

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 25 (1)
1-112 (1979)

1979

tom 25 nr 1
PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. 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 odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów 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; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładowa 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, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim), 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, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) 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 obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. 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. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. 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).

Redakcja prosi autorów o zwrócenie szczególnej uwagi na poprawność językową tekstu a także na ścisłość i jasność sformułowań, unikanie gwary laboratoryjnej oraz o niewprowadzanie do tekstu tworzonych doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Dr. Wojciech Rode

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postepy Biochemii

KWARTALNIK

1979 TOM 25 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 25(1)
1—112 (1979)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumiel (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Racyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

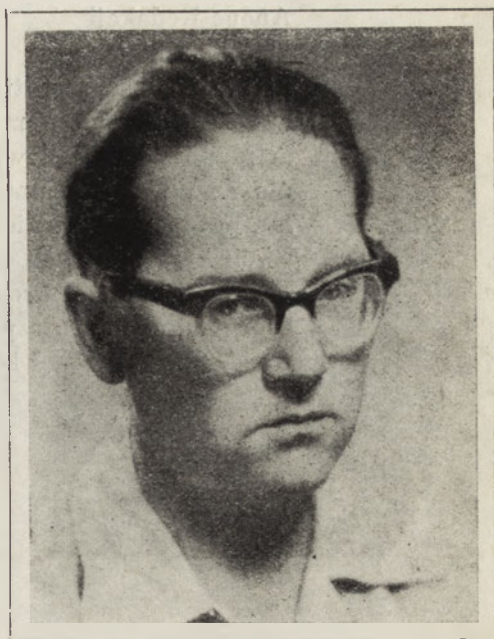
Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1978

Nakład 2.310	Oddano do składania 17.X.78
Ark. wyd. 8,5, ark. druk. 7,0	Podpisano do druku w lutym 1979 r.
Pap. druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100	Druk ukończono w lutym 1979 r.
Zam. nr 1475/78 C-30	Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



Władysław Więckowski

(13.04.1921—3.04.1978)

W dniu 3 kwietnia zmarł mgr Władysław Więckowski, wieloletni nauczyciel akademicki, starszy wykładowca w Zakładzie Biochemii Instytutu Fizjologii i Biochemii Akademii Medycznej w Łodzi.

Władysław Więckowski rozpoczął pracę w Katedrze Chemii Ogólnej i Fizjologicznej A.M. w Łodzi w roku 1951 i z placówką tą pozostał związany do końca. W roku akademickim 1974/75 pełnił obowiązki Kierownika Zakładu Biochemii. Ogółowi nauczających i studiujących biochemię znany jest jako współautor cenionych, cieszących się powodzeniem podręczników i skryptów. Był aktywnym członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Prowadził również żywą działalność w ramach Związku Zawodowego Pracowników Służby Zdrowia i podejmował liczne inicjatywy społeczne w miejscu zamieszkania.

Odszedł od nas Człowiek o dużej i szerokiej wiedzy, obdarzony oryginalnym i krytycznym umysłem, talentem pedagogicznym i pasją wychowawczą połączoną z intuicją i olbrzymim doświadczeniem. Służył nimi swym kolegom i młodzieży studenckiej bardziej niż dbał o własny dorobek naukowy. Był człowiekiem niecierpliwego, wielkiego i gorącego serca i znaczył nim wszystko to co robił. Pozostanie w naszej pamięci Człowiekiem o ogromnej i niezwyklej rzetelności i prawości. Człowiekiem, któremu ludzie zawdzięczają o wiele więcej niż On im.

Marek Gniazdowski

Anons Redakcji

Od drugiego zeszytu bieżącego tomu oprócz **artykułów monograficznych**, omawiających wąskie tematy, oraz **artykułów przeglądowych**, referujących szersze zagadnienia na podstawie materiałów z ostatniego roku lub dwu lat, publikować będziemy krótkie **noty** informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii.

Wznawiamy też **kronikę z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**, utrzymując oczywiście publikację **sprawozdań ze zjazdów i konferencji**, a także **recenzji** książek.

ROMUALD SKÓRKO *)

Enzymatyczne przyłączanie reszt ADP-rybozylowych do białek

Enzymatic Binding of ADP-ribosyl Moiety to Proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. ADP-rybozylotransferