność struktury pierwszorzędowej tych cząsteczek białkowych w procesie ewolucji.

I-3. Histon lizynowy F2a2

Dopiero w 1972 r. ustalono pełną sekwencję aminokwasową histonu F2a2 z grasicy cielęcej charakteryzującego się tylko nieznaczną przewagą lizyny nad arginina (inna nazwa: histon argininowo—lizynowy) (16, 17, 20).

Brak tryptycznego peptydu His—Lys w sekwencji C-końca tego histonu wskazywał na odmienną sekwencję tego obszaru postulowanej przez Sugano i wsp. (17) w porównaniu z doniesieniami Phillipsa i wsp. (18), Hayashi i wsp. (19) oraz Sautiere'a i wsp. (21). Pierwsze z nich (18) sugerowało Val—Gly—Ala—Arg—His—Lys jako C-końcowy układ, a drugie i trzecie (19, 21) — występowanie w tym histonie sekwencji: His—His—Lys. Określenie sekwencji aminokwasowej centralnego odcinka histonu F2a2 z grasicy cielęcej uzupełniło strukturę I-rzędową tego histonu (20) (schemat 3).

129-aminokwasowy łańcuch polipeptydowy histonu F2a2 charakteryzuje się obecnością pięciu zespołów aminokwasów zasadowych. Ciąg aminokwasów kwaśnych zaobserwowano w karboksylowym fragmencie cząsteczki (pozycje 90—93). Na uwagę zasługuje występowanie w tym histonie

AcSer — Gly — Arg — Gly — Lys — Gln — Gly — Gly — Lys —
¹⁰
 Ala — Arg — Ala — Lys — Ala — Lys — Thr — Arg — Ser — Ser —
²⁰
 Arg — Ala — Gly — Leu — Gln — Phe — Pro — Val — Gly — Arg —
³⁰
 Val — His — Arg — Leu — Leu — Arg — Lys — Gly — Asn — Tyr —
⁴⁰
 Ala — Glu — Arg — Val — Gly — Ala — Gly — Ala — Pro — Val —
⁵⁰
 Tyr — Leu — Ala — Ala — Val — Leu — Glu — Tyr — Leu — Thr —
⁶⁰
 Ala — Glu — Ile — Leu — Glu — Leu — Ala — Gly — Asn — Ala —
⁷⁰
 Ala — Arg — Asp — Asn — Lys — Lys — Thr — Arg — Ile — Ile —
⁸⁰
 Pro — Arg — His — Leu — Gln — Leu — Ala — Ile — Arg — Asn —
⁹⁰
 Asp — Glu — Glu — Leu — Asn — Lys — Leu — Leu — Gly —
¹⁰⁰
 Lys — Val — Thr — Ile — Ala — Gln — Gly — Gly — Val — Leu —
¹¹⁰
 Pro — Asn — Ile — Gln — Ala — Val — Leu — Leu — Pro — Lys — Lys
¹²⁰
 Thr — Glu — Ser — His — His — Lys — Ala — Lys — Gly — Lys COOH

Schemat 3. Sekwencja aminokwasowa histonu F2a2 z grasicy cielęcia (20)

28- i 18-aminokwasowych zespołów reszt aminokwasów hydrofobowych (pozycje 43—70 i 100—117) w C-końcowym obszarze histonu. Nie stwierdzono w nim żadnej modyfikacji oprócz acetylowanej N-końcowej seryny.

Analiza sekwencji N-końcowego odcinka histonu F2a2 z gruczołów jądrowych pstrąga wykazała jedną różnicę w porównaniu z homologicznym histonem z grasicy cielęcej. W pozycji 6 w histonie F2a2 z gruczołów jądrowych pstrąga stwierdzono treoninę, natomiast w analogicznym histonie z grasicy cielęcej glutaminę (22).

I-4. Histon lizynowy F2b

Już w 1966 r. zainicjowano wstępne badania (23) sekwencji aminokwasowej histonu F2b, który był pierwszą frakcją wyizolowaną w stanie dostatecznej czystości z grasicy cielęcej i innych tkanek.

Całkowitą sekwencję aminokwasową w histonie F2b z grasicy cielęcej rozszyfrowały niezależnie dwie grupy badaczy pod kierunkiem I w a i (24) oraz Hnilicy (25) w wyniku analizy peptydów tryptycznych, chymotryptycznych i termolitycznych, (schemat 4).

Histon F2b jest 125-aminokwasowym N-prolinowym histonem o masie cząsteczkowej 13 774 daltonów. Charakteryzuje się on brakiem zmodyfikowanych reszt aminokwasowych. Zawiera siedem zespołów aminokwasów zasadowych (w tym sześć par i jeden zespół pięcioaminokwasowy) zloka-

Pro — Gln — Pro — Ala — Lys — Ser — Ala — Pro — Ala — Pro —
 Lys — Lys — Gly — Ser — Lys — Ala — Val — Thr — Lys — Lys —
 Ala — Gln — Lys — Lys — Asp — Gly — Lys — Lys — Arg — Lys —
 Arg — Ser — Arg — Lys — Glu — Ser — Tyr — Ser — Val — Tyr —
 Val — Tyr — Lys — Val — Leu — Lys — Gln — Val — His — Pro —
 Asp — Thr — Gly — Ile — Ser — Ser — Lys — Ala — Met — Gly —
 Ile — Met — Asn — Ser — Phe — Val — Asn — Asp — Ile — Phe —
 Glu — Arg — Ile — Ala — Gly — Glu — Ala — Ser — Arg — Leu —
 Ala — His — Tyr — Asn — Lys — Arg — Ser — Thr — Ile — Thr —
 Ser — Arg — Glu — Ile — Gln — Thr — Ala — Val — Arg — Leu —
 Leu — Leu — Pro — Gly — Glu — Leu — Ala — Lys — His — Ala —
 Val — Ser — Glu — Gly — Thr — Lys — Ala — Val — Thr — Lys —
 Tyr — Thr — Ser — Ser — Lys — COOH.

Schemat 4. Sekwencja aminokwasowa histonu F2b z grasicy cielęcia (24)

lizowanych głównie w N-końcowej części tego histonu. Z ogólnej liczby sześciu prolin w cząsteczce, cztery proliny występują w obszarze tym wśród pierwszych dziesięciu reszt aminokwasowych. Obszar ten zawiera najmniejszą ilość aminokwasów hydrofobowych i hydroksyaminokwasów oraz zaledwie jedną resztę aminokwasu kwaśnego. Obszar środkowy histonu F2b jest bogaty w reszty aminokwasów kwaśnych i hydrofobowych. Zaobserwowano w nim 14-aminokwasowy ciąg reszt aminokwasów hydrofobowych (pozycje 58—71), zawierający po dwie metioniny i fenyloalany oraz ośmioaminokwasowy zespół (pozycje 35—42), zawierający trzy reszty tyrozyny z pięciu występujących w całej cząsteczce histonu F2b. Fragment C-końcowy histonu F2b posiada największą ilość hydroksyaminokwasów i reszt hydrofobowych (24, 25).

Stwierdzono różnice w sekwencjach aminokwasowych N-końcowych części histonu F2b otrzymanego z gruczołów jądrowych pstrąga (26) i grasicy cielęcia (24). W histonie F2b z grasicy cielęcej sekwencja reszt w pozycjach 7—10 jest: Ala—Pro—Ala—Pro, podczas gdy w tym samym histonie wyodrębnionym z gruczołów jądrowych pstrąga jedna para Ala—Pro ulega delecji. Sekwencja kolejnych aminokwasów jest podobna, ale reszta w pozycji 19 w histonie F2b z gruczołów jądrowych pstrąga wydaje się być seryną lub treoniną, a nie alaniną jak w histonie grasiczym. Układ aminokwasów po tej reszcie jest wówczas Ala—Gly—Lys w F2b z gruczołów jądrowych pstrąga i Glu—Lys—Lys w histonie F2b z grasicy cielęcej (schemat 5).

¹ A Pro — ² Gln — ³ Pro — ⁴ Ala — ⁵ Lys — ⁶ Ser — ⁷ Ala — ⁸ Pro
 B Pro — Glx — Pro — Ala — Lys — Ser — Ala — Pro
 A Ala — ⁹ Pro — ¹⁰ Lys — ¹¹ Lys — ¹² Gly — ¹³ Ser — ¹⁴ Lys — ¹⁵ Ala — Val
 B $\square$ — $\square$ — Lys — Lys — Gly — Ser — Lys — Lys — Ala
 A ¹⁶ Thr — ¹⁷ Lys — ¹⁸ Lys — ¹⁹ Ala — ²⁰ Gln — ²¹ Lys — ²² Lys
 B Val — Thr — Lys — ^{Ser}_{Thr} — Ala — Gly — Lys

Schemat 5. Porównanie sekwencji N-końcowego obszaru histonu F2b z grasicy cielęcia — A (24) oraz z gruczołów jądrowych pstrąga — B (26)

a) pozycja 2: Glu lub Gln

b) $\square$ — $\square$ — delecja pary Ala-Pro w histonie F2b z gruczołów jądrowych pstrąga (szczegóły w tekście)

c) pozycja 19: seryna lub treonina.

I-5. Histon argininowy F3

Prace nad strukturą pierwszorzędową jedyne go histonu zawierającego cysteinę, tj. histonu F3 łączą się z nazwiskiem De Lange'a (27) z pracowni Bonnera. Już we wstępnych badaniach tryptycznych peptydów histonu F3 z grasicy cielęcia (po uprzedniej reakcji z N-etyloimidem kwasu maleinowego) ustalił on, że N-końcowym aminokwasem w tym histonie jest alanina (27). Alanina okazała się również C-końcowym aminokwasem 20-aminokwasowego fragmentu pochodzącego z C-końcowego obszaru cząsteczki.

Ala — Arg — Thr — Lys — Gln — Thr — Ala — Arg — Lys (Me) —
¹⁰ Ser — Thr — Gly — Gly — Lys (Ac) — Ala — Pro — Arg — Lys —
²⁰ Gln — Leu — Ala — Thr — Lys (Ac) — Ala — Ala — Arg — Lys (Me) —
³⁰ Ser — Ala — Pro — Ala — Thr — Gly — Gly — Val — Lys — Lys —
⁴⁰ Pro — His — Arg — Tyr — Arg — Pro — Gly — Thr — Val — Ala —
⁵⁰ Leu — Arg — Glu — Ile — Arg — Arg — Tyr — Gln — Lys — Ser —
⁶⁰ Thr — Glu — Leu — Leu — Ile — Arg — Lys — Leu — Pro — Phe —
⁷⁰ Gln — Arg — Leu — Val — Arg — Glu — Ile — Ala — Gln — Asp —
⁸⁰ Phe — Lys — Thr — Asp — Leu — Arg — Phe — Gln — Ser — Ser —
⁹⁰ Ala — Val — Met — Ala — Leu — Gln — Glu — Ala — Cys — Glu —
¹⁰⁰ Ala — Tyr — Leu — Val — Gly — Leu — Phe — Glu — Asp — Thr —
¹¹⁰ Asn — Leu — Cys — Ala — Ile — His — Ala — Lys — Arg — Val —
¹²⁰ Thr — Ile — Met —
 Pro — Lys — Asp — Ile — Gln — Leu — Ala — Arg — Arg — Ile —
¹³⁵ Arg — Gly — Glu — Arg — Ala — COOH

Schemat 6. Sekwencja aminokwasowa histonu F3 z grasicy cielęcia (29)

Chociaż Olson i wsp. (28), opublikowali kolejność 26 aminokwasów N-końcowej części histonu F3, podanie pełnej sekwencji tego histonu (schemat 6) jest zasługą De Lange'a i wsp. (29, 30, 31, 32).

Analiza peptydów otrzymanych w wyniku działania trypsyny, chymotrypsyny, bromocyjanu oraz pepsyny i termolizyny wykazała, że histon ten jest pojedynczym 135-aminokwasowym łańcuchem polipeptydowym z alaniną po obu końcach. Posiada on masę cząsteczkową 15 324 daltonów i zawiera dwie metylowane oraz dwie acetylowane reszty lizynowe. Fragment N-końcowy łańcucha polipeptydowego jest silnie zasadowy, natomiast karboksylowy obszar cząsteczki zawiera wiele reszt kwaśnych i hydrofobowych z dwudziestodzieciokwasowym zespołem nie zawierającym żadnego aminokwasu zasadowego. Występują w nim dwie cysteiny (pozycje 96 i 110) oddzielone od siebie przez 13 aminokwasów. Ich obecność sprzyja tworzeniu się mostków dwusiarczkowych wewnątrz- i międzycząsteczkowych. Histony F3 z kielków grochu i erytrocytów kaczki zawierają tylko jedną cysteinę. Spostrzeżenie Marzluffa i wsp. (33) dotyczące występowania dwóch histonów F3 z grasicy cielęcia — pierwszego zawierającego dwie cysteiny i drugiego z jedną resztą cysteiny nie zostało potwierdzone w badaniach sekwencji aminokwasowej tego histonu (32).

Analiza sekwencji histonu F3 z gruczołów jądrowych ryby *Letiobus bubalus* wykazała występowanie w pozycji 96 seryny zamiast cysteiny, stwierdzonej w homologicznym histonie z grasicy cielęcej (34), pierwszorzędowa zaś struktura N-końcowego obszaru histonu F3 z gruczołów jądrowych pstrąga (26) była całkowicie zgodna z podaną dla tego histonu z grasicy cielęcej (28, 29).

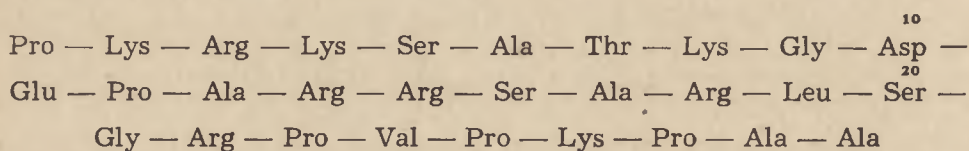
Z omówionych badań wynika, że histon F3 podobnie jak F2a1 charakteryzuje znaczna konserwatywność struktury pierwszorzędowej.

I-6. Frakcje histonowe F2c i T

Poza pięcioma opisanymi frakcjami histonowymi, typowymi dla większości organizmów eukariotycznych, stwierdzono występowanie unikalnych frakcji histonowych, a mianowicie: histonu F2c w erytrocytach jądrzystych ptaków, płazów i ryb oraz histonu T — jedynie w tkankach pstrąga (35).

Skład aminokwasowy histonu F2c (36) charakteryzował się wysoką zawartością seryny, lizyny, argininy i alaniny oraz brakiem cysteiny i tryptofanu. Badanie sekwencji peptydów tryptycznych i termolitycznych wykazało nieregularne ułożenie aminokwasów zasadowych wzdłuż łańcucha polipeptydowego tego histonu (36).

Sekwencja aminokwasowa N-końcowego fragmentu histonu T z gruczołów jądrowych pstrąga (schemat 7) dowodzi, że jest on nowym histonem, innym od dotychczas poznanych, mimo pewnego podobieństwa do pozostałych histonów z gruczołów jądrowych pstrąga, a także frakcji F1 z grasicy królika, F2c z erytrocytów kurczęcia oraz histonu F3 z grasicy cielęcej (37).



Schemat 7. Sekwencja N-końcowego obszaru histonu T z gruczołów jądrowych pstrąga (35)

II. Porównanie sekwencji aminokwasowej frakcji histonowych

Ogromne podobieństwa sekwencji aminokwasowej głównych frakcji histonowych nasuwa przypuszczenie, że w ewolucji cząsteczek białkowych histony wywodzą się ze wspólnego prapeptydu. Wydaje się prawdopodobne, że peptydem tym mógł być jakiś pentapeptyd (38).

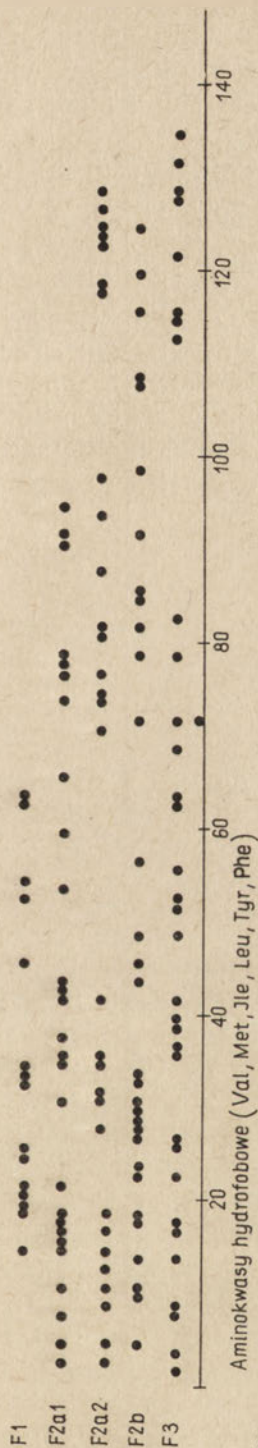
Analiza charakterystycznego, asymetrycznego ułożenia aminokwasów wzdłuż łańcucha polipeptydowego wszystkich histonów wykazała wiele analogii (Ryc. 1).

W N-końcowej części wszystkich histonów stwierdzono występowanie 10—15 aminokwasów zasadowych. Można przypuszczać, że właśnie ten obszar jest miejscem połączenia histonów z DNA. W histonie F1 są dwa zasadowe obszary (w obrębie 40 początkowych i 100 końcowych aminokwasów); cząsteczki tego histonu mogą zatem tworzyć wiązania krzyżowe między dwiema cząsteczkami DNA lub nukleohistonu, bowiem obszar C-końcowy histonu F1 jest także zdolny do wytworzenia połączenia z DNA.

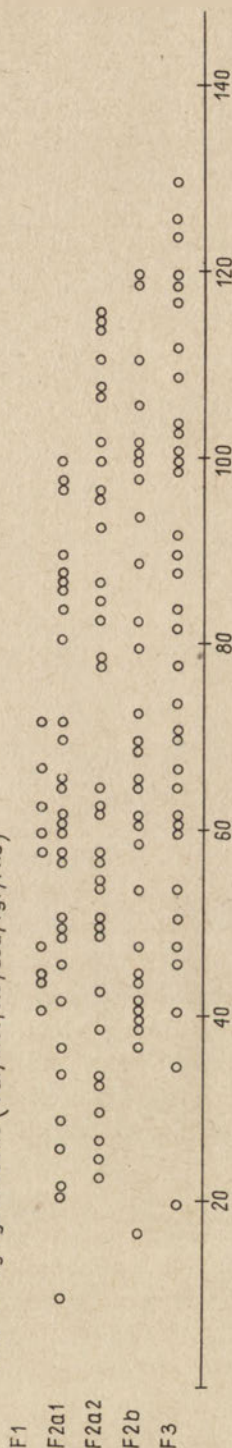
Charakterystyczne jest również występowanie we wszystkich histonach zespołów po 3 do 5 zasadowych aminokwasów, tj. w F1: Ala—Lys—Lys—Lys—Lys i Ala—Lys—Arg—Lys, w F2a1: Lys—Arg—His—Arg—Lys—, w F2a2: His—His—Lys i w F2b: Lys—Lys—Arg—Lys—Arg. Przypuszcza się, że odgrywają one rolę w wytworzeniu połączenia z DNA.

Wszystkie rodzaje histonów w swojej środkowej i C-końcowej części zawierają dużą liczbę aminokwasów hydrofobowych i hydroksyaminokwasów. W histonie F1 nie występuje żadna reszta hydrofobowa w obszarze pierwszych 40 aminokwasów, a w histonie F2b i F3 występują one w ilości 1—2 reszt. Największa ich liczba lokalizuje się w obszarze od czterdziestego do setnego aminokwasu. Charakterystyczną cechą tych fragmentów histonów jest obecność 8- lub 29-aminokwasowych ciągów reszt

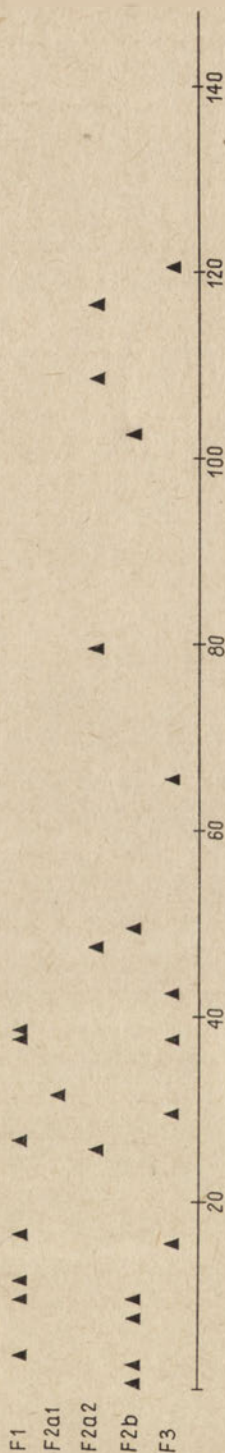
Aminokwasy zasadowe (Lis, His, Arg)



Aminokwasy hydrofobowe (Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe)



Prolina



Ryc. 1. Porównanie rozmieszczenia aminokwasów w 5 frakcjach histonowych grasy: królka (F1) oraz cielęcia (F2a1, F2a2, F2b, F3) wg Ralla i wsp. (7) z uzupełnieniem własnym.

Linia ciągła oznacza łańcuch peptydowy z numerami reszt aminokwasowych ● — pozycja aminokwasów zasadowych
■ — pozycja aminokwasów hydrofobowych △ — pozycje reszt prolina.

hydrofobowych pozbawionych aminokwasów zasadowych. Obszary te są prawdopodobnie odcinkami o strukturze α -helikalnej (reszty 60—102 w F2b, 37—54, 55—72, 73—90 w F2a1 oraz 51—100 w F1) i zapewne odgrywają rolę w interakcjach z hydrofobowymi obszarami innych białek (39, 40).

Ciekawe jest usytuowanie w histonach proliny, aminokwasu, który uniemożliwia α -helikalne zwinięcie łańcucha polipeptydowego. W histonie F1 prolina aż siedmiokrotnie występuje wśród pierwszych 40 reszt, a brak jej wśród następnych 65 aminokwasów. W innym histonie lizynowym, F2b, 4 reszty proliny są zlokalizowane wśród pierwszych 10 aminokwasów, a brak jej w zespole następnych 40 reszt aminokwasowych. W histonie F2a1 jest tylko jedna reszta proliny, zaś w F2a2 układają się one prawie symetrycznie wzdłuż całej cząsteczki, a w histonie F3 przeważają w N-końcowym jego obszarze. Analiza rozmieszczenia reszt proliny pozwala snuć przypuszczenia co do występowania struktur α -heliksu i kłębuszkowej w cząsteczkach histonów poszczególnych frakcji.

III. Modyfikacje pierwszorzędowej struktury histonów

Frakcje histonowe różnią się między sobą specyficznymi modyfikacjami struktury pierwszorzędowej.

Enzymatyczna acetylacja, metylacja i ufosforylowanie powoduje zmiany w ich ładunku elektrycznym, co może mieć zasadniczy wpływ na interakcje DNA-histon.

III-1. Acetylacja histonów

Obecność grup acetylowych w histonach stwierdzono po raz pierwszy w 1963 roku (41). Wykazano, że histony F1, F2a1 i F2a2 posiadają jako N-końcowe aminokwasy N-acetyloserynę (41, 42). Hamowanie wiązania ^{14}C -lub ^3H -octanu (43, 44) oraz ^{14}C -seryny (44) przez puromycynę (44) i cykloheksaimid (43) potwierdziło sugestię, że acetylacja N-końcowego aminokwasu związana jest z inicjacją syntezy łańcucha polipeptydowego histonu, nie jest zaś prostą modyfikacją jego gotowej cząsteczki.

Obecność N-acetyloseryny w rosnącym łańcuchu polipeptydowym cytoplazmatycznej frakcji histonowej jest argumentem na korzyść N-końcowej acetylacji, jako procesu wcześniejszego od syntezy histonów (44). W regenerującej wątrobie N-acetylo-serylo-tRNA, naturalny składnik homogenatu wątrobowego, bierze udział w zapoczątkowaniu syntezy histonów F2a1 i F2a2. Acetylacja następuje dopiero po utworzeniu serylo-tRNA.

Acetylacji ulegają nie tylko aminokwasy N-końcowe lecz również reszty lizynowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego, jak ϵ -N-acetylo-

zyna, występujące głównie w histonach argininowych F2a1 i F3 (45—48). Enzymatyczne przeniesienie grupy acetylowej z acetylokoenzymu A na histony badano w jądrach komórkowych grasicy cielęcej (49), wątroby szczura (50), mózgu szczura (51), a także w bezkomórkowych systemach enzymatycznych (53—57). Dwie acetylotransferazy o masie cząsteczkowej 80 000 i 90 000 daltonów specyficznie acetylujące histony argininowe wyizolowano z jąder komórkowych wątroby szczura (55), a trzy acetylotransferazy (A, B₁ i B₂) z jąder komórkowych grasicy szczura (56). Sugeruje się (56), że histon F3, który podobnie jak F1 i polilizyna ulegał *in vitro* acetylacji przez acetylotransferazę A, może być *in vivo* substratem tego enzymu. Acetylacja histonu F1 *in vitro* zapewne była artefaktem ponieważ zmiana konformacji histonów po odłączeniu od DNA może czynić je wrażliwymi na acetylację. Acetylowanie histonu F1 było niespodzianką, z uwagi na liczne prace dowodzące braku wewnątrzcząsteczkowych grup acetylowych w tym histonie (46, 57, 58).

Acetylotransferaza B (B₁+B₂) wykazywała specyficzność tylko w stosunku do histonu F2a1.

Badania sekwencji aminokwasowej udowodniły, że ϵ -N-acetylolizyna występuje w pozycji 16 histonu F2a1 z grasicy cielęcia (10, 11), a także w tej samej pozycji w analogicznym histonie z grasicy wieprza (13) i chloroleukemicznego guza szczura (14). Histon F2a1 z kielków grochu miał dwie zacetylowane reszty lizyny w pozycjach 16 oraz 5, 12 lub 8 (12). Ten sam histon z gruczołów jądrowych pstrąga zawierał acetylowaną lizynę w pozycjach 5, 8, 12 i 16 (59).

W histonie F3 z grasicy cielęcej acetylacji ulega lizyna w pozycjach 14 i 23 (29, 32). Analogiczny histon z gruczołów jądrowych pstrąga posiada takie same miejsca acetylacji jak grasicowy (poz. 14 i 23), a ponadto zmodyfikowane reszty lizynowe w pozycjach 9 i 18 (26).

Nie wszystkie cząsteczki histonu danej klasy zawierają grupy acetylowe przy specyficznych resztach lizyny, mogących ulegać acetylacji *in vivo*. W histonie F2a1 z grasicy cielęcej 50% cząsteczek ma acetylowaną lizynę w pozycji 16 (10, 11), w guzie chloroleukemicznym szczura — 40% (14), a w kielkach grochu — tylko 6% cząsteczek histonowych (12). W histonie F3 reszta lizyny w pozycji 14 była acetylowana w 25%, a lizyna w pozycji 23 — w 29 lub 43% (29). Ostatnio (60) wykazano również w histonie F2b grasicy cielęcej niewielką ilość acetylowanych reszt lizyny. w N-końcu cząsteczki. Fakt, że tylko 15% tego histonu ulega acetylacji wyjaśnia podawany wcześniej brak (44) lub bardzo niską zawartość (45) tak zmodyfikowanego aminokwasu w histonie F2b.

Histon F2b z gruczołów jądrowych pstrąga posiadał acetylowaną lizynę w pozycjach 3, 5, 10, 18 (26).

W histonie F2a2 z grasicy cielęcia nie stwierdzono występowania ϵ -N-acetylolizyny (20), natomiast w tym samym histonie z gruczołów jądrowych pstrąga miejscem acetylacji była lizyna w pozycji 5 (22).

Analiza sekwencji aminokwasów sąsiadujących ze zmodyfikowaną lizyną wykazała pewne prawidłowości. Cechą wspólną trzech miejsc acetylacji w histonie F2a1 i F3 z grasicy cielęcej było to, że zacetylowaną lizynę oddzielały dwa aminokwasy od sekwencji Arg—Lys— według schematu: Lys (Ac)—X—Y—Arg—Lys (29):

F3 : Gly—Gly—Lys (Ac)—Ala—Pro—Arg—Lys

Ala—Thr—Lys (Ac)—Ala—Ala—Arg—Lys

F2a1. Gly—Ala—Lys (Ac)—Arg—His—Arg—Lys.

Sekwencje aminokwasowe wokół zacetylowanej lizyny w histonach z gruczołów jądrowych pstrąga można ująć w dwie grupy: 1) zacetylowana reszta lizyny sąsiaduje z aminokwasami o bardzo krótkim łańcuchu, np. z glicyną, alaniną, seryną, 2) zacetylowana lizyna występuje w parach, np. Lys—Arg, Arg—Lys, Lys—Lys mając z drugiej strony serynę lub alaninę (26).

Często jednak mimo występowania sekwencji aminokwasowej o takich właśnie cechach, obserwuje się brak modyfikacji, co sugeruje, że swoistość acetylotransferaz zależy również od innych czynników. Można więc przypuszczać, że warunkiem przeniesienia reszty acetylowej jest rozpoznanie specyficznej sekwencji przez acetylujący enzym i od pewnych nieznanych aspektów trzeciorzędowej struktury białka podlegającego modyfikacji.

Acetylacja jest reakcją odwracalną. Usuwanie octanu z histonów jest katalizowane enzymatycznie przy udziale deacetylaz (61—66). Wykazano, że okres półtrwania grup N-acetylowych w histonach wątroby, śledziony i grasicy szczura wynosi zaledwie 1,8—4,7 godziny (61). Dwudziestopięciogodzinny okres półtrwania tych grup w histonach z komórek wątrobiaka Novikoffa wskazuje na niską aktywność deacetylazy (62) w tkance nowotworowej.

Występowanie zacetylowanych lizyn w N-końcowej części histonów F2a1 i F3, (tj. w prawdopodobnym miejscu połączenia z DNA) sugeruje, że acetylacja jest procesem regulującym powinowactwo histonów do DNA. Badanie acetylacji histonów pochodzących z komórek gruczołów jądrowych pstrąga w poszczególnych etapach spermatogenezy wykazało, że w spermatydach przy niewielkiej syntezie histonów stosunek ^{14}C -octan : ^3H -lizyna jest dwudziestosiedmiokrotnie wyższy niż we wcześniejszych stadiach rozwojowych. Ponieważ, jak wiadomo, w stadium tworzenia spermatyd następuje wymiana histonów na protaminy, świadczy to o udziale acetylacji w procesie odłączania histonów od DNA (67).

Zakłada się również udział acetylacji w przyłączeniu nowosyntetyzowanego histonu F2a1 gruczołów jądrowych pstrąga do DNA (68). W myśl tego założenia histon F2a1 po wnikięciu do jądra komórkowego łączy się w sposób przypadkowy z resztami fosforanowymi DNA. Acetylotransferazy wykrywają nieodpowiednie połączenia i acetylują ϵ -aminowe grupy lizyn w N-końcowej części histonu. Acetylacja tych reszt zwiększa możli-

wość przyjęcia przez ten obszar struktury α -heliksu i dopasowanie do rowka DNA. Następnie deacetylazy usuwają reszty acetylowe, aby ujawnić dodatnio naładowane grupy ϵ -aminowe lizyny oddziałujące z resztami fosforanowymi DNA.

Można więc sądzić, że przyłączenie i usunięcie pewnych frakcji histonów z DNA może wymagać zmiany ładunku w obszarach zasadowych cząsteczek wskutek enzymatycznej acetylacji ϵ -aminowych grup lizyny.

III-2. Fosforylacja histonów

Fosforylacja histonów jest procesem enzymatycznym zachodzącym przy udziale kinaz katalizujących przeniesienie fosforanu z ATP do histonów i stymulowanych przez cykliczny AMP, glukagon, insulinę (69).

Szczegółowe badania wykazały występowanie w wątrobie szczura aktywnej fosfokinazy w cytosolu (po odwirowaniu rybosomów) oraz w chromatynie (70, 71). Po strąceniu nukleohistonu z chromatyny 90% aktywności tego enzymu pozostawało związane z białkami niehistonowymi (71). Enzym pochodzenia jądrowego miał większe powinowactwo do histonu F1 niż cytosolowy. Specyficzna aktywność enzymu cytoplazmatycznego stanowiła jednak tylko 25% aktywności enzymu związanego z białkami niehistonowymi.

Histony F2 i F3 okazały się słabymi akceptorami reszt fosforanowych. Wiele badań nad włączaniem radioaktywnego fosforanu *in vitro* do izolowanych jąder grasicy cielęcej (72) oraz *in vivo* do jąder komórkowych wątroby szczura (73, 74) czy hodowli komórkowych (75) wykazało aktywne fosforylowanie histonu F1.

Sekwencja aminokwasowa w N-kończowym obszarze podfrakcji 3 (RTL-3) histonu F1 grasicy królika (7) przypominała sekwencję fosfopeptydu izolowanego z enzymatycznie ufosforylowanego histonu F1 grasicy cielęcej (76). Fosfopeptyd zawierał serynę, która była głównym miejscem fosforylacji histonu F1 (76). Sekwencja podfrakcji 3 histonu F1 z grasicy królika różniła się jednak od izolowanych fosfopeptydów tym, że alanina zastępowała fosforylowaną serynę. To spostrzeżenie skłoniło do wnikliwej analizy fosforylacji poszczególnych podfrakcji tego histonu lizynowego oraz do określenia sekwencji aminokwasowej odpowiednich obszarów cząsteczek. Wykazano (77), że fosforylacja zachodziła głównie w podfrakcjach 1,2 i 4 histonu F1 grasicy królika.

W niewielkim stopniu fosforylacji ulegały również podfrakcje 0 z grasicy królika, 1 i 2 z grasicy szczura oraz 3 z grasicy cielęcia. Zdolność wiązania fosforanu przez podfrakcję 3 grasicy królika była mniejsza niż podfrakcji 4 i niefrakcjonowanego histonu F1 z tego samego źródła. Analiza sekwencji tryptycznych peptydów podfrakcji 3 i 4 wykazała podstawienie alaniny w miejsce seryny w pozycji 2 tego peptydu, odpowia-

dającej pozycji 37 w pełnej sekwencji aminokwasowej podfrakcji 3 histonu F1 grasicy królika. Zastąpienie alaniną seryny, tj. głównego miejsca fosforylacji w histonie F1 wyjaśniło różnicę w zdolnościach przyjmowania fosforanu przez podfrakcję 3 i 4 histonu lizynowego z grasicy królika. Można sądzić, że różnice w fosforylacji w innych podfrakcjach histonu F1 są prawdopodobnie spowodowane analogicznymi podstawieniami (77).

Badania fosforylacji histonów lizynowych F1 z różnych gatunków i różnych tkanek tego samego gatunku przy udziale kinazy protaminowej z gruczołów jądrowych pstrąga i γ - ^{32}P ATP wykazały różny stopień ufosforylowania tych histonów (78). Najwięcej radioaktywnego fosforu stwierdzono w histonie F1 z grasicy cielęcej (0,4 mola ^{32}P na mol histonu), podczas gdy dla innych histonów uzyskano wartości 0,1 mola ^{32}P na 1 mol i niższe.

^{32}P -peptydy otrzymane po trawieniu trypsyną histonów F1 z dziełku tkanek różniły się ruchliwością elektroforetyczną. Podobieństwo zaobserwowano jedynie w przypadku ^{32}P -peptydów z wątroby królika i grasicy cielęcia, a także wątroby i erytrocytów żaby. Wskazuje to na odmienną strukturę ufosforylowanych peptydów. Można więc postulować, że histony F1 różnią się miejscami zdolnymi do przyjęcia reszty fosforanowej zależnie od źródeł, z których zostały wyodrębnione (78). Występowanie fosfoseryny stwierdzono w histonie F3 z grasicy cielęcia (79). Rozbite cząsteczki oczyszczonego ^{32}P -histonu F3 grasicy cielęcej za pomocą bromocyjanu ujawniło, że 90% radioaktywnego fosforanu było związane z peptydem CNBr-1. W przypadku termolitycznych peptydów tego histonu obecność izotopu wykazano w dwóch peptydach, z których pierwszy występował w formie ufosforylowanej w 22%, a drugi — w 20% (80).

Zastosowanie trawienia trypsyną i rozdziału uzyskanych peptydów do badania poszczególnych ^{32}P -histonów z gruczołów jądrowych pstrąga wykazało obecność radioaktywnych fosfopeptydów w każdej frakcji histonowej. W przypadku histonów F2a1 i F2a2 pochodziły one z N-końcowych fragmentów ich łańcuchów polipeptydowych i były ufosforylowaną formą $\text{Ac-Ser(PO}_4\text{)-Gly-Arg}$ znanej sekwencji Ac-Ser-Gly-Arg . Identyczność uzyskanych fosfopeptydów z obu histonów dowodzi identyczności N-końcowych sekwencji tych histonów. Uzyskane informacje potwierdziła analiza sekwencji aminokwasów radioaktywnych fosfopeptydów termolitycznych obu histonów.

W histonie F1 wykazano występowanie dwóch fosfopeptydów: T1 $\text{Ser(PO}_4\text{)-Pro-Lys}$ oraz T2 $\text{Lys-Ser(PO}_4\text{)-Pro-Lys}$. Obydwa pochodziły z C-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego. Fosfopeptydy z histonu F2b nie zostały scharakteryzowane. We frakcji F3 z gruczołów jądrowych pstrąga stwierdzono tylko nieznaczne ilości włączonego radioaktywnego fosforanu (81).

III-3. Metylacja histonów

Histony pochodzące z wielu źródeł wykazują uderzające różnice w stopniu umetylowania.

Zmetylowane aminokwasy, głównie ϵ -N-metylolizyna, występują przede wszystkim w histonach argininowych F2a1 i F3. Obecność ϵ -N-metylolizyny w histonach po raz pierwszy stwierdził Murray (82).

W histonie F2a1 z grasicy cielęcej na 11 reszt lizyny, tylko lizyna występująca w pozycji 20 jest zmetylowana (10, 11), a w histonie F3 lizyny w pozycjach 9 i 27 (29).

Metylacja reszt lizynowych jest procesem złożonym, w którym do tego samego ϵ -aminowego atomu azotu ulega przyłączeniu więcej niż jedna grupa metylowa. W histonie F2a1 z grasicy cielęcej mono- i dimetylolizyna występowały w stosunku 1 : 3 (10). W tym samym histonie z kiełków grochu nie wykryto żadnej metylowanej lizyny (12). W histonie F3 z grasicy cielęcej stwierdzono występowanie oprócz monometylolizyny i dimetylolizyny również trimetylolizyny (32).

Z badań dotyczących sekwencji aminokwasowej wokół zmetylowanych reszt lizynowych w obu histonach wynika, że sąsiadują one od strony N-końca z arginina (29). Chociaż inne reszty lizyny (pozycje: 79 w F2a1 oraz 18 i 64 w histonie F3) są podobnie usytuowane, brak jest jakichkolwiek danych o ich metylacji.

Wydaje się prawdopodobnym, że w metylowaniu histonów F2a1 i F3 biorą udział różne enzymy. Wykazano, że w histonie F3 obszary zawierające umetylowane lizyny są identyczne w obu miejscach metylacji (poz. 9 i 27: Ala—Arg—Lys (Me) —Ser) i odrębne od sekwencji wokół zmetylowanej lizyny w histonie F2a1.

Histony F2a1 z tkanek prawidłowych, płodowych i nowotworowych posiadają identyczną sekwencję aminokwasową, ale różnią się w wartości stosunku ilości ϵ -N-dimetylolizyny do ϵ -N-monometylolizyny (15). W przypadku ludzkich limfoblastów leukemicznych, wątrobiaka Novikoffa i mięsakoraka, wynosił on odpowiednio: 0,53, 0,59 i 2,0, w przypadku grasicy płodowej cielęcia 0,3 a w przypadku grasicy cielęcej 4,0 (15). Bezpośrednim donatorem grup metylowych jest S-adenozyl-L-metionina (83). Puromycyna nie hamuje metylacji, co dowodzi, że jest to modyfikacja zachodząca po zakończeniu syntezy histonów (47).

Metylację histonów przeprowadzają trzy enzymy, zwane metylazą I, metylazą II i metylazą III (84—87).

Obecność enzymu usuwającego grupy metylowe z histonów stwierdzono w nerce szczura. Produktem demetylacji $^{14}\text{CH}_3$ -histonów był ^{14}C -formaldehyd. Najwyższą aktywność enzymu w porównaniu z innymi tkankami stwierdzono w nerce szczura. Specyficzna aktywność demetylasy była związana z frakcją mitochondrialną (88).

IV. Uwagi końcowe

Przedstawione dane, a zwłaszcza różnorodność, zakres i szybkość reakcji, które modyfikują strukturę histonów wskazują, że biologiczna funkcja jądrowych białek zasadowych jest regulowana w sposób bardzo skomplikowany. Mikroheterogenność, która jest wynikiem jednego typu modyfikacji, np. takiej jak acetylacja może nakładać się na zmianę innej części tej samej cząsteczki białka spowodowaną fosforylacją lub metylacją.

Można przypuszczać, że odwracalne modyfikacje struktury pierwszorzędowej histonów, mają wpływ na interakcję DNA-histon, w różnych obszarach chromatyny.

Wyniki badań podtrzymują pogląd (89), że reakcje, które obniżają dodatni ładunek histonu (fosforylacja, acetylacja), sprzyjają rozproszonemu stanowi chromatyny i wzrostowi jej udziału w procesach transkrypcji, podczas gdy reakcje podwyższające dodatni ładunek histonu (metylacja) wydają się sprzyjać kondensacji chromatyny i przeciwdziałać transkrypcji.

Artykuł wpłynął 12.7.1973, po rewizji autorskiej wrócił 2.12.1973.

PIŚMIENICTWO

1. Johns E. W., (1971), w *Histones and nucleohistones*, red. Phillips D.M.P., str. 6—9, Plenum Press, London — New York.
2. Bartkowiak J., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 263—296.
3. Bustin M., Cole R. D., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4500—4505.
4. Bustin M., Cole R. D., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1458—1466.
5. Bustin M., Cole R. D., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5291—5294.
6. Bustin M., Rall S. C., Stellwagen, Cole R. D., (1969), *Science*, **163**, 391—393.
7. Rall S. C., Cole R. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7175—7190.
8. Bustin M., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 263—267.
9. Sluyser M., Hermes Y., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 605—612.
10. De Lange R., Fambrough D., Smith L. E., Bonner J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 319—334.
11. Ogawa Y., Quagliarotti G., Jordan J., Taylor Ch., Starbuck C. W., Busch H., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4387—4392.
12. De Lange R., Fambrough D., Smith L. E., Bonner J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5669—5679.
13. Sautière P., Breynart M. D., Moschetto Y., Biserte G., (1970), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **271**, 364—366.
14. Sautière P., Tyrrou D., Moschetto Y., Biserte G., (1971), *Biochimie*, **51**, 479—483.
15. Desai L. S., Foley G. E., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 165—170.
16. Olson M. O. J., Sugano N., Yeoman L. C., Johnson B. R., Jordan J., Starbuck W. C., Busch H. (1972), *Physiol. Chem. Phys.*, **4**, 10—16.

17. Sugano N., Olson M. O. J., Yeoman L. C., Johnson B. R., Taylor Ch. W., Starbuck W. C., Busch H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3589—3591.
18. Phillips D. M. P., Simson P., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **181**, 154—158.
19. Hayashi H., Iwai K., (1971), *J. Biochem.*, **70**, 543—
20. Yeoman L. C., Olson M. O. J., Sugano N., Jordan J., Taylor Ch., Starbuck W. C., Busch H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6018—6023.
21. Sautière P., Biserte G., (1972), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **274**, 1422—1425.
22. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3868—3873.
23. Hnilica L. S., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 163—175.
24. Iwai K., (1970), *Nature*, **226**, 1056—1058.
25. Hnilica L. S., Kappler H. A., Jordan J. J., (1970), *Experientia*, **26**, 353—355.
26. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2015—2019.
27. De Lange R., Smith E. L., Bonner J., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 989—993.
28. Olson M. O. J., Jordan J., Busch H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 50—55.
29. De Lange R., Hooper J., Smith E. L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 882—884.
30. De Lange R. J., Smith E. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3248—3254.
31. Hooper J. A., Smith E. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3255—3260.
32. De Lange R. J., Hooper J. A., Smith E. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3261—3274.
33. Marzluff W. F., Sanders L. A., Miller D. M., McCarty K. S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2026—2033.
34. Hooper J. A., Smith E. L., Sommer K. R., Chalkley R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3275—3279.
35. Wigle D., Dixon G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5636—5644.
36. Greenway P. J., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 319—325.
37. Huntley G. H., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4916—4919.
38. Phillips D. M. P., (1971), w Histones and Nucleohistones, red. Phillips D. M. P., str. 47—83, Plenum Press, London—New York.
39. Boublik M., Bradbury E., Johns E., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **17**, 151—159.
40. Boublik M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 486—497.
41. Phillips D. M. P., (1963), *Biochem. J.*, **87**, 258—260.
42. Phillips D. M. P., (1968), *Biochem. J.*, **107**, 135—138.
43. Marzluff W. F., McCarty K. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5635—5642.
44. Liew C. C., Haslett G. W., Allfrey V. G., (1970), *Nature*, **226**, 414—417.
45. Gershay E. L., Vidali G., Allfrey V. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5018—5022.
46. Vidali G., Gershay E. L., Allfrey V. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6361—6366.
47. Desai L. S., Foley G. E., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **141**, 552—556.
48. Jungman R., Schweppe J., Lestina F., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4321—4326.
49. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **51**, 786—794.
50. Gallwitz D., Sekeris C. E., (1969), *Z. Physiol. Chem.*, **350**, 150.

51. Bondy S. C., Roberts S., Morelos B. S., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 665—672.
52. Nohara H., Takahashi T., Ogata K., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 282—284.
53. Libby P. R., (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 59—65.
54. Gallwitz D., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 117—120.
55. Gallwitz D., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 236—242.
56. Gallwitz D., Sures J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 315—328.
57. Pogo B. G. T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 805—812.
58. Cross M. E., Ord M. G., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 191—193.
59. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3182—3188.
60. Marzluff W. F., Miller D. M., McCarty K. S., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 472—474.
61. Byvoet P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 217—223.
62. Libby P. R., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 234—236.
63. Inoue A., Fujimoto D., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 146—150.
64. Inoue A., Fujimoto D., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **220**, 307—316.
65. Boffa L. C., Gershely E. L., Vidali G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **254**, 135—143.
66. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7365—7373.
67. Candido E. P. M., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5506—5510.
68. Louie A. J., Dixon G. H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 1975—1979.
69. Szumiel I., Zajdel M. E., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 175—198.
70. Pawse R., Ord M. G., Stocken L. A., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 721—725.
71. Siebert G., Ord M. G., Stocken L. A., (1971), *Biochem. J.*, **122**, 713—719.
72. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **55**, 1182—1189.
73. Ord M. G., Stocken L. A., (1966), *Biochem. J.*, **98**, 888—897.
74. Buckingham R. H., Stocken L. A., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 157—160.
75. Shepherd G. R., Noland B. J., Hardin J. M., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 299—302.
76. Langan T. A., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **64**, 1276—1283.
77. Langan T. A., Rall S. C., Cole R. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1942—1948.
78. Jergil B., Sung M., Dixon G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5867—5870.
79. Marzluff W. F., McCarty K. S., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2672—2677.
80. Marzluff W. F., McCarty K. S., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2677—2681.
81. Sung M., Dixon G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 1616—1623.
82. Murray K., (1964), *Biochemistry*, **3**, 10—15.
83. Paik W. K., Kim S., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 14—20.
84. Paik W. K., Kim S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2108—2114.
85. Paik W. K., Kim S., (1971), *Science*, **174**, 114—119.
86. Kim S., Paik W. K., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1806—1813.
87. Paik W. K., Kim S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6010—6015.
88. Paik W. K., Kim S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 781—788.
89. Allfrey V. G., (1971), w Histones and Nucleohistones, red. Phillips D. M. P., str. 280—281, Plenum Press, London—New York.

JOLANTA SKANGIEL-KRAMSKA*

Budowa i heterogenność hydrolazy acetylocholinowej

Structure and Heterogenity of Acetylcholinesterase

Molekularne własności hydrolazy acetylocholinowej —AChE (E. C. 3.1.1.7.) cieszą się szczególnym zainteresowaniem biochemików, neurofizjologów oraz farmakologów ze względu na udział tego enzymu w procesach przekąźnictwa synaptycznego. Enzym ten katalizuje bowiem rozpad acetylocholin (ACh) — przekąźnika transmisji nerwowo-mięśniowej, a w wielu przypadkach i międzyneuronalnej.

Budowie i własnościom AChE poświęcone było szereg wcześniejszych artykułów przeglądowych (1, 2, 3, 4.).

W niniejszym artykule zostały omówione w głównej mierze obecne poglądy na budowę i heterogenność tego enzymu.

I. Występowanie i rola AChE

AChE występuje przede wszystkim w tkance nerwowej ale jej obecność stwierdzono również w mięśniach (5, 6), w krwinkach (7), wątrobie (8), w łożysku (9), w jadzie kobry (5) i u pierwotniaków (10).

Liczba obrotów AChE wskazuje na olbrzymią aktywność enzymu: wynosi ona od $4,5 \times 10^5$ cząsteczek/min/centrum aktywne (11) do $8,5 \times 10^5$ cząsteczek/min/centrum aktywne (12).

Czas potrzebny do rozłożenia jednej cząsteczki acetylocholin zależy od pochodzenia enzymu, np. dla AChE z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego (*Electrophorus electricus*) wynosi zaledwie 30—60 μ sek (13), a z mózgu owcy 240 μ sek (14). Niezwykle wysoka aktywność katalityczna umożliwia rozłożenie acetylocholin wyzwolonej pod wpływem impulsu z zakończenia nerwowego przed nadejściem następnego bodźca.

Nachmansohn (15, 16) postuluje udział acetylocholin nie tylko w przekąźnictwie synaptycznym, ale również w przewodnictwie nerwo-

* Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: AChE — hydrolaza acetylocholinowa; EDTA — kwas etylenoczworowocynowy.

wym, a tym samym zaangażowanie AChE w tym procesie. Większość badaczy jednakże nie zgadza się z tym poglądem (17, 18, 19).

Komórki korzonków zwojów grzbietowych oraz komórki Purkiniego, o których wiadmo, że nie są cholinergiczne, we wczesnych stadiach ontogenezy wykazują aktywność AChE. Prawdopodobnie w tych neuronach AChE może pełnić rolę nie związaną z przekazywaniem (20). Sugeruje się między innymi udział tego enzymu w regulacji syntezy fosfolipidów (21, 22). Pogląd taki wynika z faktu, że acetylocholina stymuluje syntezę niektórych fosfolipidów. Tym samym AChE mogłaby być związana z procesami syntezy błon biologicznych i z regulacją ich przepuszczalności.

Rozważania dotyczące roli AChE w komórkach niecholinergicznym mają charakter bardziej ogólny, można je odnieść również do innych tkanek poza nerwową.

II. Mechanizm działania i budowa centrum aktywnego

Reakcja enzymatycznej hydrolizy acetylocholine jest dwustopniowa. W pierwszym etapie powstaje zacylowany enzym i odszczepia się cholina. W drugim etapie zacylowany produkt pośredni reaguje z wodą, odtwarza się wyjściowa forma enzymu i odłącza się kwas octowy. Inne estrы cholinowe i niecholinowe ulegają też rozkładowi przez ten enzym, aczkolwiek z mniejszą szybkością (23).

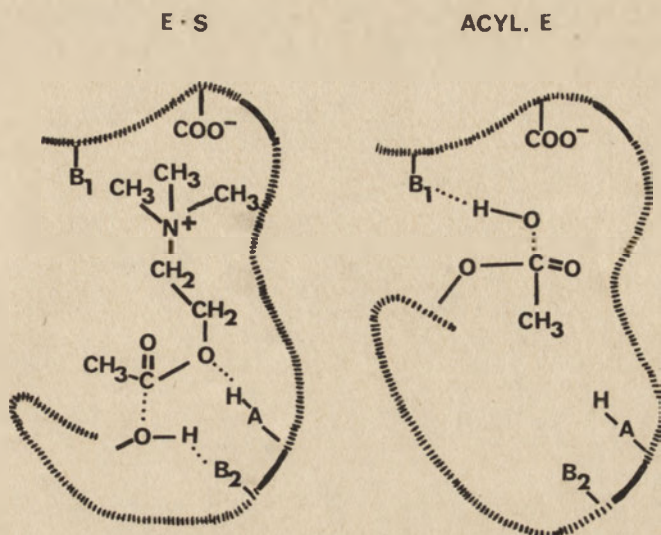
Uważa się powszechnie, że centrum katalityczne AChE zawiera dwa aktywne podcentra: anionowe i estrowe (24). Podcentrum anionowe reaguje z czwartorzędowym azotem acetylocholine dzięki siłom kulombowskim i Van der Waalsa. Podcentrum estrowe odpowiada za hydrolizę substratu. Stwierdzono w tym obszarze obecność fragmentu peptydowego o następującej sekwencji: Gli—Gli—Ser—Ala. Grupą nukleofilną jest grupa hydroksylowa seryny. Obecność imidazolowego pierścienia histydyny wzmacnia jej nukleofilny charakter.

Kinetyka alkilacji AChE przez różne związki fosforoorganiczne (4,25) oraz pochodne azyrydiny (26) wskazują, że w centrum aktywnym enzymu znajdują się obszary o charakterze hydrofobowym. Badania zmian dyspersji skręcalności optycznej AChE w obecności ligandów fotochromowych potwierdzają ten pogląd (27). Występowanie obszarów niepolarnych w centrum aktywnym enzymu wyjaśniałoby reaktywność AChE z nienaładowanymi analogami acetylocholine, w których atom azotu został zastąpiony przez atom węgla.

Schemat centrum aktywnego przedstawiono na rycinie 1.

Hamowanie aktywności AChE przez nadmiar substratu zostało wyjaśnione obecnością dwóch podcentrów — estrowego i anionowego. Do

zacylowanego już enzymu przyłącza się druga cząsteczka substratu, tworząc z nim kompleks acyl·E·S (29). Deacylacja tego kompleksu przebiega wolniej niż zacylowanego enzymu (Acyl·E).



Ryc. 1. Schemat centrum aktywnego AChE

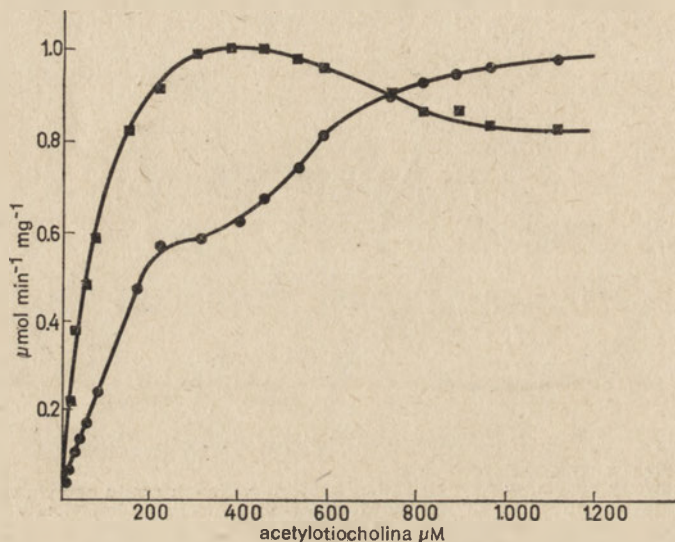
E·S — kompleks enzym-acetylocholina
 acyl·E — zacylowany enzym, w wyniku zmian konformacyjnych reszta acetylowa zostaje przeniesiona w okolice grupy B₁, która katalizuje hydrolizę kompleksu acyl-enzym
 B₁ i B₂ — grupy o charakterze zasadowym o pK = 6,3 i 5,5
 A — H — grupa o charakterze kwaśnym o pK = 9,2
 O — H — grupa wodorotlenowa seryny w centrum esterym
 COO⁻ — grupa karboksylowa w centrum anionowym
 Linia ciągłą zaznaczono obszary o charakterze hydrofobowym
 Modyfikacja schematu (28).

Hamowanie AChE przez nadmiar acetylocholinyl może mieć jednak inny mechanizm. Kinetyka reakcji w obecności kompetetywnych inhibitorów AChE: atropiny, gallaminy i 1-hyoscyaminy, które znoszą hamujący efekt wysokich stężeń substratu, wskazuje, że istnieją dodatkowe miejsca wiązania acetylocholinyl (30). Wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu przyjmuje kształt sigmoidalny przy jego wysokich stężeniach ($22,5 \times 10^{-5} \text{M}$), (Ryc. 2).

K a t o i wsp. (31) uważają, że wymienione substancje współzawodniczą z substratem o miejsce allosteryczne i zapobiegają w ten sposób hamowaniu aktywności AChE przez nadmiar acetylocholinyl. Taki model interakcji enzymu z inhibitorem oparty jest na założeniu, że AChE występuje w dwóch stanach. W stanie R, zgodnie z koncepcją M o n o d i wsp. (32) AChE wiąże substrat, a w stanie T — inhibitor. Przy nasyceniu centrum aktywnego substratem, jego nadmiar wiąże się z miejscem regulatorowym z wytworzeniem stanu T o mniejszej zdolności katalitycznej.

O obecności dodatkowych miejsc wiązania dla acetylocholinyl świadczą obserwacje całego szeregu badaczy (33, 34, 35). Między innymi C h a n -

geux i wsp. (34) badając własności receptora cholinergicznego stwierdzili, że w warunkach zahamowania aktywności AChE przez ezerynę, preparat płytek elektrycznych (electroplax) nadal przyłącza acetylocholinę. Białko preparatu, które wiązało mediator zidentyfikowano jako AChE. Dane te stanowią dodatkowe potwierdzenie, że AChE jest białkiem allosterycznym.



Ryc. 2. Wpływ stężenia substratu na szybkość enzymatycznej hydrolizy acetylotiocholiny (30)

●—● — nasycenie enzymu acetylotiocholiną w obecności $5 \times 10^{-5} \text{M}$ siarczanu atropiny
 ■—■ — hamowanie AChE przez nadmiar substratu
 Acetylotiocholina — pochodna acetylocholiny stosowana do badań kinetyki AChE.

Przyspieszenie szybkości hydrolizy niektórych pseudosubstratów, karbamylu i metanosulfonylofluorków, w obecności jonów czteroetyloamoniowych jest prawdopodobnie konsekwencją zmian konformacyjnych enzymu (36, 37). Należy zaznaczyć, że jony czteroetyloamonowe hamują rozkład innych pochodnych niż fluorkowe.

Niektóre pary inhibitorów hamują hydrolizę acetylocholiny w stopniu znacznie większym niż w przypadku każdego z tych związków oddzielnie (38). Synergiczny efekt można wyjaśnić przy założeniu równoczesnego powiązania tych substancji z dwoma obszarami centrum aktywnego z wytworzeniem kompleksu enzymu z cząsteczkami dwóch różnych inhibitorów $E \cdot I_1 \cdot I_2$. Wskutek powstałych zmian konformacyjnych obszary aktywne odsuwałyby się od siebie (38). Hipoteza ta zakłada, że centrum aktywne enzymu może być zarazem miejscem modyfikującym. To samo zjawisko można by jednakże tłumaczyć mechanizmami allosterycznymi.

III. Własności oczyszczonych preparatów AChE

Nadzwyczaj dogodnym źródłem otrzymywania AChE jest narząd elektryczny węgorza elektrycznego, ponieważ AChE stanowi aż 0.5% wszystkich białek zawartych w tym narządzie (15). Niektóre dane charakteryzujące oczyszczone preparaty enzymu z tej tkanki zestawiono w tabeli 1.

Z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego udało się uzyskać krystaliczny preparat AChE (Tabela 1, p. 4.), (41).

Punkt izoelektryczny oczyszczonego enzymu wynosi 5,03. Ciężar cząsteczkowy, oznaczony metodą równowagi sedimentacji, równy jest 260 000 daltonów. Pod wpływem chlorowodoru guanidyny i merkaptotetanolu enzym rozpada się na cztery nieaktywne podjednostki. Ciężar każdej z tych podjednostek stanowi czwartą część ciężaru cząsteczkowego AChE. Badania C-końcowych aminokwasów prowadzone dwiema niezależnymi metodami, hydrazynolizą i działaniem karboksypeptydazy A, wykazały, że dwie podjednostki mają jako końcowy aminokwas serynę, dwie pozostałe natomiast glicynę. W wyniku rozdziału elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym w obecności 10M mocznika stwierdzono występowanie dwóch prążków białkowych. Dane te sugerują, że aktywna cząsteczka enzymu jest dimerem o strukturze hybrydowej typu $\alpha_2\beta_2$ (41, 48). Dodatkowym potwierdzeniem podjednostkowej struktury enzymu są badania przeprowadzone techniką elektroogniskowania. Zredukowany i zalkilowany enzym ma dwa składniki o punkcie izoelektrycznym 4,8 i 7,0 (49). Przy użyciu metody miareczkowania dwuizopropylodifluorofosforanem, nieodwracalnym inhibitorem AChE, względnie pseudosubstratem O-nitrofenylo-dwumetylokarbamidem wykazano, że w czystym preparacie występują dwa aktywne centra na cząsteczkę enzymu (50). Nasuwają się zatem następujące możliwości: 1) łańcuchy α i β tworzą razem aktywne centrum, 2) łańcuch α jest aktywną katalitycznie podjednostką, a łańcuch β spełnia inną funkcję np. receptora cholinergicznego (49). Jednakże dane co do liczby centrów aktywnych i ciężaru cząsteczkowego podjednostek nie są zgodne. Froede i Wilson (51) stosując C^{14} -dwiizopropylodifluorofosforan znaleźli cztery aktywne centra na cząsteczkę enzymu. Ponieważ oznaczony przez nich ciężar cząsteczkowy AChE wyniósł 230 000 daltonów, autorzy ci uważają, że enzym składa się z 4 podjednostek o ciężarze około 60 000 (24). Według innych (42) ciężar podjednostki oczyszczonego enzymu w obecności 5M guanidyny i 0,01M dwutiotreitolu w pH 7,0 wynosi 42 000 daltonów, a w przypadku zastosowania kwaśnej guanidyny 21 500. Na podstawie uzyskanych danych postulowano, że rodzimy enzym z węgorza elektrycznego jest heksamerem (42). Składnik o ciężarze cząsteczkowym 21 000 powstaje w wyniku pęknięcia wiązania peptydowego pod wpływem działania kwaśnej guanidyny na podjednostkę o ciężarze cząsteczkowym 42 000.

Tabela 1

Porównanie niektórych własności oczyszczonych preparatów AChE z narządu elektrycznego węgla elektrycznego

Lp.	Sposób otrzymywania preparatu	Aktywność AChE mmole (acetylocholin) godz/mg białka	Jednorodność preparatu	S ₂₀	Ciężar cząst. daltony x 10 ⁵	Ciężar podjednostki daltony x 10 ³	Pismienictwo
1.	Długotrwałe przechowywanie	420	—	—	20,0	—	(39)
2.	materiału w obecności toluenu	552	jednorodny	10,8	2,4	—	(13)
3.	—, —	660	jednorodny	10,8	2,5	—	(40)
4.	—, —	730	jednorodny	11,0	2,6	64	(41)
5.	—, —	675	krystaliczny	—	—	—	—
6.	Dodatkowe trawienie	480	jednorodny	10,8	2,6	42 i 21	(42)
	trypsyną		jednorodny	11,0	1,1	88 i 64	(43)
7.	Ekstrakcja świeżego	3	niejednorodny	8,5	—	91 i 62	(44,45)
	narządu buforem w			14,2	—	91 i 62	(44,45)
	obecności soli			18,4	—	91 i 62	(44,45)
8.	Dodatkowe trawienie	—	jednorodny	11,9	2,0	—	(44)
	trypsyną			—	—	—	—
9.	Ekstrakcja świeżego	500	niejednorodny	11,5	—	—	(46)
	narządu buforem w	120		70,0	25,0	—	—
10.	obecności soli			—	—	—	—
	Dodatkowe działanie	5	jednorodny	7,4	1,3	65	(47)
	Tritonem X-100			—	—	—	—

Z zestawienia (Tabela 1) wynika, że w zależności od sposobu traktowania tkanki otrzymuje się preparaty niejednorodne, gdy materiałem wyjściowym jest świeży narząd elektryczny, bądź jednorodne, gdy tkankę przez długi okres czasu przechowuje się w obecności toluenu. Preparaty otrzymane ze świeżej tkanki agregują w niskiej sile jonowej (52). Wydaje się, że własność ta nie jest konsekwencją obecności w preparatach enzymu zanieczyszczeń w postaci fosfolipidów, wielocukrów czy polinukleotydów (53). Przechowywanie w toluenie powoduje utratę zdolności do agregacji, prawdopodobnie wskutek nieodwracalnej zmiany konformacji enzymu.

Pomiary stałych sedymentacji AChE ze świeżego narządu elektrycznego wykazały obecność dwóch składników 70S i 11,5S. Forma 70S pod wpływem działania lipaz przekształca się w formę 11,5S. Dane te wskazują, że składnik 70S jest kompleksem cząsteczek monomeru z lipoproteidami (46).

Drugim, łatwo dostępnym źródłem AChE są erytrocyty. Do chwili obecnej nie udało się jednak otrzymać krystalicznej postaci tego enzymu z krwinek. AChE z erytrocytów człowieka, oczyszczoną 2500-krotnie otrzymali C i l i v i Ö z a n d (54). Oczyszczony preparat AChE z krwinek różni się pod pewnymi względami od AChE z narządu elektrycznego węgorka. Jest to glikoproteid, tworzący łatwo dysocjujące agregaty. Stała Michaelisa dla jodku acetylotiocholiny jako substratu wynosi 0,18 mM, gdy K_m preparatu z narządu elektrycznego jest trzykrotnie mniejsza (55). Wartość pK_a preparatu z krwinek wynosi około 4,8, a pK_a enzymu z węgorka elektrycznego 6,5 (23). Dane te wskazują, że w centrum aktywnym AChE z erytrocytów znajduje się prawdopodobnie grupa karboksylowa, a nie imidazolowa, która występuje w enzymie z narządu elektrycznego.

Stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecyłu sodu oznaczono ciężar cząsteczkowy preparatu AChE z krwinek człowieka jako równy 180 000 daltonów, a ciężar cząsteczkowy podjednostki jako 90 000 (56). Liczba obrotów tego preparatu wynosi 6×10^6 cząsteczek na centrum aktywne, a więc jest to wartość bardzo podobna do danych uzyskanych dla AChE z narządu elektrycznego.

Dużo wyższe wartości ciężaru cząsteczkowego uzyskano badając enzym z krwinek, solubilizowany Tritonem X-100 (57). Po chromatografii na DEAE-Sephadex otrzymano dwie formy o identycznym ciężarze, wynoszącym 420 000 daltonów, ale różniące się ładunkiem. Po usunięciu detergentu enzym agregował, dając postać o ciężarze powyżej 2×10^6 daltonów. Polimery AChE z narządu elektrycznego również mają ciężar cząsteczkowy powyżej 10^6 (58).

Badanie rozmieszczenia AChE w strukturach komórkowych mózgu za pomocą frakcjonowanego wirowania wykazało, że AChE występuje we frakcji błon mikrosomalnych (59, 60, 61). Tylko niewielką część całkowitej

aktywności enzymu, około 20%, odnajduje się w supernatancie po odwirowaniu mikrosomów. Toteż oczyszczenie AChE z mózgu wymaga solubilizacji enzymu przy użyciu detergentów (62, 63, 64), rozpuszczalników organicznych np. butanolu (14), względnie trawienia proteazą (63, 65), lub elastazą (66).

Porównanie wydajności solubilizacji AChE w zależności od stosowanego czynnika ekstrahującego przedstawia tabela 2.

Tabela 2

Wpływ niektórych czynników na solubilizację AChE z tkanki nerwowej

Lp	Źródło enzymu	Środek solubilizujący	% zsolubilizowanej AChE*	Piśmiennictwo
1	mózg wołu	elastaza	30	(66)
2	mózg świni	proteaza bakteryjna	33	(65)
3	jądro ogoniaste mózgu wołu	0,32 M sacharoza + 1 mM EDTA	70	(67)
4	mózg wołu	0,32 M sacharoza + 10^{-4} M EDTA + 10^{-5} M tetrakaina	90	(68)
5	mózg świni	2% Triton X-100	81	(65)
6	błony synaptosomalne mózgu szczura	0.3% Triton X-100	75	(69)
7	nerwy obwodowe królika	0.2% Triton X-100	80	(70)
8	mózg świni	1,5 M KCl	16	(65)
9	mózg świni	1% Triton X-100 + 1,5 M KCl	100	(65)

*—aktywność AChE w supernatancie po odwirowaniu mikrosomów w % aktywności homogenatu.

Bardzo wydajna ekstrakcja AChE roztworem sacharozy z dodatkiem EDTA (67, 68, 71) oraz porównanie stopnia solubilizacji AChE i innych białek obecnych w błonach synaptosomalnych przy użyciu Tritonu X-100 (69) wskazuje, że enzym ten jest stosunkowo luźno związany ze strukturami komórkowymi. Skład aminokwasowy oraz rozpuszczalność AChE z narządu elektrycznego węgorza świadczy, że enzym ten można zaliczyć do tzw. peryferycznych białek błony (72). Istnieją nawet poglądy, że AChE występująca w cytosolu znajduje się w równowadze dynamicznej z enzymem związanym z błonami (68, 73).

Ciężary cząsteczkowe solubilizowanej Tritonem X-100 AChE z mózgu szczura wahają się w granicach od 200 000 daltonów (63) do 500 000 daltonów (64). Być może uzyskiwane w ten sposób preparaty AChE są stadium pośrednim między enzymem związanym z błonami a postacią AChE o ciężarze cząsteczkowym 100 000 daltonów, którą otrzymano na skutek działania jadu żmii lub proteinaz bakteryjnych (63).

IV. Wielopostaciowość AChE

Budowa podjednostkowa enzymu z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego, heterogenność AChE w tkankach, różna lokalizacja wewnątrzkomórkowa oraz niejednorodność oczyszczonych preparatów tego enzymu z mózgu wskazują, że AChE może występować w różnych formach molekularnych.

Wielopostaciowość AChE jądra ogoniastego i skorupy mózgu człowieka została opisana po raz pierwszy w 1962 r. przez Bernsohna i wsp. (74). Od tego czasu wielu autorów obserwowało obecność różnych form molekularnych AChE w układzie nerwowym zarówno zwierząt niższych (75, 76, 77, 78), jak i kręgowców (74, 79, 80, 81, 82), oraz w krwinkach (83).

Jednakże tylko w niektórych przypadkach udało się wykazać, że są to izoenzymy zgodnie z wąską definicją podaną przez Unię Biochemiczną (84), tzn. że strukturę pierwszorzędową kontrolują odmienne loci genowe. Tak jest np. w przypadku różnych postaci AChE występujących w krwinkach człowieka (83) i mózgu pstrąga (81).

Niektóre własności różnych form molekularnych AChE w tkance nerwowej i mięśniach zostały zestawione w tabeli 3. W zestawieniu nie uwzględniono prac, w których bądź nie stwierdzono żadnych różnic lub różnice w wartościach parametrów kinetycznych były bardzo małe (80, 85, 86, 87).

IV-1. Znaczenie występowania różnych form AChE

Dotychczas jedynie w przypadku izoenzymów AChE występujących w mózgu pstrąga udało się wykazać, że mają one fizjologiczne znaczenie. Baldwin i Hochachka (81) stwierdzili, że synteza poszczególnych form AChE zależy od temperatury aklimatyzacji ryb. W temperaturze 2°C pojawia się tylko tzw. forma "zimna", natomiast w 17°C druga forma "ciepła". W temperaturach pośrednich występują różne proporcje obu izoenzymów (patrz Tabela 3, p. 1). Na podstawie pomiarów K_m poszczególnych izoenzymów, autorzy wnioskuja, że syntetyzowany jest ten izoenzym, który w danej temperaturze ma większe zdolności katalityczne. Przypuszczano, że różny okres półodnowy, który oznaczano dla izoenzymów AChE z siatkówki szczura (79) i z mózgu złotej rybki (82) może wskazywać na rolę tych postaci w procesach uczenia. Zwłaszcza, że jeden z izoenzymów odznaczał się niezwykle krótkim okresem półodnowy — około 2 godzin. Jednakże do tej pory nie udało się wykazać, by obraz elektroforytyczny AChE zmieniał się po treningu zwierząt.

Zmiany obrazu różnych form AChE obserwowano w mózgu i w mięśniach w czasie rozwoju (91, 92), po odnerwieniu mięśni (90, 93), oraz w mięśniach dystroficznych (89, 94). Stwierdzono również, że stosunki ilość-

Tabela 3

Różne formy AChE w ekstraktach z tkanki nerwowej i z mięśni

L.p.	Źródło enzymu	Ilość form	Własności różnych form AChE		Piśmiennictwo
			CieŜar cząsteczkowy (daltony $\times 10^4$)	Inne parametry	
1	Mózg pstrąga	2	—	$K_{m_z} - 1,0 \times 10^{-4} M$ (2°C) $K_{m_o} - 1,0 \times 10^{-4} M$ (17°C) Różny okres półodnowy (2 godz. — 2 tyg.)	(81)
2	Mózg złotej rybki	8—10	—	Różny okres półodnowy (2 godz. — 2 tyg.)	(82)
3	Siatkówka szczura	8—10	—	Różny okres półodnowy (2 godz. — 2 tyg.)	(79)
4	Jądro ogoniaste mózgu wołu	3	39 27 13	Różnice w opt. pH i pI_{60} $K_m - 1,4 \times 10^{-4} M$ $K_m - 1,5 \times 10^{-4} M$ $K_m - 2,3 \times 10^{-4} M$	(71)
5	Mózg świni	5	6; 13; 20; 27; 35	—	(65)
6	Nerwy obwodowe królika	2	31; 17	—	(88)
7	Mięśnie kurcząt	3	42; 29; 22	—	(89)
8	Mięśnie szczura	3	—	4S; 10S; 16S Nadmiar acetylocholiny nie hamuje formy 4S.	(90)

ciowe pomiędzy formami AChE po przecięciu nerwów obwodowych zmieniają się (95). Znaczenie tych zjawisk pozostaje jednakże niewyjaśnione.

Dzięki porównaniu ekstraktów AChE z normalnej i odnerwionej przepony szczura, wykazano, że jedna z 3 form AChE o stałej sedymentacji 16S, obecna w mięśniach, występuje w płytkach końcowych (90).

Histochemiczne obserwacje Koelle i wsp. (96) mogą wskazywać na różne powiązania izoenzymów AChE ze strukturami subkomórkowymi. Autorzy ci badali lokalizację AChE w zwojach gwiaździstych i rzęskowych oraz w płytkach nerwowo-mięśniowych mięśni szkieletowych kota. Poddawali skrawki działaniu 0.3% Tritonu X-100 w 0,9% NaCl. Procedura ta potęgowała reakcję enzymatyczną w płytkach, natomiast w zwojach zabarwienie częściowo lub całkowicie zanikało. Wymienieni autorzy uważają, że w zwojach AChE jest luźniej połączona niż w płytkach i dodanie Tritonu X-100 powoduje dyfuzję enzymu. Należy podkreślić, że Koelle i wsp. (96) utożsamiają różne powiązania AChE z błonami z faktem występowania tego enzymu w postaci izoenzymów, aczkolwiek doświadczenia ich nie dostarczają na to bezpośrednich dowodów. Natomiast późniejsze prace, oparte na zmianach obrazu elektroforetycznego i profilów sedymentacyjnych różnych form AChE w zależności od sposobu i wydajności ekstrakcji, wskazują, że niektóre z tych postaci występują w cytosolu lub są bardzo słabo związane z błonami. Dotyczy to np. formy o mniejszym ciężarze cząsteczkowym w nerwach obwodowych królika (70), jak i formy o stałej sedymentacji 4S, obserwowanej w mięśniach szczura (90). Być może różna lokalizacja AChE stwierdzona w aksonach i w mięśniach (97, 98, 99, 100, 101), związana jest z występowaniem różnych form molekularnych tego enzymu. Do tej pory brak jest jednak obserwacji potwierdzających takie przypuszczenie.

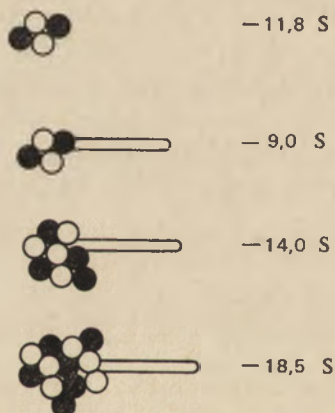
IV-2. Polimeryczne formy AChE

Chanowi i wsp. (71) udało się wyizolować i oczyścić różne formy AChE z jądra ogoniastego mózgu wołu. Jednakże ilości otrzymywanych preparatów były za małe, by można było zbadać, czy formy te różnią się strukturą pierwszorzędową. Tym samym nie można wykluczyć, że są to polimery tego samego polipeptydu. Za taką możliwością przemawiają ciężary cząsteczkowe oznaczone dla tych form 130 000, 270 000 i 390 000 daltonów, (patrz Tabela 3, p. 4). Również wartości ciężarów cząsteczkowych oznaczonych dla form AChE z mięśni dystroficznych kurcząt (89), (patrz Tabela 3, p. 7), zdają się potwierdzać przypuszczenie, że obserwowane postacie są wielokrotnością formy monomerycznej.

Różnice w obrazie AChE obserwowane w czasie rozwoju lub w stanach patologicznych są wynikiem wg Mastersa i Holmesa (102) zmian zdolności enzymu do agregacji, a nie syntezy jednych form lub zahamowaniem wytwarzania innych.

Na szczególną uwagę zasługują interesujące prace grupy Massoulié, która od kilku lat stosując różnorodne metody, bada budowę i właściwości różnych form molekularnych AChE z narządów elektrycznych węgorza elektrycznego i drętwy. Autorzy ci stwierdzili, że trzy formy rodzime o stałych sedymentacji 8,5S, 14,2S, 18,4S mają kształt asymetryczny (44, 103, 104). Poddane działaniu trypsyny (103), sonifikacji (104), albo w wyniku autolizy (44) przekształcają się w formy globularne o stałych sedymentacji 11,8S i 7,7S.

Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały, że postaci asymetryczne składają się z "głowy" i części wydłużonej "ogona". "Głowa" jest to skupisko w kształcie grona, różnej ilości globularnych elementów, które odpowiadają podjednostkom enzymu (105). Dwa rodzaje podjednostek różnią się ciężarem cząsteczkowym, który wynosi 91 000 daltonów i 63 000 daltonów (45). Obserwacje te zostały potwierdzone również przez innych autorów (106). Tzw. "ogon" nie ma właściwości katalitycznych, zawiera znaczną ilość kwasu siałowego. Autorzy sugerują, że tą częścią enzym przylacza się do powierzchni błony (107). Na schemacie (Ryc. 3) przedstawiona jest budowa różnych form molekularnych AChE z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego.



Ryc. 3. Schemat budowy różnych form AChE z narządu elektrycznego węgorza elektrycznego (wg 105, 45)

● — podjednostka 91.000 daltonów
○ — podjednostka 63.000 daltonów

Niejednorodne preparaty ze świeżego narządu elektrycznego ryb, uzyskane przez grupę Massoulié, są znacznie mniej oczyszczone i charakteryzują się niższą aktywnością specyficzną (por. Tabela 1). Dokładniejsze poznanie właściwości niebiałkowych składników takich jak np. cukry i fosfolipidy (108) oraz ich połączeń z łańcuchem polipeptydowym być może wyjaśni sposób powiązania enzymu z błonami komórkowymi.

PIŚMIENNICTWO

1. Koelle G. B., (1963) w Handbook of Experimental Pharmacology, red. Koelle G. B., t. 15, str. 187—298, Springer—Verlag, Berlin.
2. Niemierko S., (1965), *Post. Biochem.*, 9, 247—265.
3. Leuzinger W., (1969), *Progr. Brain Res.*, 31, 241—245.
4. Rozengart V. J., (1973) w Problemy Medycynskiej Chemii, red. Szapot V. S., Larski E. G., str. 66—105, Medycyna, Moskwa.
5. Augustinsson K. B., (1949), *Arch. Biochem.*, 23, 111—126.
6. Nachmansohn D., (1963) w Handbook of Experimental Pharmacology, red. Koelle G. B., t. 15, str. 701—740, Springer Verlag, Berlin.
7. Cohen J. A., Warringa M. G. P. J., (1953), *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 195—196.
8. Wheeler G. E., Coleman R., Finean J. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, 255, 917—930.
9. Ord M. G., Thompson R. H. S., (1950), *Biochem. J.*, 46, 346—352.
10. Gilboa-Garber N., Zakut V., Mizrahi L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, 297, 120—124.
11. Michel H. O., Krop S., (1951), *J. Biol. Chem.*, 190, 119—125.
12. Bender M. L., Stoops J. K., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1622—1623.
13. Lawler H. C., (1961), *J. Biol. Chem.*, 236, 2296—2301.
14. Jackson R. L., Aprison M. H., (1966), *J. Neurochem.*, 13, 1351—1365.
15. Nachmansohn D., (1955), *Harvey Lectures*, 49, 57—99.
16. Nachmansohn D., (1970) w Protein Metabolism of The Nervous System, red. Lajtha A., str. 313—333, Plenum Press, New York.
17. Feldberg W., (1957) w Metabolism of The Nervous System, red. Richter D., str. 493—510, Pergamon Press, New York.
18. Hebb C. O., (1963) w Handbook of Experimental Pharmacology, red. Koelle G. B., t. 15, str. 56—88, Springer Verlag, Berlin.
19. Hubbard J. I., (1970), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 21, 33—124.
20. Silver A., (1971), *Progr. Brain Res.*, 34, 345—355.
21. Hokin L. E., Hokin M. R., (1960), *Int. Rev. Neurobiol.*, 2, 99—136.
22. Hokin L. E., (1967), *Neurosci. Res. Progr. Bull.*, 5, 26—31.
23. Cohen J. A., Oosterbaan R. A., (1963) w Handbook of Experimental Pharmacology, red. Koelle G. B., str. 299—373, Springer-Verlag, Berlin.
24. Froede H. C., Wilson I. B., (1971) w The Enzymes, red. Boyer P. D., t. 5, str. 87—114, Academic Press, New York.
25. Breskin A. P., Godovikov N. N., Godyna E. I., Kabachnik M. J., Mikhelson M. Y., Rozengart E. V., Yakovlev N. A., (1964), *Dokl. Akad. Nauk S.S.S.R.* 158, 880—883.
26. O'Brien R. D., (1969), *Biochem. J.*, 113, 713—719.
27. Galley K. T., de Sorgo M., Prins W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 300—307.
28. Krupka R. M., (1966), *Biochemistry*, 5, 1988—1998.
29. Krupka R. M., Laidler K. J., (1961), *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 1445—1458.
30. Kato G., Tan E., Yung J., (1972), *Nature*, 236, 185—200.
31. Kato G., Tan E., Yung G., (1972), *J. Biol. Chem.*, 247, 3186—3189.
32. Monod J., Changeux J-P., Jacob F., (1963), *J. Mol. Biol.*, 6, 306—329.
33. Changeux J-P., (1966), *J. Mol. Pharmacol.*, 2, 369—370.
34. Changeux J-P., Leuzinger W., Huchet M., (1968), *FEBS Letters*, 2, 77—80.
35. Brownson C., Watts D. C., (1973), *Biochem. J.*, 131, 369—374.

36. Wilson I. B., (1967), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **144**, 664—674.
37. Wilson I. B., (1971) w *Cholinergic Ligand Interactions*, red. Triggle D. J., Moran J. F., Barnard E. A., str. 1—18, Academic Press, New York.
38. Rosenberry T. L., Bernhard S. A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4308—4321.
39. Rothenberg M. A., Nachmansohn D., (1947), *J. Biol. Chem.*, **168**, 223—231.
40. Kremzner L. T., Wilson I. B., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1714—1717.
41. Leuzinger W., Goldberg M., Cauvin E., (1969), *J. Mol. Biol.* **40**, 217—225.
42. Millar D. B., Grafius M. A., (1970), *FEBS Letters*, **12**, 61—64.
43. Dudai Y., Silman I., Kalderon N., Blumberg S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 138—157.
44. Massoulié J., Rieger F., Bon S., (1970), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **270**, 1837—1840.
45. Powell J. T., Bon S., Rieger F., Massoulié J., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 17—22.
46. Grafius M. A., Bond H. E., Millar D. B., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **22**, 382—390.
47. Millar D. B., Grafius M. A., Palmer D. A., Millar G., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 425—433.
48. Leuzinger W., Baker A. L., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **57**, 446—451.
49. Leuzinger W., (1971) w *Cholinergic Ligand Interactions*, red. Triggle D. J., Moran J. F., Barnard E. A., str. 19—31, Academic Press, New York.
50. Leuzinger W., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 139—141.
51. Froede H. C., Wilson I. B., (1970), *Israel J. Med. Sci.*, **6**, 179—184.
52. Grafius M. A., Millar D. B., (1967), *Biochemistry*, **6**, 1034—1046.
53. Dudai Y., Silman I., Shinitzky M., Blumberg S., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2400—2403.
54. Ciliv G., Özand P. T., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 136—156.
55. Mautner H. G., (1969), *J. Gen. Physiol.*, **54**, 271—277.
56. Bellhorn M. B., Blumenfeld O. O., Gallops P. M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **39**, 267—273.
57. Shafai T., Cortner J. A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 612—618.
58. Lawler H. C., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 132—137.
59. Toschi G., (1959), *Exp. Cell Res.*, **16**, 232—255.
60. Aldridge W. N., Johnson M. K., (1959), *Biochem. J.*, **73**, 270—276.
61. Kuenzle C. C., Pelloni R. R., Kistler G. S., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2333—2339.
62. Jackson R. L., Aprison M. H., (1966), *J. Neurochem.*, **13**, 1367—1371.
63. Ho I. K., Ellman G. L., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1505—1513.
64. Crone H. D., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 489—497.
65. McIntosh C. H. S., Plummer D. T., (1973), *Biochem J.*, **133**, 655—665.
66. Kaplay S. S., Jagannathan V., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**, 48—57.
67. Chan S. L., Shirachi D. Y., Trevor A. J., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 437—447.
68. Hollunger E. G., Niklasson B. H., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 821—836.
69. Cotman C. W., Levy W., Baulier G., Taylor D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 406—418.
70. Skangiel-Kramska J., (1973), *Praca doktorska*.
71. Chan S. L., Shirachi D. Y., Bhargava H. N., Gardner E., Trevor A. J., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2747—2758.

72. Barrantes F. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 395—402.
73. Shirachi D. Y., Chan S. L., Bhargava H. N., Gardner E., Trevor A. J., (1972), *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **15**, 132—135.
74. Bernsohn J., Barron K. D., Hess A. R., (1962), *Nature*, **195**, 285—286.
75. Maynard E. A., (1964), *J. Exp. Zool.*, **157**, 251—266.
76. Beckendorf G. W., Stephen W. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **201**, 101—108.
77. Eldefrawi M. E., Tripathi R. K., O'Brien R. D., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 308—314.
78. Kankel D. R., DeNiro M., (1971), Biology Annual Report, str. 73, California Institut of Technology, Pasadena.
79. Davis G. A., Agranoff B. W., (1968), *Nature*, **220**, 277—280.
80. Patočka J., Bajgar J., (1969), *FEBS Letters*, **2**, 195—197.
81. Baldwin J., Hochachka P. W., (1970), *Biochem J.*, **116**, 883—887.
82. Lim R., Davis G. A., Agranoff B. W., (1971), *Brain Res.*, **25**, 121—131.
83. Coates P. M., Simpson N. E., (1972), *Science*, **175**, 1466—1467.
84. IUPAC IUB Commission on Biochemical Nomenclature, (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 1—3.
85. Bernsohn J., Barron K. D., Hedrick M. T., (1963), *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 761—763.
86. Christoff N., Anderson P. J., (1966), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **136**, 150—162.
87. Bajgar J., Žižkovský V., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1609—1614.
88. Skangiel-Kramska J., Niemierko S., (1971), *Bull. Acad. Pol. Sci. ser. Sci. Biol.*, **19**, 389—393.
89. Wilson B. W., Mettler M. A., Asmundson R. V., (1969), *J. Exp. Zool.*, **172**, 49—58.
90. Hall Z. W., (1973), *J. Neurobiol.*, **4**, 343—361.
91. Bernsohn J., Barron K. D., Hess A. R., Hedrick M. T., (1963), *J. Neurochem.*, **10**, 783—794.
92. Maynard E. A., (1966), *J. Exp. Zool.*, **161**, 319—336.
93. Barron K. D., Ordinario A. T., Bernsohn J., Hess A. R., Hedrick M. T., (1968), *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 346—361.
94. Wilson B. W., Schenkel J. L., Fry D. M., (1971) w *Cholinergic Ligand Interactions*, red Triggie D. J., Moran J. F., Barnard E. A., str. 137—174, Academic Press, New York.
95. Skangiel-Kramska J., Niemierko S., Kłodos I., (1972), w *Symposium on Structure and Function of Normal and Diseased Muscle and Peripheral Nerve*, Kazimierz, 18—20 maj, str. 24.
96. Koelle W. A., Hossaini K. S., Akbarzadeh P., Koelle G. B., (1970), *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 812—819.
97. Brzin M., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **56**, 1560—1563.
98. Tennyson V. M., Brzin M., Duffy P., (1968), *Progr. Brain Res.*, **29**, 41—62.
99. Schlaepfer W. W., Torack R. M., (1966), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 369—378.
100. Kása P., (1968), *Nature*, **218**, 1265—1267.
101. Tennyson V. M., Brzin M., Kremzner L. T., (1973), *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 639—652.
102. Masters C. J., Holmes R. S., (1972), *Biol. Rev.*, **47**, 309—361.
103. Massoulié J., Rieger F., Tsuji S., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 430—439.
104. Massoulié J., Rieger F., Bon S., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **21**, 542—551.

105. Rieger F., Bon S., Massoulié J., Cartaud J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 539—547.
106. Dudai Y., Herzberg M., Silman I., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2473—2476.
107. Massoulié J., Rieger F., Cartaud J., Bon S., (1973), IXth Inter, Cong. Biochem., Stockholm, Abstract No 5b1, str. 258.
108. Rieger F., Bon S., Massoulié J., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 12—16.

VLADIMIR PODRAŽKY*

Konwersja tropoelastyny w elastynę oraz molekularna organizacja włókien elastycznych

Conversion of Tropoelastin to Elastin and Molecular Organisation of Elastic Fibres

W ostatnim okresie osiągnięto znaczny postęp w badaniach struktury elastyny, głównego włókienkowego białka tkanki elastycznej. Wyjaśniono szczegółowo strukturę i biosyntezę wiązań poprzecznych oraz odkryto i izolowano rozpuszczalny prekursor elastyny — tropoelastynę. Uzyskano w ten sposób punkt wyjścia dla dalszych szczegółowych badań fibrogenazy elastyny oraz jej funkcji w tkance łącznej.

Praca niniejsza zajmuje się głównie powyższymi zagadnieniami; elastyna była już przedmiotem szeregu artykułów przeglądowych (1—8).

I. Rozpuszczalny prekursor elastyny

Zarówno elastyna jak i kolagen występują w tkance łącznej w postaci nierozpuszczalnych włókien. Przypuszczano więc, że dojrzała, nierozpuszczalna elastyna powstaje podobnie jak kolagen, w wyniku agregacji cząsteczek rozpuszczalnego monomeru. Próbowano początkowo uzyskać taki monomer z izolowanej elastyny. Okazało się jednak, że w odróżnieniu od kolagenu (9) elastyna nie daje się upłynnić bez naruszenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań kowalencyjnych (10). W wyniku częściowej hydrolizy kwaśnej otrzymano dwie heterogenne grupy rozpuszczalnych produktów degradacji wyraźnie różniące się od siebie masą cząsteczkową, które nazwano α - i β -elastyną (10, 11). Żadnego z tych białek nie można było jednak uznać za strukturalną podjednostkę elastyny. Wykazano natomiast, że w wiązadle karkowym królika występują śladowe ilości rozpuszczalnego białka immunologicznie spokrewnionego z elastyną (12). Wcześniej zaobserwowano, że deficyt miedzi (13—16) oraz podawanie latyrogenów (16, 17) wywołują u młodych zwierząt uszkodzenia tkanki elastycznej,

* Kand. n. biol., Czeska Akademia Rolnicza, Instytut Naukowo-Badawczy Przemysłu Spożywczego, Praga CSRS.

a elastyna izolowana z tkanek tych zwierząt posiada zwiększoną rozpuszczalność (18—20). Smith i wsp. (21), jako pierwsi wyizolowali z aort prosiąt z niedoborem miedzi rozpuszczalne białko, które podobnie jak α -elastyna (10, 22), posiadało zdolność do „koacerwacji”, czyli odwracalnego wypadania z roztworu podczas ogrzewania. Białko to dawało się ekstrahować z tkanki kwaśnymi buforami o niewielkiej sile jonowej i przypominało składem aminokwasowym elastynę. Zostało ono następnie chromatograficznie oczyszczone do stanu homogenności i przez analogię do tropokolagenu nazwane tropoelastyną (23, 24). Skład aminokwasowy tropoelastyny przedstawiono w tabeli 1. Jest on zbliżony do składu nierozpuszczalnej elastyny. Tropoelastyna charakteryzuje się jednak wyższą zawartością lizyny niż elastyna, oraz brakiem desmozyny i izodesmozyny. N-końcowym aminokwasem tropoelastyny okazała się glicyna, znaleziono natomiast aż trzy aminokwasy z wolną grupą karboksylową, a mianowicie glicynę, alaninę i serynę.

Tabela 1

Skład aminokwasowy tropoelastyny (ilość reszt na 1000 aminokwasów (24))

Aminokwas	Tropoelastyna	Dojrzała elastyna
Kwas asparaginowy	2,9	8,8
Hydroksyprolina	11,2	14,5
Treonina	13,8	7,4
Seryna	9,4	8,1
Kwas glutaminowy	18,3	20,9
Prolina	108,8	93,8
Glicyna	333,7	328,9
Alanina	218,1	233,3
1/2 cystyna	0,0	0,0
Walina	120,6	124,9
Metionina	0,0	1,7
Izoleucyna	18,8	19,6
Leucyna	46,2	57,4
Tyrozyna	15,6	16,9
Fenylalanina	27,9	32,3
1/4 izodesmozyna	0,0	8,1
1/4 desmozyna	0,0	8,3
Lizyna	47,5	7,6
Histydyna	0,0	1,1
Arginina	7,1	6,6

Peptydy otrzymane z tropoelastyny oraz z nierozpuszczalnej elastyny w wyniku trawienia elastazą zostały następnie rozdzielone metodą „odciszków palców” (24). Wykazano, że większość peptydów jest wspólna obu białkom lecz w hydrolizacie tropoelastyny występuje więcej peptydów o dużej

ruchliwości elektroforetycznej. Jest to prawdopodobnie konsekwencja większej zawartości lizyny w tropoelastynie. Poddanie tropoelastyny działaniu trypsyny i analiza peptydów w hydrolizacie wykazała, że poszczególne peptydy występowały w ilości dwóch moli na 1 mol białka, co wyliczono biorąc za podstawę obliczeń masę cząsteczkową tropoelastyny 68 000 (23, 24). Autorzy sądzą więc, że tropoelastyna jest dimerem powstałym być może w czasie preparatyki, a podstawową podjednostką strukturalną elastyny jest białko o masie cząsteczkowej około 34 000. Gdyby jednak tropoelastyna nie była kompleksem dwu identycznych cząsteczek o masie cząsteczkowej 34 000, lecz monomerem o masie 68 000 — to fakt występowania w niej dwukrotnie powtarzających się identycznych odcinków łańcuchów peptydowych należałoby tłumaczyć duplikacją genu (24).

Z aorty prosiąt z niedoborem miedzi otrzymano również rozpuszczalne białko spokrewnione z nierozpuszczalną elastyną (25). Uzyskany przez ekstrakcję roztworami elektrolitów o znacznej sile jonowej i oczyszczony preparat był homogeny. Skład aminokwasowy tego białka (tabela 2) jest podobny do składu aminokwasowego nierozpuszczalnej elastyny.

Tabela 2

Skład aminokwasowy elastyny rozpuszczalnej w roztworze soli (ilość reszt na 1000 aminokwasów, (25))

Aminokwas	Elastyna rozpuszczalna w solach	Elastyna nierozpuszczalna
Hydroksypolina	9	10
Kwas asparaginowy	3	10
Treonina	13	13
Seryna	10	12
Kwas glutaminowy	15	21
Prolina	92	91
Glicyna	287	269
Alanina	203	191
Walina	116	103
Metionina	—	2
Izoleucyna	14	17
Leucyna	40	47
Tyrozyna	14	15
Fenylalanina	23	27
Desmozyna	—	10
Lizyna	38	7
Histydyna	—	1
Arginina	4	8

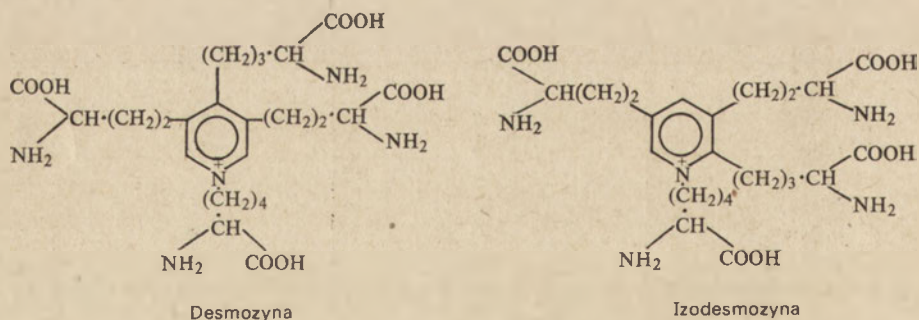
Podobnie jak w przypadku tropoelastyny, nie stwierdzono w tym białku ani wiązań poprzecznych ani i ich prekursorów. Zawartość lizyny była również w nim wyższa niż w elastynie. Ponieważ masa cząsteczkowa te-

go białka, oznaczona metodą równowagi sedymentacyjnej (74 000) jest zbliżona do masy cząsteczkowej tropoelastyny, wysoce prawdopodobne jest, że w obu przypadkach chodzi o to samo białko.

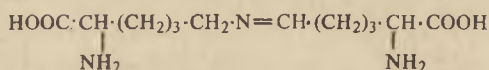
Po inkubacji aorty zarodków kurzych w środowisku zawierającym ^{14}C -glicynę, ^{14}C -prolinę, ^{14}C -alaninę i ^{14}C -walinę wykazać można radioaktywność w dwu frakcjach białkowych o masie cząsteczkowej 68 000 i 100 000, przy czym ^{14}C -walina była wbudowywana niemal wyłącznie do lżejszego białka, zaś więcej ^{14}C -proliny znaleziono w cięższej frakcji (25). Wydaje się więc prawdopodobne, że lżejsze białko można identyfikować z tropoelastyną zawierającą znaczne ilości waliny, a cięższe z tropokolagenem, który charakteryzuje wysoka zawartość proliny. Doświadczenia te obok wymienionych już doświadczeń immunologicznych (12) wykazują występowanie rozpuszczalnego prekursora elastyny w prawidłowej tkance elastycznej.

II. Wiązania poprzeczne

Pierwszym krokiem do wytworzenia dojrzałej, nierozpuszczalnej elastyny z rozpuszczalnego jej prekursora jest biosynteza wiązań poprzecznych. W chwili obecnej znana jest struktura czterech rodzajów wiązań międzylańcuchowych powstających w wyniku przemian reszt lizyny (27—35) występującej w znacznej ilości w tropoelastynie, a w dużo mniejszej ilości w dojrzałym białku. Są to desmozyna, izodesmozyna, merodesmozy-na i lizyno-norleucyna (Ryc. 1, 2, 3). Ich grupy aminowe i karboksylowe są zaangażowane w wiązania peptydowe różnych łańcuchów elastyny. Wo-

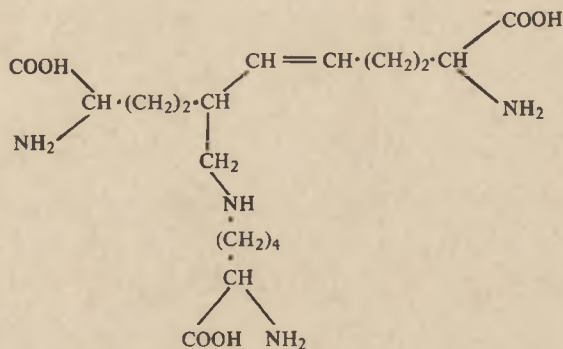


Ryc. 1. Struktura a — desmozyiny i b — izodesmozyiny (27)



Ryc. 2. Struktura merodesmozyiny (35)

bec tego, desmozyrna i izodesmozyrna mogą stanowić połączenie między dwoma, trzema lub czterema łańcuchami, merodesmozyrna może łączyć dwa lub trzy, zaś lizynonorleucyna dwa łańcuchy polipeptydowe (6, 8). Desmozyrna i izodesmozyrna stanowią w pełni ukształtowane formy wiązań zaś merodesmozynę i lizynonorleucynę można uważać za produkty pośrednie biosyntezy dwu poprzednich związków. Schemat biosyntezy tych wiązań został zestawiony przez F r a n z b l a u ' a (8) oraz P a z i wsp. (36). Pierwszym etapem jest oksydacyjna deaminacja niektórych reszt lizylowych prowadząca do powstania δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego. Reszta tego aldehydu może następnie reagować z inną taką resztą (kondensacja aldolowa), lub też z resztą niezmienionej lizyny (wytworzenie zasady Schiffa) w sąsiadującym łańcuchu polipeptydowym. Zasada Schiffa (dehydrolizynonorleucyna) jest następnie redukowana do lizynonorleucyny (Ryc. 3). Produkt kondensacji aldolowej po odwodorowaniu wchodzi



Ryc. 3. Struktura lizynonorleucyny (34 i 34a)

w reakcję z resztą lizylową kolejnego łańcucha tworząc dehydromerodesmozynę. Ten ostatni związek może być redukowany do merodesmozyryny (Ryc. 2) lub też wchodzić w reakcję z kolejną resztą δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego tworząc kolejno 2-hydrokso-5,6-dehydromerodesmo-piperydynę, która po odszczepieniu cząsteczki wody i utlenieniu przechodzi w desmozynę (Ryc. 1). Obecność merodesmozyryny została stwierdzona w elastynie po raz pierwszy przez S t a r c h e r ' a i wsp. (35).

Izodesmozyrna mogłaby być syntetyzowana w następujący sposób: wspomniany już pierwszy produkt kondensacji aldolowej może reagować z dehydrolizynonorleucyną dając 4-hydrokso-2,3-dehydroizodesmopiperydynę, która po odszczepieniu cząsteczki wody i utlenieniu przechodzi w izodesmozynę (Ryc. 1). Postulowano również (37), że dwutyrozyna znaleziona w niewielkiej ilości w aorcie kurczą, a nie znaleziona w wiązadle karkowym (38) może również poprzecznie wiązać łańcuchy w elastynie.

III. Powstanie, struktura i właściwości mechaniczne włókien elastycznych

Badania w mikroskopie elektronowym wykazały, że włókno elastyczne składa się z dwu różnych składników: substancji amorficznej, przepuszczalnej dla elektronów, zajmującej centralną część włókna oraz substancji mikrofibrylarnej, dającej się uwidocznić solami osmu, ołowiu i uranu, usytuowanej na obwodzie (39, 40). Pod względem składu aminokwasowego, substancja amorficzna odpowiada elastynie, zaś substancja mikrofibrylar-na ma charakter glikoproteidu o wyraźnie różnym składzie aminokwasów (39—41). Podczas rozwoju embrionalnego substancja mikrofibrylar-na pojawia się wcześniej niż składnik amorficzny. Mikrofibryle pojawiają się na powierzchni komórek, a ich organizacja wydaje się pozostawać pod kontrolą komórki. Prawdopodobnie odgrywają one jakąś rolę w późniejszej morfogenezie włókna elastycznego po pojawieniu się substancji amorficznej w przestrzeniach międzykomórkowych (40). Sytuacja byłaby więc podobna do tej, jaka ma miejsce w przypadku kolagenu, który oddziałuje z glikoproteidami substancji podstawowej tkanki łącznej (42—44), którym z kolei przypisuje się udział w powstawaniu włókna kolagenowego (45).

Własności mechaniczne tkanki łącznej zależą od zawartości w niej elastyny i kolagenu. Elastyna nadaje tkance sprężystość, zaś kolagen, wytrzymałość na rozciąganie. Włókno elastyczne jest uważane za niemal idealny elastomer (46), posiada bowiem wszystkie własności charakterystyczne dla tej grupy polimerów, a mianowicie:

- pod wpływem obciążenia gwałtownie zwiększa (kilkukrotnie) swoją długość, przy niewielkiej stracie energii w formie ciepła;
- w stanie wydłużonym posiada bardzo dużą wytrzymałość na rozciąganie;
- po zwolnieniu napięcia szybko wraca do pierwotnej długości.

Posiadanie takich własności implikuje *a priori* pewne cechy strukturalne polimeru. Powinien on zawierać długie łańcuchy o znacznej swobodzie, w jego cząsteczkach jednakże powinny występować wiązania poprzeczne, utrzymujące łańcuchy polipeptydowe we wzajemnym kontakcie. Ilość tych wiązań nie powinna być duża, ażeby nie usztywnić struktury, powinna być natomiast wystarczająca, aby spowodować powrót łańcuchów polimeru do pierwotnego położenia. W przypadku białek musi być spełniony jeszcze jeden warunek: oddziaływanie wzajemne grup polarnych — mogące ograniczać swobodę łańcuchów — powinno być osłabione na przykład przez obecność polarnego rozpuszczalnika.

Powyższe implikacje znajdują potwierdzenie w dostępnych danych o strukturze elastyny. Łańcuchy polipeptydowe tego białka znajdują się prawdopodobnie w stanie przypadkowego zwinienia, w każdym razie nie stwierdzono w nim uporządkowania struktury jakie występuje np. w kolagenie. Niewielka liczba i znaczne rozmiary wiązań poprzecznych umożliwiają znaczne odkształcenia struktury elastyny. Ponieważ blisko 90%

aminokwasów elastyny to aminokwasy o niepolarnych łańcuchach bocznych, nie występują znaczące oddziaływania elektrostatyczne ani wzdłuż łańcuchów ani między łańcuchami polipeptydowymi.

Partridge (47) opracował korpuskularny model struktury elastyny, niesprzeczny z wymogami sprężystości. Model powstał w oparciu o wyniki badań nad biosyntezą desmoczynowych wiązań poprzecznych oraz obserwacje zachowania się cukrowców o różnej masie cząsteczkowej podczas sączenia na kolumnie wypełnionej spęczniałą elastyną. Włókno elastyczne powstaje z wielu cząsteczek globularnej, rozpuszczalnej tropoelastyny, w wyniku tworzenia wiązań poprzecznych. Cząsteczka tropoelastyny ma być tworem dwułańcuchowym uformowanym — podobnie jak cząsteczka hemoglobiny — o grupach hydrofilowych skierowanych ku powierzchni cząsteczki, której hydrobofową część środkową stanowi tak zwany „trzon”. Każda cząsteczka elastyny posiada cztery pary reszt lizylowych, które po odpowiednim przekształceniu (rozdział II) wchodzą w reakcję z odpowiadającymi im resztami lizyny sąsiadującej cząsteczki wytwarzając wiązania poprzeczne. Jedna cząsteczka może wytworzyć takie wiązania z czterema sąsiadującymi cząsteczkami prekursora. W ten sposób globularne podjednostki uporządkowane w układzie tetrahedralnym tworzą sprężystą strukturę trójwymiarową. Przy założeniu kulistego kształtu cząsteczek prekursora, objętość przestrzeni między cząsteczkami powinna wynosić 66% objętości całkowitej polimeru. Z tą teoretyczną wartością dobrze zgadza się eksperymentalnie oznaczona zawartość wody w spęczniałej elastynie wynosząca 63% (48). Masa cząsteczkowa globularnych podjednostek została oszacowana na około 50 000 na podstawie zawartości desmoczyn w elastynie (48). Jest więc zbliżona do masy cząsteczkowej izolowanej tropoelastyny.

IV. Wzajemne oddziaływanie elastyny z innymi komponentami tkanki łącznej i solami wapnia

Jak już wspomniano, sprężystość włókien białkowych uwarunkowana jest obecnością wody. W stanie odwodnienia białka nie mogą wykazywać własności elastomerów ponieważ dochodzi wtedy do zbliżania się łańcuchów polipeptydowych i występowania silnych oddziaływań elektrostatycznych usztywniających strukturę (1). Elastyna zawiera około 90% reszt aminokwasów niepolarnych, wobec czego jej zdolność do wiązania wody jest niewielka. Przyjmuje się, że rolę utrzymywania odpowiedniego uwodnienia spełniają w tkance łącznej glikoproteidy i kolagen, zawierają one bowiem duże ilości aminokwasów polarnych.

Wspomniano już o oddziaływaniu elastyny z glikoproteidami, które prawdopodobnie odgrywają jakąś rolę w fibrogenезie. Banga i wsp. (49) na podstawie obserwacji morfologicznych wywnioskowali, że włókna

elastyczne aorty i wiązadła karkowego otoczone są „mukoidem” i włóknami kolagenu. W takim układzie kolagen traci niektóre charakterystyczne własności na przykład nie ulega kontrakcji termicznej ani w środowisku alkalicznym, ani w kwaśnym. Natomiast po usunięciu elastyny przez trawienie elastazą trzustkową typowe własności pojawiają się na powrót.

W procesie starzenia się jak i w niektórych stanach patologicznych mineralizacja tkanki elastycznej odgrywa ważną rolę. Proces ten pociąga za sobą obniżenie się zawartości w tkance glikozoaminoglikanów i glikoproteidów oraz utratę sprężystości (50). Wśród różnych morfologicznych składników ściany naczyniowej, włókna elastyczne mają największe powinowactwo do wapnia (51, 52). Tylko niewielka ilość wapnia daje się usunąć z elastyny przy pomocy kwasu etylenodwuaminoczwerooctowego, pozostała część stanowi silnie związane sole wapnia (53). Wiązanie wapnia nie zachodzi poniżej pH 5,5 i zwiększa się wraz ze wzrostem pH (54). Za wiązanie wapnia do elastyny mają być odpowiedzialne grupy sulfhydrylowe i karboksylowe oraz, być może, wolne grupy aminowe zlokalizowane w nielicznych obszarach polarnych elastyny (52, 54).

Artykuł wpłynął 14.10.1972, po rewizji autorskiej wrócił 8.9.1973.

PIŚMIENNICTWO

1. Partridge S. M., (1962), *Adv. Protein Chem.*, **17**, 227—302.
2. Ardel W., (1964), *Post. Biochem.*, **10**, 245—264.
3. Ayer J. P., (1964), *Intern. Rev. Connect. Tissue* **2**, 33—100.
4. Banga I., (1966), w *Structure and Function of Elastin and Collagen*, red. North J., 3—18, Akadémiai Kiadó, Budapest.
5. Seifter S., Gallop P. M., (1966), w *The Proteins*, red. Neurath H. t. 4, 153—458, Academic Press, New York.
6. Ardel W., (1968), *Post. Biochem.*, **14**, 105—117.
7. Piez K. A., (1968), *Ann. Rev. Biochem.* 547—562.
8. Franzblau C., (1971), *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M. i Stotz E. H., t. 26, część C, 659—712, Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
9. Gross J., Highberger J. H., Schmitt F. O. (1954), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **40**, 679—688.
10. Partridge S. M., Davis H. F., Adair G. S., (1955), *Biochem. J.* **61**, 11—21.
11. Podrazky V., (1967), *Nature* **215**, 1162.
12. Jackson D. S., Sandberg L. B., Cleary E. G., (1966), *Nature* **210**, 195—196.
13. Carlton W. W., Henderson W., (1963), *Nutrition* **81**, 200—208.
14. O'Dell B. L., Hardwick B. D., Reynolds G., Savage J., (1961), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **108**, 2402—2405.
15. Simpson C. F., Harms R. H., (1964), *Exp. Mol. Path.*, **3**, 390—400.
16. O'Dell B. L., Eldsen D. F., Thomas J., Partridge S. M., Smith R. H., Palmer R., (1965), *Biochem. J.* **96**, 35.
17. Savage J. E., Ross D. A., Reynolds G., O'Dell B. L., (1962), *Fed. Proc.*, **21**, 311.

18. Kimball D. A., Coulson W. F., Carnes W. H., (1964), *Exp. Mol. Path.*, **3**, 10—18.
19. O'Dell B. L., Bird D. W., Ruggles D. L., Savage J. E., (1966), *J. Nutr.* **88**, 9—14.
20. Walker D. G., (1957), *Arch. Path.*, **64**, 134—445.
21. Smith D. W., Weissman N., Carnes W. H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 309—315.
22. Partridge S. M., Elsden D. F., Thomas J., (1963), *Nature* **197**, 1297—1298.
23. Sandberg L. B., Weissman N., Gray W. R., (1971), *Biochemistry* **10**, 52—56.
24. Sandberg L. B., Weissman N., Smith D. W., (1969), *Biochemistry* **8**, 2940—2945.
25. Smith D. W., Brow D. M., Carnes W. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2427—2432.
26. Murphy L., Harsh M., Mori T., Rosenbloom J., (1972), *FEBS Letters* **21**, 113—117.
27. Partridge S. M., Elsden D. F., Thomas J., Dorfman A., Telser A., Ho P. L., (1964), *Biochem. J.*, **93**, 30c—33c.
28. Partridge S. M., Elsden D. F., Thomas J., Dorfman A., Telser A., Ho P. L., (1966), *Nature* **209**, 399—400.
29. Miller E. J., Martin G. R., Piez K. A., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 248—253.
30. Miller E. J., Martin G. R., Piez K. A., (1965), *Fed. Proc.* **24**, 359.
31. Serafini-Fracassini A., Tristram G. R., (1966), *Proc. R. Soc. Edinburgh B* **69**, 334—341.
32. Anwar R. A., Oda G., (1966), *Nature* **210**, 1254—1255.
33. Anwar R. A., Oda G., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **133**, 151—156.
34. Franzblau C., Sinex F. M., Farris B., Lampidis R., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 575—581.
- 34a. Franzblau C., Farris B., Papaioannou R. (1969), *Biochemistry* **8**, 2833—2900.
35. Starcher B. C., Partridge S. M., Elsden D. F., (1971), *Biochemistry* **6**, 2425—2432.
36. Paz M. A., Gallop P. M., Blumenfeld O. O., Henson E., Seifter S., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 289—297.
37. La Bella F. S., Keeley F., Virian S., Thornhill D., (1967), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 748—753.
38. Keeley F. W., La Bella F., Queen G., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 156—161.
39. Robert B., Sziegeti M., Deruette J. C., Robert L., (1971), *Eur. J. Biochim.*, **2**, 507—516.
40. Ross R., Bornestein P., (1969), *J. Cell Biol.*, **40**, 366—381.
41. Mollinari-Tossati M. P., Gotte L., Moret V., (1971), *Calcified Tissue Res.*, **6**, 329—334.
42. Lowther D. A., Toole B. P., Herrington A. C., (1970) w *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* red. Balazs E. A., 1135—1153 Academic Press, London, New York.
43. Hoffman P., Mashburn T. A., (1970) w *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix* red. Balazs E. A., 1179—1199 Academic Press, London, New York.
44. Podrazky V., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 277—279.
45. Mathews M. B., Decker L., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 517—526.
46. Hoeve C. A. J., Flory P. J., (1958), *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6523—6526.

47. Partridge S. M., (1966), *Fed. Proc.*, 25, 1033—1039.
48. Partridge S. M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 140, 132—141.
49. Banga I., Loeven W. A., Romhányi G., (1965), *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.*, 13, 385—395.
50. Yu S. Y., Blumenthal H. T., (1963), *J. Gerontol.*, 18, 119—126.
51. Yu S. Y., (1965), w Cowdry's Artherosclerosis red. Blumenthal H. T., 170—192, C. C. Thomas Springfield, III, USA.
52. Urry D. W., Krivacic J. R., Haider J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 6—11.
53. Hall D. A., (1970), *Gerontologia* 16, 325—339.
54. Moczar M., Robert L., (1970), *Artherosclerosis* 11, 7—26.

HALINA GABRYŚ-MIZERA *

Fotobiologiczna rola flawin i flawoproteidów w tkankach roślinnych

The Photobiological Role of Flavins and Flavoproteins in Plant Tissues

Flawiny są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślinnym. Zdolność do absorpcji światła w zakresie widzialnym i łatwość z jaką wzbudzone flawiny ulegają reakcjom oksydoredukcyjnym, predestynuje je do pełnienia roli fotoreceptorów w różnych procesach, związanych z reakcjami świetlnymi roślin. Za pośrednictwem enzymów flawinowych światło może między innymi regulować fotosyntetyczny metabolizm węgla (1, 2) i metabolizm azotu (2).

Budowa i nomenklatura flawin oraz niektóre aspekty struktury i funkcji flawoproteidów zostały omówione w Postęпах Biochemii, w artykułach Gardasa (3) i Chełkowskiego (4).

W artykule niniejszym przedstawiono udział wzbudzonych flawin w reakcjach szlaku glikolanowego i redukcji azotanów. Procesy te są jednymi z lepiej poznanych przykładów regulacji metabolizmu przez światło za pośrednictwem flawin. Omówiono także rolę flawin jako fotoreceptora uczestniczącego w reakcjach adaptacyjnych fototaktycznych i fototropicznych aparatu fotosyntetycznego.

I. Udział wzbudzonych światłem flawin w oddychaniu roślin

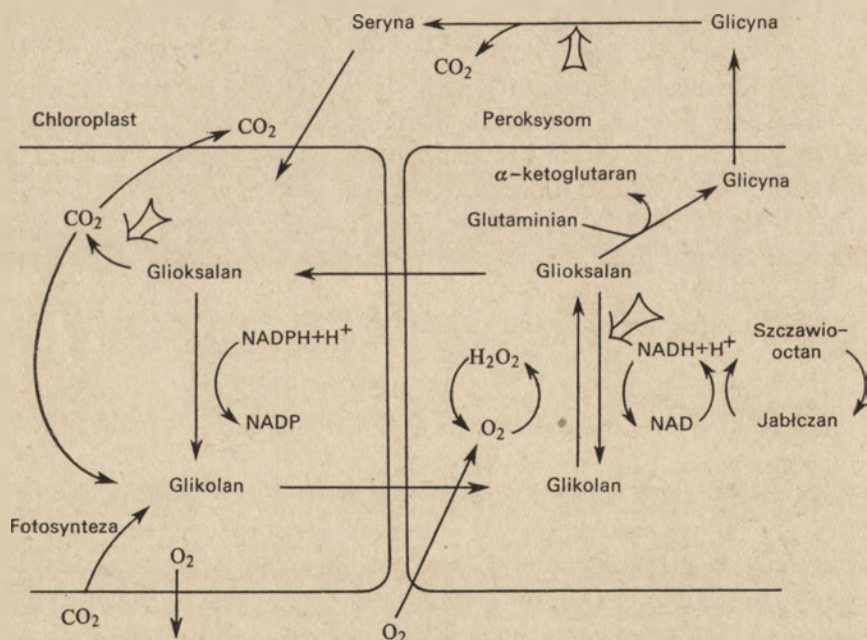
Naświetlenie większości roślin fotosyntetyzujących powoduje wzrost wydzielania dwutlenku węgla i pochłaniania tlenu w porównaniu z intensywnością tych procesów w ciemności (5—9). Ustalenie bilansu zużycowania i wydzielania O_2 i CO_2 w świetle narażać duże trudności ze względu na równoległy przebieg i wzajemne oddziaływanie: fotosyntezy,

* Mgr, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.

utlenień biologicznych oraz innych procesów metabolicznych pojawiających się w komórce pod wpływem oświetlenia. Bezpośrednio po przerwaniu oświetlenia następuje gwałtowne, okresowe wydzielenie dwutlenku węgla przez szereg roślin, przy czym ilość wydzielonego CO_2 zwiększa się ze wzrostem stężenia tlenu oraz ze wzrostem natężenia światła stosowanego do uprzedniego naświetlania rośliny (5, 6, 10, 11). Opisane gwałtowne wydzielenie CO_2 po przerwaniu oświetlenia jest dowodem występowania w komórce roślinnej szczególnych procesów oddechowych indukowanych światłem. Zastosowanie technik izotopowych, badanie oddychania na świetle przy ograniczeniu fotosyntezy przez inhibitory (12, 13), obniżone stężenie CO_2 (11) względnie podwyższone stężenie O_2 (14—16), pozwoliły na uzyskanie dokładniejszych informacji o tych procesach.

Uważa się obecnie, że światło ogranicza oddychanie mitochondrialne rośliny przebiegające normalnie w ciemności (17, 18), natomiast indukuje oddychanie związane z metabolizmem glikolanu (19—22). Glikolan powstaje w fotosyntetycznym cyklu redukcji węgla (cyklu Calvina), przy czym droga na jakiej się tworzy nie została jeszcze dostatecznie poznana (23—27). Glikolan ulega w tkance roślinnej intensywnym przemianom (Ryc. 1).

Na rycinie 1 zostały zaznaczone reakcje mogące powodować wzmoże-



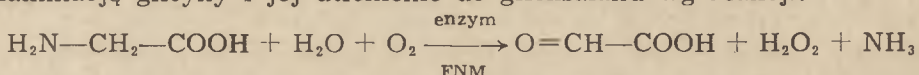
Ryc. 1. Przemiany glikolanu w komórkach roślinnych związane z procesem oddychania roślin na świetle (22)

Szerokimi strzałkami oznaczono reakcje światłoczułe.

nie oddychania na światło. Wykazano doświadczalnie wpływ światła niebieskiego na oddychanie, co przemawia za udziałem flawin w tym procesie. Zaobserwowano trzykrotny wzrost oddychania sadzonek świerka w świetle niebieskim, w stosunku do oddychania w świetle czerwonym (28). Stymulację oddychania przez światło niebieskie stwierdzono także u glonów *Anacystis* (29, 30), *Chlorella* (31—33) i w liściach *Lemna trisulca* (34). Światło niebieskie stymuluje oddychanie już przy bardzo niskich intensywnościach (34, 35). Widmo działania stymulacji świetlnego oddychania glonu *Chlorella* (31, 32) wykazuje maksima przy $\lambda = 460$ i 375nm i przypomina widmo działania światła w fototropizmie, co wskazywałoby na udział w obu procesach tego samego fotoreceptora.

Utlenienie glikolanu do glioksalanu katalizuje oksydaza, której koenzymem jest mononukleotyd flawinowy. Oksydaza glikolanowa okazała się wrażliwa na działanie światła. Stwierdzono, że aktywność tego enzymu wyizolowanego z liści tytoniu, maleje już pod wpływem słabego światła niebieskiego, natomiast nie ulega zmianie w świetle czerwonym, niezależnie od jego intensywności (36). Obniżający aktywność enzymu wpływ światła niebieskiego zostaje zniesiony przez dodanie chinonów lub pterydyn (37). Przypuszcza się, że związki te *in vivo* regulują aktywność oksydazy glikolanowej zapobiegając spadkowi jej aktywności. Mechanizm działania związków reaktywujących oksydazę glikolanową w świetle niebieskim można wyjaśnić przyjmując, że zredukowany fotoakceptor — FMN zostaje za ich pośrednictwem na nowo utleniony do formy aktywnej.

Z bezchlorofilowego mutantu *Chlorelli* zawierającego niewielką ilość FMN, odznaczającego się brakiem wykrywalnych ilości chlorofilu i karotenoidów wyizolowano oksydazę glicynową (33), enzym katalizujący dezaminację glicyny i jej utlenienie do glioksalanu wg reakcji:



Światło niebieskie stymuluje aktywność oksydazy glicynowej, przy czym dodanie FMN wzmacnia tę stymulację. Uważa się, że stymulacja światłem niebieskim utleniania glicyny za pośrednictwem wzbudzonego FMN powoduje wzmożenie oddychania mutantu glonu *Chlorella* w tym świetle (31, 33). Nie jest wykluczone, że ten sam proces jest odpowiedzialny za wzrost intensywności oddychania w świetle niebieskim także i w innych przypadkach.

Stosując technikę izotopową wykazano również, że w świetle niebieskim zawartość glikolanu w komórkach liści jest niższa niż w świetle czerwonym (38, 39). Zaobserwowano także hamujące działanie światła niebieskiego na wydzielanie glikolanu przez glony (40, 41). Efektów tych nie udało się dotychczas jednoznacznie wyjaśnić, sugerują one jednak, że flawiny biorą udział także w innych reakcjach związanych z metabolizmem glikolanu.

II. Rola wzbudzonych flawin w redukcji azotu

Azotany pobrane przez rośliny ulegają następnie redukcji do amoniaku, w tej bowiem postaci azot może być użyty do syntez organicznych w roślinie. Redukcja azotanów zachodzi dwustopniowo. Pierwszy stopień, redukcję azotanów do azotynu, katalizuje reduktaza azotanowa. Enzym ten jest metaloflawoproteidem, zawierającym molibden. Uważa się obecnie (42, 43), że reduktaza azotanowa występująca w tkankach liści (oksydoreduktaza NADPH : azotan) złożona jest z dwóch enzymów: reduktazy NADP i oksydoreduktazy FMN_{H₂}/FADH₂ : azotan. W ciemności, w obecności FMN azotan jest redukowany przez układ reduktazy NADP, w świetle przenośnikami elektronów są nukleotydy flawinowe, a NADPH nie jest konieczny do redukcji. Inni badacze uważają (44), że reduktaza azotanowa jest jednym enzymem, którego kofaktorem może być FMN_{H₂} lub NADH.

W doświadczeniach *in vitro* wykazano możliwość bezpośredniej regulacji szybkości redukcji azotanów w wyniku modyfikacji światłem aktywności reduktazy azotanowej. Intensywności procesów fotosyntezy i asymilacji azotanów w liściach pszenicy w świetle czerwonym i zielonym wykazują przebieg równoległy, podczas gdy w świetle niebieskim i fioletowym występuje znaczny względny wzrost natężenia redukcji azotanów (45). Badając aktywność reduktazy azotanowej wyizolowanej z liści pszenicy stwierdzono, że w świetle niebieskim redukcja zachodzi wyłącznie w obecności ryboflawiny (46). Przy braku ryboflawiny nie zaobserwowano żadnej aktywacji enzymu światłem. Nie wiadomo dotąd jaką rolę pełni aktywacja reduktazy azotanowej w procesie redukcji NO₃ w roślinach. Trudność sprawia rozdzielenie różnych efektów działania światła. Światło może bowiem wpływać również na poziom reduktazy azotanowej, podaż NO₃⁻ i tworzenie czynnika redukującego (44).

Niektórzy badacze postulują istnienie funkcjonalnego sprzężenia między utlenianiem glikolanu a redukcją azotanów w roślinach (47). Ostatnio przeprowadzone doświadczenia wskazują na lokalizację reduktazy azotanowej w peroksysomach, w których występuje także oksydaza glikolanowa (48, 49).

III. Flawiny jako fotoreceptor w procesie fototropizmu i reakcjach ruchowych chloroplastów

Znane powszechnie jest zjawisko wyginania się roślin lub ich organów pod wpływem jednostronnego oświetlenia w kierunku źródła światła względnie w kierunku do niego przeciwnym. Zjawisko to zwane fototropizmem spowodowane jest różnicą szybkości wzrostu po przeciwnych stronach tkanki jednostronnie oświetlonej. Różnica ta występuje wskutek

asymetrycznego rozkładu auksyny — kwasu indoliloctowego. Asymeryczny rozkład auksyny może być wynikiem jej poprzecznej migracji w naświetlonej tkance (50) lub też różnic w fotodestrukcji auksyny po obu stronach tkanki różnic występujących zwłaszcza przy dużym natężeniu padającego światła.

Na fakt, że receptorem światła w procesie fototropizmu może być ryboflawina wskazuje podobieństwo widm czynnościowych fototropizmu do widma absorpcyjnego ryboflawiny (51—53)*. Stwierdzono także, że ryboflawina uczula fotoutlenianie kwasu indoliloctowego *in vitro* (54). Widmo czynnościowe procesu fotoutleniania auksyny *in vitro*, w obecności flawiny, podobne jest do widma czynnościowego utleniania auksyny w obecności homogenatu z izolowanych epikotyli grochu. Według Galstona i wsp. (55, 56) w skład kompleksu oksydazy kwasu indoliloctowego wchodzi flawoproteid produkujący H_2O_2 i peroksydaza, utleniająca kwas indoliloctowy za pomocą H_2O_2 . Czynnikiem ograniczającym aktywność oksydazy kwasu indoliloctowego w ciemności jest H_2O_2 , natomiast na świetle wzrasta aktywność flawoproteidu, a w konsekwencji wzrasta ilość tworzonego H_2O_2 i czynnikiem ograniczającym staje się peroksydaza.

Niektórzy badacze kwestionują udział fotoutleniania kwasu indoliloctowego w fototropizmie (57, 58). Pogląd ten oparty jest na wynikach badań fotodegradacji *in vivo* kwasu indoliloctowego znaczonego węglem ^{14}C w grupie karboksylowej. W badaniach tych nie udało się stwierdzić wydzielania $^{14}CO_2$ pod wpływem oświetlenia. Przeciwno udziałowi fotodegradacji auksyny w fototropizmie przemawia dodatkowo niska wydajność kwantowa fotolizy kwasu indoliloctowego. Rolę fotoreceptorów przypisuje Thimann raczej karotenoidom, przy czym nie wyklucza rezonansowego przekazywania energii w zakresie bliskiego ultrafioletu od wzbudzonej ryboflawiny do karotenoidu (59). W widmie czynnościowym fototropizmu występuje maksimum przy 370nm. Karotenoidy występujące w badanych roślinach nie wykazują maksimum w tym rejonie widma absorpcyjnego natomiast ryboflawina posiada maksimum absorpcji przy 365nm i emituje promieniowanie fluorescencji o długościach fali absorbowanych przez karotenoidy. Współdziałanie obydwu receptorów pozwala wytłumaczyć obecność maksimum w bliskim UV w widmie czynnościowym.

Koleotypy owsa o znacznie zredukowanym sztucznie poziomie karotenoidów, a normalnej zawartości ryboflawiny, nie wykazują żadnego spadku czułości fototropicznej (60). W dyskusji nad naturą receptora światła uczestniczącego w fototropizmie jest to argument na rzecz ryboflawiny. Podobnie jak i inne, nie jest on niestety rozstrzygający.

* Widmo czynnościowe procesu fotobiologicznego jest krzywą obrazującą zależność między długością fali światła czynnego w tym procesie, a intensywnością procesu.

Ryboflawinie przypisuje się również rolę fotoreceptora w procesie fototaksji chloroplastów (61—70). Chloroplasty wielu roślin posiadają zdolność przemieszczania się w komórce pod wpływem światła. Pozycja do jakiej dążą chloroplasty w oświetlonej komórce zależy od kierunku padania światła oraz od jego intensywności. W świetle o dużej intensywności chloroplasty układają się wzdłuż ścian komórki równoległych do kierunku padania promieni. Przy małej intensywności światła dążą one natomiast do ścian prostopadłych do kierunku padania promieni. Widma czynnościowe w procesie fototaksji różnych roślin (61—65) posiadają charakter podobny do widma absorpcyjnego ryboflawiny i wykazują dwa maksima, około 450 i 370nm. W widmie czynnościowym liści *Funaria* stwierdzono także maksimum w 266nm (65). Ustawienie chloroplastów w komórce związane jest także z kierunkiem polaryzacji światła (63, 66, 67). Wskazuje to na dichroiczny charakter cząstek fotoreceptora i ich uporządkowaną orientację w komórce. Większość badaczy uważa, że fotoreceptor zlokalizowany jest w cytoplazmie (61, 63, 67), a efekt światła spolaryzowanego wskazuje na związanie cząsteczek fotoreceptora z błoną komórkową (67). Jedynie Seitz, łącząc ruch chloroplastów z wpływem światła na fosforylację oksydacyjną przypuszcza, że fotoreceptor zlokalizowany jest w mitochondriach (68).

Wywoływanie przesunięć chloroplastów przez światło o bardzo nawet niskim natężeniu wskazuje na enzymatyczną naturę procesu. Stwierdzono znaczne podobieństwo efektów światła w procesie aktywacji oddychania i fototaksji chloroplastów w komórkach rzęsy (*Lemna trisulca*) (34). Widma czynnościowe i zakresy intensywności światła czynnego są bardzo zbliżone dla obu procesów. Zurzycki (67) uważa, że proces fototaksji chloroplastów może być związany z aktywacją światłem oksydazy glicynowej, zawierającej FMN (33).

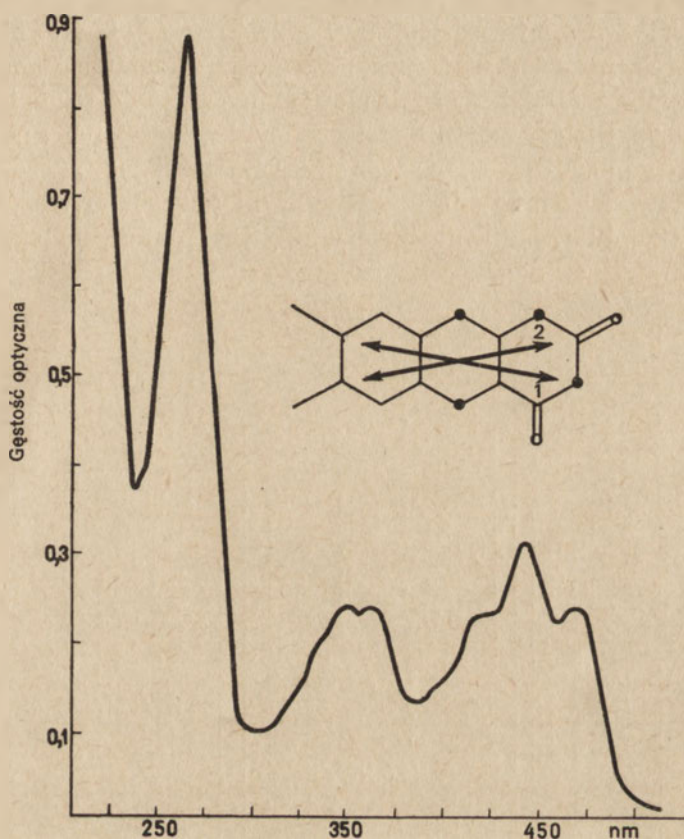
IV. Zmiany struktury elektronowej i niektóre przemiany chemiczne flawin pod wpływem światła

Jak wynika z przedstawionych wyżej rozważań flawiny odgrywają istotną rolę w niektórych procesach metabolicznych roślin regulowanych przez światło. Badania mechanizmów tych procesów spowodowały szybki rozwój badań podstawowych nad stanami wzbudzonymi związków flawinowych (72—92).

Widma absorpcyjne flawin są wynikiem występowania w ich strukturze pierścienia izoalloksazyny. Podstawniki w pierścieniu wpływają w niewielkim stopniu na krzywą absorpcji. Widmo absorpcyjne FMN (Ryc. 2) jest prawie identyczne z widmem absorpcyjnym ryboflawiny (71), natomiast w widmie FAD maksima przesunięte są nieco w kierunku czerwieni, za co odpowiedzialny jest wewnątrzcząsteczkowy kompleks, utworzony między pierścieniami izoalloksazyny i adeniny (72).

Dane analizy spektroskopowej oraz obliczenia teoretyczne pozwoliły na ustalenie poziomów energetycznych wzbudzonej cząsteczki ryboflawiny. Schematycznie przedstawiono je na rycinie 3 (73).

Najniższy singletowy stan wzbudzony S_1 ryboflawiny o charakterze $\pi\pi^*$ odpowiada pasmu absorpcyjnemu 445nm (z obliczeń 446nm). Kolejne-

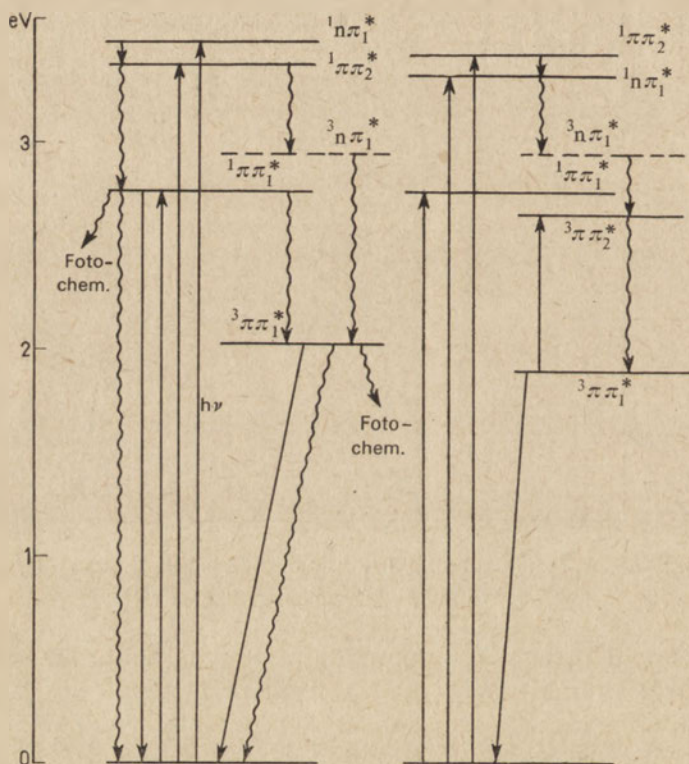


Ryc. 2. Widmo absorpcyjne ryboflawiny i polaryzacja dwóch najniższych przejść w 7,8-dwumetyloizooalloksazynie (wg 74)

mu stanowi singletowemu S_2 , odpowiadającemu maksimum w 365nm przypisuje się także charakter $\pi\pi^*$ (73). Najniższe przejście $\pi \rightarrow \pi_1^*$ jest spolaryzowane wzdłuż osi przebiegającej od N-3 do C-8, a kąt pomiędzy momentami przejść singletowych wynosi w przybliżeniu 20° (Ryc. 2) (74, 75).

Wyniki badań widm dichroizmu kołowego i polaryzacji luminescencji wskazują, że najniższy stan $n\pi^*$ leży w rejonie 340—360nm (z obliczeń 371nm), zatem energia jego znajduje się nieco powyżej stanu S_2 (73). Nie wszyscy autorzy zgadzają się z taką lokalizacją stanu $n\pi^*$ (75). Nie określono dotychczas położenia trzech pozostałych stanów $n\pi^*$, występujących w cząsteczce ryboflawiny na skutek występowania dwóch pirydynowych atomów azotu oraz dwóch atomów tlenu w grupach karbonylowych. Ry-

boflawina wykazuje słabą fosforescencję, z maksimum około 605nm, po wzbudzeniu światłem o długości fali 360—460nm, w etanolu. Na podstawie widm polaryzacji fosforescencji i obliczeń teoretycznych stwierdzono, że najniższy wzbudzony stan trypletowy ryboflawiny ma charakter $\pi\pi^*$. Obliczenia wydajności kwantowej procesów zachodzących z udziałem flawin w stanie trypletowym wskazują, że w temperaturze pokojowej, w wodzie, wewnątrzcząsteczkowe przejście $S_1 \rightarrow T_1$ jest bardzo efektywne (73). Na przykład wydajność kwantowa utleniania kwasu indoliloctowego, które zachodzi przy udziale flawiny w stanie trypletowym, wynosi około 0,72. Słabe natężenie fosforescencji ryboflawiny i niską wydajność kwantową (0,0012 w 77°K) tego procesu trudno jest pogodzić z możliwością efektywnego przejścia do stanu trypletowego. Trudność tę można wyjaśnić przyjmując istnienie bariery aktywacyjnej dla przejścia $S_1 \rightarrow T_1$.



Ryc. 3. Schemat poziomów energetycznych ryboflawiny (73)

część lewa — eksperymentalny

część prawa — teoretyczny (dla 7,8-dwumetyloizalloksazyny)

→ przejścia z udziałem promieniowania

~~~~~ przejścia bezpromienne

Fluorescencja — przejście z najniższego singletowego poziomu wzbudzonego  $1\pi\pi_1^*$  ( $S_1$ ) do poziomu podstawowego ( $S_0$ ).

Fosforescencja — przejście z najniższego trypletowego poziomu wzbudzonego  $3\pi\pi_1^*$  ( $T_1$ ) do poziomu podstawowego.

Na rysunku zaznaczono (fotochem.) stany wzbudzone ryboflawiny, których rolę w procesach fotochemicznych szczegółowo omówiono w tekście

lub możliwości efektywnego przejścia bezradiacyjnego ze stanu trypletowego do podstawowego (75).

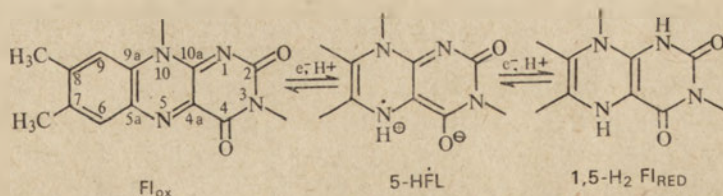
Wzbudzenie flawin do poziomów singletowych i trypletowych związane jest ze znaczną zmianą rozkładu ładunków elektronowych w cząsteczce (76—78). W stanie podstawowym, z dwóch heterocyklicznych atomów azotu typu pirydynowego, N-1 jest bardziej zasadowy od N-5. Przy wzbudzeniu cząsteczki izoalloksazyny do stanów  $S_1$  lub  $T_1$  gęstość  $\pi$ -elektronowa na atomie N-1 maleje, zaś atomie N-5 rośnie tak, że atom ten staje się bardziej zasadowy od N-1 (77).

Wzbudzona przez światło cząsteczka ryboflawiny może ulec rozpadowi dając szereg różnych produktów, w zależności od warunków reakcji. Istnieją dwie możliwe drogi rozpadu: jedna prowadząca bezpośrednio poprzez stan singletowy oraz druga przez stan trypletowy ryboflawiny (79). Podczas rozpadu ryboflawiny wzbudzonej do stanu singletowego powstaje lumichrom (7,8-dwumetyloalloksazyna), który jest głównym produktem fotolizy ryboflawiny w wodzie, w obecności tlenu. Tlen wygaszając stan trypletowy flawiny, uniemożliwia tym samym drugi typ rozpadu (73).

Lumichrom zidentyfikowano jako jedyny produkt fotorozkładu flawin *in vivo* w naświetlonych tkankach etiolowanych kielków kukurydzy i owsa (93). Fakt, że lumichrom tworzy się tylko w tkankach bezchlorofilowych, bardziej niż tkanki zielone wrażliwych na bodziec fototropiczny oraz stosunkowo wysoka wydajność tego procesu wskazują na możliwość udziału fotodegradacji flawin w reakcjach fototropicznych.

Poprzez stan trypletowy, w procesie beztlenowej fotolizy ryboflawiny, zachodzi wewnątrzcząsteczkowa fotoredukcja pierścienia izoalloksazyny wodorem, oderwanym z pozycji 2' rybitolu (79, 80). Wartości indeksów reaktywności dla atomów N-5 i N-1 wskazują, że bardziej reaktywnym w reakcji oderwania wodoru jest atom N-1 (76).

Podczas beztlenowej fotolizy ryboflawiny tworzy się dziesięć do jedenastu różnych produktów, wśród których zidentyfikowano trzy: formylometyloflawinę (7,8-dwumetylo-10-formylometyloizoalloksazynę), lumiflawinę (7,8,10-trójmetyloizoalloksazynę) i lumichrom. Lumiflawina powstaje głównie w roztworach alkalicznych, przez rozpad formylometyloflawiny (79, 81). W badaniach fotolizy ryboflawiny wobec  $D_2O$  i w pirydynie wykazano, że cząsteczka wody nie jest donorem wodoru w pierwotnej reakcji fotochemicznej (80).



Ryc. 4. Odwracalna fotoredukcja flawiny.

W obecności donorów elektronów, takich jak na przykład aminy, NADH czy EDTA, flawiny ulegają fotoredukcji, tworząc 1,5-dwuhydroflawiny (82, 83). Fotoredukcja (Ryc. 4.) przebiega poprzez stan trypletowy flawiny (84) w dwóch etapach, przy czym tworzą się silnie zabarwione rodniki o charakterze semichinonowym (83, 85, 86).

W wyniku badań spektroskopowych wykazano, że niemal wszystkie flawoproteidy, nie zawierające metalu, tworzą dwa typy rodników: niebieskie, o absorpcji w zakresie 500–650nm i czerwone, posiadające maksima absorpcji w 485, 400 i 370 nm. Rodniki niebieskie mają charakter obojętnego flawosemichinonu, zaś czerwone — anionowego flawosemichinonu (85, 86). Na podstawie analizy widm elektronowego rezonansu paramagnetycznego obojętnemu flawosemichinonowi przypisuje się strukturę 5HFL, a więc niezgodną z wspomnianymi wyżej wynikami obliczeń indeksów reaktywności (76).

Z badań dyfrakcji promieni X wynika, że utlenione flawiny mają płaski układ pierścieni, natomiast zredukowane (1,5-dwuhydroflawiny) są „zgięte” wzdłuż osi przebiegającej od N-5 do N-10. Oscylacje między pierścieniem pirymidynowym a benzenowym w izoalloksazynie, wokół osi N-5 — N-10, mogą odgrywać ważną rolę w enzymatycznych reakcjach redukcyjno-oksydacyjnych (94).

Fotoredukcja ryboflawiny do 1,5-dwuhydroflawiny jest w obecności tlenu reakcją odwracalną. Flawiny, zarówno wolne jak związane z białkiem, ulegają także nieodwracalnej fotoredukcji, połączonej z tworzeniem związków addycyjnych. W powstawaniu tych połączeń uczestniczy podwójne wiązanie między N-5 i C-4a (83, 87). Spostrzeżenie to wskazuje na jeszcze jedno miejsce aktywne w pierścieniu izoalloksazyny.

## V. Uwagi końcowe

Poznanie własności flawin w stanie trypletowym umożliwia zrozumienie przebiegu niektórych poprzednio opisanych procesów, zachodzących z udziałem wzbudzonych światłem enzymów flawinowych.

Widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego i działanie substancji wygaszających stan trypletowy wskazują na uczestnictwo flawin w tym stanie wzbudzenia w większości reakcji katalizowanych przez enzymy flawinowe (82, 84, 87). Dla przebiegu jednak niektórych reakcji obecność flawiny w stanie trypletowym jest niepożądana. Przykładami takich reakcji są procesy przebiegające z udziałem niektórych oksydaz. W obecności FMN światło niebieskie hamuje aktywność nie tylko oksydazy glikolanowej (36), ale także oksydaz: ksantynowej i moczanowej oraz dehydrogenazy L-mleczanowej (95). Według hipotezy Schmid'a (95) aktywna oksydaza glikolanowa wymaga koenzymu w stanie podstawowym. Wzbudzony FMN w stanie trypletowym reaguje z apoenzymem i powoduje je-

go inaktywację. Białko enzymatyczne odgrywa w tej reakcji rolę reduktora koenzymu, zastępując substrat. Substancje wygaszające stan trypletowy flawiny ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{O}_2$ , tryptofan) przeciwdziałają hamującemu działaniu światła niebieskiego i powodują zwiększenie aktywności oksydazy. Aktywność badanych oksydaz roślinnych zależy zatem od stosunku ilości niewzbudzonych cząsteczek fotoreceptora do ilości cząsteczek wzbudzonych.

Z powyższego, niepełnego przeglądu reakcji fotouczulanych przez flawiny widać, że związki te mogą spełniać różnorodne funkcje fotobiologiczne w organizmach roślinnych. Do dokładnego poznania fotobiologicznej roli flawin *in vivo* konieczne są dalsze badania. Jak dotychczas, bowiem zbyt mała jest ilość doświadczeń *in vivo* pozwalających na jednoznaczną interpretację obserwowanych zjawisk w oparciu o znajomość flawin zdobytą w badaniach i obliczeniach z użyciem układów modelowych.

Artykuł wpłynął 14.7.1973, po rewizji autorskiej wrócił 8.12.1973.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Voskresenskaya N. P., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 219—234.
2. Wolf F. T., (1972), w *Advancing Frontiers of Plant Sciences*, wyd. Chandra L., t. 29, str. 19—96.
3. Gardas A., (1966), *Post. Biochem.*, **12**, 513—533.
4. Chełkowski J., (1972), *Post. Biochem.*, **12**, 435—453.
5. Tregunna E. B., Krotkov G., Nelson C. D., (1964), *Can. J., Bot.* **42**, 989—995.
6. Hew C.-S., Krotkov G., Canvin D. T., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 662—670.
7. Zelitch I., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 1829—1837.
8. Hoch G., Owens O. v. H., Kok B., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 171—180.
9. Ozbun J. L., Volk R. J., Jackson W. A., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 523—527.
10. Decker J. P., (1955), *Plant Physiol.*, **30**, 82—84.
11. Holmgren P., Jarvis P. G., (1967), *Physiol. Plant.*, **20**, 1045—1051.
12. Poskuta J., Nelson C. D., Krotkov G., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 1187—1190.
13. Downtown W. J. S., Tregunna E. B., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 923—929.
14. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 428—431.
15. Forrester M. L., Krotkov G., Nelson C. D., (1966), *Plant Physiol.*, **41**, 422—427.
16. Poskuta J., (1968), *Physiol. Plant.*, **21**, 1129—1136.
17. Santarius K. A., Heber U., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **102**, 39—54.
18. Jackson W. A., Volk R. J., (1970), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 385—432.
19. Zelitch I., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 1299—1303.
20. Zelitch I., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 3077—3081.
21. Zelitch I., (1972), w *Proc. of the II<sup>nd</sup> Int. Congress on Photosynthesis Research*, wyd. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2207—2214, Dr W. Junk N. V. Publ., Hague.

22. Kisaki T., Tolbert N. E., (1969), *Plant Physiol.*, **44**, 242—250.
23. Bradbeer J. W., Racker E., (1961), *Fed. Proc.*, **20**, 88—91.
24. Plaut Z., Gibbs M., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 470—474.
25. Bradbeer J. W., Anderson C. M. A., (1967), w *Biochemistry of Chloroplasts*, wyd. T. W., Goodwin t. 2, str. 175—179, Academic Press, New York.
26. Andrews T. J., Lorimer G. H., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry* **12**, 11—18.
27. Lorimer G. H., Andrews T. J., Tolbert N. E., (1973), *Biochemistry* **12**, 18—23.
28. Poskuta J., (1968), *Experientia*, **24**, 796—797.
29. Döhler G., (1972), w *Proc. of the II<sup>nd</sup> Int. Congress on Photosynthesis Research*, wyd. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2071—2076, Dr W. Junk N. V. Publ., Hague.
30. Döhler G., Koch R., (1972), *Planta*, **105**, 352—359.
31. Kowallik W., (1967), *Plant Physiol.*, **42**, 672—676.
32. Kowallik U., Kowallik W., (1969), *Planta*, **84**, 141—157.
33. Schmid G. H., Schwarze P., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1513—1520.
34. Zurzycki J., (1970), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **39**, 485—495.
35. Kowallik W., Gaffron H., (1967), *Nature*, **215**, 1038—1040.
36. Schmid G. H., (1969), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **350**, 1035—1046.
37. Codd G. A., Schmid G. H., (1971), *Planta*, **99**, 230—237.
38. Voskresenskaya N. P., Viil Y. A., Grishina G. S., Pärnik T. P., (1971), *Fiziol. Rast.*, **18**, 488—493.
39. Keeberg H., Vark E., Keeberg O., Pärnik T. P., (1971), *Izv. Akad. Nauk Est. SSR Biol.*, **20**, 350—352.
40. Döhler G., Braun F., (1971), *Planta*, **98**, 357—361.
41. Lord J. M., Codd G. A., Merrett M. J., (1970), *Plant Physiol.* **46**, 855—856.
42. Losada M., Ramirez J. M., Paneque A., Del Campo F. F., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 86—96.
43. Paneque A., Ramirez J. M., Del Campo F. F., Losada M., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **109**, 79—85.
44. Schrader L. E., Ritenour G. L., Eilrich G. L., Hageman R. H., (1968), *Plant Physiol.*, **43**, 930—940.
45. Stoy V., (1955), *Plant Physiol.*, **8**, 963—986.
46. Stoy V., (1956), *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 395—396.
47. Lips S. H., (1972), w *Proc. of the II<sup>nd</sup> Int. Congress on Photosynthesis Research*, wyd. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2241—2249, Dr W. Junk N. V. Publ., Hague.
48. Bird I. F., Keys A. J., Whittingham C. P., (1972), w *Proc. of the II<sup>nd</sup> Int. Congress on Photosynthesis Research*, wyd. Forti G., Avron M., Melandri A., t. 3, str. 2215—2231, Dr W. Junk N. V. Publ. Hague.
49. Tolbert N. E., Yamazaki R. K., Oeser A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5129—5136.
50. Pickard B. G., Thimann K. V., (1964), *Plant Physiol.*, **39**, 341—350.
51. Galston A. W., Davies P. J., (1970), w *Control Mechanisms in Plant Development*, str. 56—95, Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.
52. Page R. M., (1968), w *Photophysiology, Current Topics*, wyd. Giese A. C., t. 3, str. 65—90, Academic Press, London.
53. Rau W., (1967), *Planta*, **72**, 14—28.
54. Galston A. W., Baker R. S., (1949), *Amer. J. Bot.*, **36**, 773—780.
55. Galston A. W., Bonner J., Baker R. S., (1951), *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 456—470.

56. Galston A. W., Hillman W. S., (1961), w *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, wyd. Ruhland W., t. 14, str. 647—670, Springer Verlag, Berlin.
57. Thimann K. V., (1967), w *Comprehensive Biochemistry*, Photobiology, Ionizing Radiation, wyd. Florkin M., Stotz E. H., t. 27, str. 1—29, Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
58. Thimann K. V., Curry G. M., (1960), w *Comparative Biochemistry*, wyd. Florkin M., Mason H. S., t. 1, str. 243—309, Academic Press, New York.
59. Thimann K. V., (1964), *Photochem. Photobiol.*, **3**, 463—469.
60. Bara M., Galston A. W., (1968), *Physiol. Plant.*, **21**, 109—118.
61. Fischer-Arnold G., (1963), *Protoplazma*, **56**, 495—520.
62. Haupt W., Schönfeld I., (1962), *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **75**, 14—23.
63. Meyer F., (1964), *Z. Bot.*, **52**, 364—381.
64. Zurzycki J., (1962), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **31**, 489—538.
65. Zurzycki J., (1967), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **36**, 133—142.
66. Zurzycki J., (1967), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **36**, 143—152.
67. Zurzycki J., (1972), w *Acta Protozool.*, Symp. Motile Systems of Cells, red. Dryl S., Zurzycki J., t. 11, str. 189—199, Warszawa.
68. Seitz K., (1972), w *Acta Protozool.*, Symp. Motile Systems of Cells, red. Dryl S., Zurzycki J., t. 11, str. 225—235, Warszawa.
69. Seitz K., (1967), *Z. Pflanzenphysiol.*, **56**, 246—261.
70. Lechowski Z., (1972), w *Acta Protozool.*, Symp. Motile Systems of Cells, red. Dryl S., Zurzycki J., t. 11, str. 201—209, Warszawa.
71. Whitby L. G., (1953), *Biochem. J.*, **54**, 437—443.
72. Song P. S., (1970), w *Quantum Aspects of Heterocyclic Compounds*, wyd. Bergman E. D., Pullman B., str. 358—380.
73. Song P. S., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 37—61, University Park Press, Baltimore.
74. Song P. S., Moore T. A., Kurtin W. E., (1972), *Z. Naturforsch.*, **27**, 1011—1015.
75. Sun M., Moore T. A., Song P. S., (1972), *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1730—1740.
76. Song P. S., (1968), *J. Physiol. Chem.*, **72**, 536—542.
77. Song P. S., (1968), *Photochem. Photobiol.*, **7**, 311—313.
78. Song P. S., Kurtin W. E., (1969), *Mol. Photochem.*, **1**, 1—10.
79. Song P. S., Metzler D. E., (1967), *Photochem. Photobiol.*, **6**, 691—709.
80. Kurtin W. E., Latino M. A., Song P. S., (1967), *Photochem. Photobiol.*, **6**, 247—259.
81. Song P. S., Smith E. C., Metzler D. E., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4181—4184.
82. McCormick D. B., Koster J. F., Veeger C., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **2**, 387—391.
83. Hemmerich P., Ghisla S., Hartmann U., Müller F., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 83—105, University Park Press, Baltimore.
84. Tether L. R., Turnbull J. H., (1962), *Biochem. J.*, **85**, 517—523.
85. Müller F., Hemmerich P., Ehrenberg A., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 107—122, University Park Press, Baltimore.
86. Palmer G., Müller F., Massey V., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 123—140, University Park Press, Baltimore.
87. DeKok A., Veeger C., Hemmerich P., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 63—80, University Park Press, Baltimore.
88. Kurtin W. E., Song P. S., (1968), *Photochem. Photobiol.*, **7**, 263—273.
89. Kurtin W. E., Song P. S., (1969), *Photochem. Photobiol.*, **9**, 127—142.

90. Massey V., Palmer G., Ballou D., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 349, 362, University Park Press, Baltimore.
91. Song P. S., Kurtin W. E., (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4248—4249.
92. Walker W. H., Hemmerich P., Massey V., (1970), *Eur. J. Bioch.*, **13**, 258—266.
93. Treadwell G. E., Jr, Metzler D. E., (1972), *Plant Physiol.*, **49**, 991—993.
94. Kierkegaard P., Norrestam R., Werner P. E., Csöreg J., Von-Glehn M., Karlsson R., Leijonmark M., Rönquist O., Stensland B., Tillberg O., Torbjörnsson L., (1971), w *Flavins and Flavoproteins*, red. Kamin H., str. 1—22, University Park Press, Baltimore.
95. Schmid G. H., (1970), *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **351**, 575—578.

## KOMUNIKAT

### Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznane w 1973 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego z prawdziwą przyjemnością zawiadamia o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

#### Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego

została przyznana mgr A. Kahlowi za pracę „Cykliczny 3'5'-adenozynomonofosforan” ogłoszoną w kwartalniku *Postępy Biochemii*, tom 18, rok 1972, str. 199—223.

#### Nagroda Imienia Jakuba Parnasa

została przyznana dr W. Jankowskiemu i prof. dr T. Chojnackiemu za pracę „Enzymatic Formation of Polyisoprenol Phosphate Sugars” ogłoszoną w *Acta Biochimica Polonica* tom 19, rok 1972, str. 5—69.

Nagrody i wyróżnienia w konkursie dla młodych biochemików za prace przedstawione na XI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Białymstoku w 1973 roku:

Nagroda I — kol. J. Bryła za pracę J. Bryła, J. Zalewski, A. Kubica „Synteza cytruliny i PEP w różnych stanach metabolicznych mitochondriów świnki morskiej”.

Nagroda II — kol. A. Ratkiewicz za pracę „Odrębności metaboliczne RNA w tkankach szczurów z doświadczalnym nowotworem Guerin”.

Nagroda III — kol. M. Zdzenicka za pracę M. Zdzenicka, M. Hryniewicz, M. Bagdasarian „Supresja mutacji inicjatorowej DNA-1 przez czynnik F' u *Salmonella typhimurium*”.

Nagroda III — kol. T. Kurył za pracę „Aktywność syntetaz aminocylo-tRNA w różnych stanach fizjologicznych gruczołu mlecznego królika”.

#### Wyróżnienia:

Kol. J. Duszyński za pracę „Wpływ acylo-CoA i detergentów na translokację nukleotydów adeninowych w błonie mitochondrialnej”.

Kol. J. Kłysik za pracę J. Kłysik, A. Brzeziński „Izolowanie DN-azy K<sub>2</sub> z grzybni *Aspergillus oryzae* szczep IAM-2645”.

Kol. M. Manteuffel-Cymborowska za pracę „Oczyszczanie reduktazy dihydrofolianowej z zastosowaniem chromatografii powinowactwa”.

Kol. E. Ziomek za pracę E. Ziomek, K. A. Sobiech „Oczyszczanie, właściwości i funkcja  $\beta$ -glutamylo-transpeptydazy mleka krowy”.

Kol. A. Stankiewicz za pracę A. Stankiewicz, W. Makarewicz „Znaczenie metali dwuwartościowych dla aktywności AMP-aminohydrolazy z mięśni szkieletowych”.

Kol. L. Zwierzchowski za pracę R. Krawczykiewicz, L. Zwierzchowski „Biosynteza białek i RNA w skrawkach gruczołu mlecznego myszy i krowy”.

## SPRAWOZDANIA

### VIII Międzynarodowa Konferencja na temat Substancji wzrostowych roślin

Tokio, 26.VIII—1.IX.1973

Międzynarodowe Konferencje o substancjach wzrostowych roślin zostały zainicjowane na Uniwersytecie w Lund (Szwecja) przez prof. dr H. G. Burströma w 1956 roku. Odbływały się one co parę lat, między innymi we Francji (Gif-sur-Yvette), w Anglii (Wey), w Kanadzie (Montreal) i Australii (Canberra), prowadząc do utworzenia Międzynarodowego Towarzystwa Substancji Wzrostowych Roślin (I.P.G.S.A.), liczącego obecnie 265 członków.

VIII Międzynarodowa Konferencja w Tokyo została otwarta przemówieniem jednego z odkrywców giberelin prof. dr Y. Sumiki, przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego, po czym słowa powitania wyraził prof. dr Y. Ochi, przewodniczący Rady Naukowej Japonii.

Wykład prof. dr K. V. Thimana omawiający historię badań nad substancjami wzrostowymi roślin, zainaugurował obrady. W każdym dniu Konferencji wyłaszany był 45 min. referat przeglądowy przez zaproszonych specjalistów oraz 20 min. doniesienia doświadczalne. Obrady odbywały się dwu sekcjach: **A** — poświęconej metabolizmowi substancji wzrostowych i ich wpływowi na roślinę na poziomie organizmu, organu, komórki, organelli, i **B** — dotyczącej występowania, izolacji i identyfikacji substancji wzrostowych.

Tematem pierwszego dnia Konferencji w sekcji A było kiełkowanie, spoczynek i różnicowanie, fizjologia kwasu abscysynowego, hodowle tkankowe oraz czynniki genetyczne i środowiskowe roślin w powiązaniu z regulatorami wzrostu. W sekcji B natomiast omawiano izolację i charakterystykę auksyn i giberelin oraz regulatorów wzrostu roślin niższych.

Do ciekawszych referatów wyłoszonych na Konferencji w sekcji A należał komunikat dr C. A. Beasleya i dr I. P. Tinga, dotyczący badań embriogenezy i interakcji hormonalnych w procesie wydłużania włókien bawełny. Wykazali oni, że kinetyna stymuluje wzrost wielkości załążków, natomiast kwas indoliloctowy i kwas giberelowy wywołują tworzenie włókien u niezapłodnionych załążków a zastosowane razem dają efekty addytywne a niekiedy synergistyczne. Hamujący wpływ kwasu abscysynowego na tworzenie włókien jest odwracalny u załążków zapłodnionych, przez kwas giberelowy lub kwas indoliloctowy.

Kilka komunikatów dotyczyło hormonalnej regulacji wzrostu i różnicowania roślin niższych i wyższych i wpływu regulatorów wzrostu na DNA, RNA i skład białka oraz różnicowanie organelli na poziomie komórkowym.

Regulacja mechanizmu działania aparatów szparkowych przez kwas abscysynowy została bardzo interesująco przedstawiona przez prof. dr K. Raschke. Stwierdził, że kwas abscysynowy tworzony jest w liściach jeżeli utrata wody przewyższa pobieranie. Kwas abscysynowy wywołuje zamykanie szparek a kiedy ilość jego zanika szparki otwierają się. Wielkość reakcji szparkowej na kwas abscysynowy zależy od

CO<sub>2</sub> w atmosferze. Tak więc poziom kwasu abscysynowego w aparacie szparkowym służy jako sygnał mechanizmu sprzężenia zwrotnego między zaopatrzeniem w CO<sub>2</sub> i wodę. Wpływa więc na stosunek transpiracja/fotosynteza.

W sekcji B, jednym z ciekawych doniesień było wykrycie przez dr T. Yamaki i wsp. że tkanka rakowa układu trawiennego człowieka zawiera znacznie większe ilości kwasu indolilooctowego niż tkanka otaczająca.

Problematyka następnego dnia obrad w sekcji A poświęcona była hormonalnej regulacji aktywności enzymatycznej zaś w sekcji B izolacji i charakterystyce związków fenolowych i terpenoidów, regulatorom spoczynku i kwitnienia, kwasowi abscysynowemu i cytokininom oraz biosyntezie i metabolizmowi auksyn. Referat przeglądowy na temat: „Rozbieżności w badaniach nad auksynami” wygłosił prof. dr G. H. Burström. Na uwagę zasługiwał referat prof. dr M. Boppa, dotyczący mechanizmu działania różnych analogów cytokinin na mchy — przedstawiający układ modelowy efektów cytokinin.

W trzecim dniu Konferencji zorganizowano 1 dniową wycieczkę na Fuji, prowadzącą przez piękny „Park Narodowy 5 Jezior”.

W następnym dniu obrad w sekcji A dyskutowano działanie auksyn na ścianę komórkową i hormonalną regulację wzrostu komórki, natomiast w sekcji B biosyntezę i metabolizm giberelin i kwasu abscysynowego. Odczyt przeglądowy na temat postępów w chemii giberelin wygłosił prof. dr N. Takahashi. Poruszył on trzy podstawowe zagadnienia: 1. metodykę izolacji giberelin 2. określanie struktury giberelin metodami fizyko-chemicznymi i 3. biosyntezę giberelin u roślin i grzybów.

Przedostatni dzień obrad Konferencji poświęcono działaniu hormonów na kwasy nukleinowe, transportowi auksyn i tropizmom oraz odpadaniu organów roślin. W sekcji B natomiast, omawiano zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną substancji wzrostowych. Dr T. Oritani pięknie przedstawił zależność między strukturą a aktywnością analogów kwasu abscysynowego. Wykazał, że szkielet kwasów jonylidenooctowych (C<sub>15</sub>) był zwykle aktywniejszy niż kwasów cyklocytrylidenooctowych (C<sub>12</sub>), w sześciu różnych biotestach. Przeglądowy odczyt prof. dr R. L. Wain dotyczył rozważań nad badaniami substancji wzrostowych roślin, głównie z grupy auksyn.

Fizjologii cyklicznego AMP oraz fizjologii i biosyntezie etylenu poświęcony był ostatni dzień Konferencji w sekcji A, natomiast w sekcji B problemom starzenia, kwitnieniu oraz czynnikom środowiska wpływającym na wzrost i rozwój roślin.

Wiele prac referowanych na Konferencji dotyczyło biosyntezy i mechanizmu działania etylenu w powiązaniu z innymi regulatorami wzrostu. Przykładem może być referat dr O. L. Lau i wsp. dotyczący mechanizmu synergistycznego efektu kinetyny w tworzeniu etylenu pod wpływem auksyn.

Konferencję zakończono zebraniem ogólnym I.P.G.S.A. na którym prof. dr D. J. Carr podał krótkie sprawozdanie za okres od poprzedniej Konferencji, poczym przyjęto konstytucję I.P.G.S.A. Wybrano nowy zarząd i przewodniczącym został prof. dr J. MacMillan, a *vice* przewodniczącym prof. dr Y. Masuda, sekretarzem zaś pozostał prof. dr D. J. Carr. Wybrano również nowych członków Komitetu. Ustalono też miejsce następnej Konferencji, o które ubiegali się przedstawiciele Anglii i Szwajcarii. Większością głosów przeszła propozycja prof. dr P. E. Pileta i następna IX Międzynarodowa Konferencja odbędzie się w Lozannie w 1976 roku.

W Konferencji uczestniczyło około 300 osób z 28 państw. Najliczniej reprezentowana była Japonia i Stany Zjednoczone. Po raz pierwszy w Konferencji I.P.G.S.A. uczestniczyli przedstawiciele Chin Ludowych. Z Polski w Konferencji brały udział 3 osoby.

Ogółem na konferencji wygłoszono 4 referaty przeglądowe i 150 komunikatów. Wygłoszone na Konferencji referaty przedstawiły aktualny stan badań nad substan-

cjami wzrostowymi roślin w różnych ośrodkach naukowych świata, obrazując znaczny postęp jaki dokonał się w tej dziedzinie w ostatnich latach. Materiały Konferencji zostaną w ciągu pół roku opublikowane w specjalnym wydaniu pt. „Substancje Wzrostowe Roślin 1973”.

H. J. Rogozińska

## Konferencja naukowa na temat

### Metod spektroskopowych w badaniach kwasów nukleinowych i ich komponentów i analogów

Boszków k/Leszna 68. XII.1973

Z inicjatywy młodych pracowników nauki Instytut Chemii UAM i Zakład Stereochemii Produktów Naturalnych IChO PAN (Poznań) zorganizowały w dniach 6—8 grudnia 1973 r. w Boszkowie koło Leszna konferencję poświęconą metodom spektroskopowym stosowanym w badaniach struktury kwasów nukleinowych i ich składników. Lokalizacja w oddaleniu od macierzystych zakładów stwarzała możliwość całkowitego skupienia się na przedmiocie obrad i maksymalnego wykorzystania czasu. W konferencji wzięło udział 120 osób, reprezentujących niemal wszystkie krajowe ośrodki, zajmujące się problematyką kwasów nukleinowych.

Po otwarciu konferencji przez prof. M. Wiewiórowskiego (Poznań) przystąpiono do części roboczej. Składało się na nią 29 referatów, podzielonych na 9 sesji; obrady prowadzono systemem jednosekcyjnym.

Referaty zostały przygotowane w większości przez młodych pracowników naukowych z ICh UAM i ZSPN IChO PAN. Ze względów organizacyjnych udział uczestników spoza Poznania ograniczono do przygotowania koreferatów (na podstawie wcześniej przedstawionego programu) i wystąpień w dyskusji. Referaty miały zasadniczo charakter przeglądu literatury; tylko w pewnych przypadkach odwoływano się do badań własnych.

Pierwsze 3 sesje, którym przewodniczyli kolejno: prof. M. Wiewiórowski, prof. D. Shugar (Warszawa) i prof. B. Bochwic (Łódź) poświęcone były w całości spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR). Sygnały NMR odpowiadają rezonansowi jąder — najczęściej jąder wodoru (PMR). Położenie sygnałów jest zależne od otoczenia chemicznego jąder a intensywność jest proporcjonalna do ich liczby. Najszerzej potraktowano problemy stereochemiczne a więc konfiguracje przestrzenne nukleozydów i nukleotydów oraz elementów ich struktury (np. pierścienia furanozy), równowagi konformerów i rotamerów. Dyskusję wywołał zakres stosowania różnych wersji równania Karpulasa. Asocjację warstwową zasad azotowych omówiono na przykładzie oligonukleotydów. Wykazano, w oparciu o cykl prac Kearnsa, możliwość stosowania NMR wysokiej częstotliwości (220 lub 300 MHz) do badania cząsteczek tRNA. Zreferowano także wyniki stosowania mniej pospolitych technik, jak wykorzystanie efektu Overhausera i reagentów przesunięcia, czy rezonansu jąder  $^{13}\text{C}$ .

W kolejnych trzech sesjach, nad którymi przewodnictwo objęli doc. M. Michalska (Łódź), doc. W. Antkowiak (Poznań) i doc. M. Kiełczewski (Poznań), opisano wymienione niżej techniki spektralne. W trzech wystąpieniach przedstawiono pewne aspekty teoretyczne i praktyczne spektroskopii w podczerwieni (IR) kwasów nukleinowych i ich składników. Niejako uzupełnieniem w/w były 2 referaty poświęcone spektrosko-

pii ramanowskiej (R). Zarówno spektroskopia IR, jak i R pozwala wnikać w II-rzędową strukturę kwasów nukleinowych. Na tej drodze uzyskano potwierdzenie słuszności modelu tRNA znanego jako „model liścia koniczyny” na podstawie oznaczenia ilości nukleozydów sparowanych i wchodzących w skład pojedynczej nici.

Informacje na temat spektroskopii masowej i widm dichroizmu kołowego podano wyłącznie w odniesieniu do składników kwasów nukleinowych. Zastosowanie spektroskopii emisyjnej omówiono tylko w powiązaniu z badaniami widm fluorescencyjnych rzadkich nukleozydów typu Y, występujących w niektórych tRNA.

Wydaje się, że układ ilościowy referatów był odzwierciedleniem zaawansowania każdej z tych metod do badania struktury kwasów nukleinowych i ich składników.

Od zasadniczego nurtu konferencji odbiegało kilka referatów, które świadomie włączono do programu gwoili uniknięcia monotonii obrad a jednocześnie w celu zaprezentowania technik stosowanych w naszych zakładach do badania kwasów nukleinowych. I tak omówiono fotochemię kwasów nukleinowych i ich analogów, metody ustalania struktury rzadkich nukleozydów, wysokociśnieniową chromatografię cieczową, zastosowanie chromatografii powinowactwa do oczyszczania syntetaz aminoacylo-tRNA. Ostatnie wystąpienie uzupełnił koreferat, w którym przedstawiono ostatnie osiągnięcia Katedry Biochemii AR w Poznaniu w tej dziedzinie. Wyniknęły one z krytycznego podejścia do publikacji, w których nie udało się wyeliminować niespecyficznego oddziaływania enzymu z podłożem.

Do badań nad strukturą tRNA prowadzonych w ZSPN IChO PAN i ICh UAM nawiązywało kilka dalszych referatów. Zaprezentowano przegląd ustaleń na temat struktury i funkcji tRNA na przykładzie najlepiej scharakteryzowanego natywnego tRNA, tzn. tRNA<sup>Pro</sup> z drożdży. Oparcie się na tym konkretnym przykładzie pozwoliło na częściowe ominięcie rozbieżności występujących w literaturze na temat budowy przestrzennej tRNA i problemu interakcji tRNA z syntetazą aminoacyl tRNA. W krótkim wystąpieniu przedstawiono, opracowany w ZSPN IChO PAN atlas struktury tRNA.

Udział wiązań wodorowych w utrzymywaniu II- i III-rzędowej struktury kwasów nukleinowych jest powszechnie znany. Z faktem tym łączył się referat prof. J. Małeckiego (IF PAN — *Poznań*) na temat dielektrycznych metod badania wiązań wodorowych w roztworach.

Tym trzem sesjom przewodniczyli: doc. W. Sobótka (*Warszawa*), doc. T. Sokołowska (*Gdańsk*) i prof. S. Paszyc (*Poznań*).

W sali, gdzie odbywały się obrady, wywieszono do powszechnego wglądu plany, ilustrujące w skondensowanej formie prace nad syntezą, strukturą i izolacją kwasów nukleinowych, prowadzone w ZSPN IChO PAN i ICh UAM. Wydaje się, że taka forma prezentowania wyników jest ze wszech miar godna polecenia.

Podsumowania konferencji dokonał prof. Wiewiórowski, który podkreślił dobre przygotowanie referentów, zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i wskazał na celowość urządzania spotkań tego typu, jako doskonałej okazji do podnoszenia wiedzy uczestników w wybranym temacie. Zdaniem prof. Wiewiórowskiego niebagatelną zaletą spotkania była integracja ośrodków zajmujących się tematyką kwasów nukleinowych, co powinno w przyszłości zapewnić szybką wymianę informacji o wynikach badań.

Organizatorzy czynią starania celem wydania materiałów z konferencji.

Krzysztof Szyfter,  
Paweł Serafinowski

## RECENZJA

### Ćwiczenia z Chemii Ogólnej i Fizjologicznej

Praca zbiorowa pod redakcją prof. dr Bronisława Filipowicza i prof. dr Włodzimierza Ostrowskiego, PZWL, Warszawa, 1973

Podręcznik do Ćwiczeń z Chemii Ogólnej i Fizjologicznej wypełnia jedną z luk w naszym polskim zestawie podręczników dla studentów. Podręcznik ten obejmuje całość ćwiczeń chemicznych dla studentów nie tylko medycyny ale i weterynarii dwu pierwszych lat studiów. Inny podręcznik z tej dziedziny wydany przed dwoma laty pt. „Kurs Praktyczny z Biochemii”, W. Mejbaum-Katzenellenbogen, I. Mochnacka, PWN, Warszawa, 1971 odpowiadał bardziej potrzebom studentów farmacji i biologii.

Podręcznik „Ćwiczeń z chemii ogólnej i fizjologicznej” (455 stron) składa się z 5 części według kolejności odpowiadającej programowi wykładów. Są to: I — Podstawy analizy chemicznej; II — Chemia organiczna; III — Metody fizyko-chemiczne w analityce i preparatyce; IV — Analiza składników ustrojowych, V — Analiza produktów metabolizmu i płynów ustrojowych.

Pozytywnie należy ocenić zwartą strukturę i skondensowany sposób podania wiadomości teoretycznych, bez obciążenia nadmiarem szczegółowych informacji i wzorów, a uwzględnieniem wielu praktycznych, użytecznych informacji. Opisy aparatury uzupełniono rysunkami i schematami. Na początku książki podano różne praktyczne dane i reguły, jak np. jednostki miar, podstawowe definicje chemiczne, sposoby wyrażania stężeń roztworów (zestawy zadań), zestawienie praw i reguł chemicznych itp. Niewątpliwie podręcznik ten może się przydać nie tylko studentom lecz i pracownikom laboratoriów analitycznych. W obecnym opracowaniu podręcznik ten — zdaniem moim — przydałby się uzupełnić zestawami zadań do poszczególnych ćwiczeń z odnośnikami do odpowiadających im teoretycznych rozdziałów podręcznika.

*Janina Opieńska-Blauth*

## POSTĘPY BIOCHEMII

April 1974

### ARTICLES IN POLISH

Number 2

#### Volume 20

|                                                                                                                                                                                                              |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| E. Czuryło — Three-Dimensional Structure of tRNA (Dept Biophys. Inst. Exp. Phys., University of Warsaw, Warszawa) . . . . .                                                                                  | 99  |
| G. Bartosz, J. Opacka — Cellular Repair of the DNA Damages (Dept Biophys., Inst. Bioch. Bioph., University of Łódź, Łódź and Dept Biochem., Inst. Physiol. and Biochem., School of Medicine, Łódź) . . . . . | 121 |
| A. Lipińska, L. Klyszejko-Stfanowicz — Primary Structure of Histones (Dept Biochem., Inst. Biochem. Biophys., University of Łódź, Łódź) . . . . .                                                            | 145 |
| J. Skangiel-Kramska — Structure and Heterogenity of Acetylcholinesterase (Dept Biochem. Nervous System and Muscle, Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .                             | 165 |
| V. Podražky — Conversion of Tropoelastin to Elastin and Molecular Orga-Nutrit. Industry, Prague, Czechoslovakia) . . . . .                                                                                   | 181 |
| H. Gabryś-Mizera — Photobiological Role of Flavins and Flavoproteins in Plant Tissues (Dept Plant Physiol., Inst. Mol. Biol., Jagiellonian University, Kraków) . . . . .                                     | 191 |
| Communication . . . . .                                                                                                                                                                                      | 205 |
| Reports . . . . .                                                                                                                                                                                            | 207 |
| Book review . . . . .                                                                                                                                                                                        | 211 |

Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzania poprawek nie wpływających na treść pracy.

**Piśmiennictwo:** W artykule powinny być cytowane prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawianą dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy cytować jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem będzie obejmował prace opatrzone kolejnymi numerami ale nieuporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 276, (1) np.

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a), inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

**Załączniki:** Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść. Należy zaznaczyć z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny tj. wykresy, rysunki, schematy, lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. 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 natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole:  $\triangle$   $\square$   $\circ$   $\blacktriangle$   $\blacksquare$   $\bullet$  Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

Podpisy i objaśnienia pod rycinami powinny być dołączone na oddzielnej kartce. Oznaczenia, których nie można wpisać na maszynie, należy wyraźnie nanieść czarnym tuszem.

Redakcja prosi o właściwe pakowanie artykułów aby zabezpieczyć maszynopisy i ilustracje przed pogięciem.

## SPIS TREŚCI

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| E. Czuryło—Przestrzenna struktura tRNA . . . . .                                                                                 | 99  |
| G. Bartosz, J. Opacka—Naprawa uszkodzeń DNA w komórce . . . . .                                                                  | 121 |
| A. Lipińska, L. Kłyszejko-Stefanowicz — Pierwszorzędowa struktura histonów . . . . .                                             | 145 |
| J. Skangiel-Kramska — Budowa i heterogenność hydrolazy acetylcholinowej . . . . .                                                | 165 |
| V. Podrażky — Konwersja tropoelastyny w elastynę oraz molekularna organizacja włókien elastycznych . . . . .                     | 181 |
| H. Gabryś-Mizera — Fotobiologiczna rola flawin i flawoproteidów w tkankach roślinnych . . . . .                                  | 191 |
| Komunikat . . . . .                                                                                                              | 205 |
| Sprawozdania: VIII Międzynarodowa Konferencja o substancjach wzrostowych roślin — (J. H. Rogozińska) . . . . .                   | 207 |
| Kurs „Metody spektroskopowe w badaniach kwasów nukleinowych, ich komponent i analogów” — (K. Szyfter, P. Serafinowski) . . . . . | 209 |
| Recenzja . . . . .                                                                                                               | 211 |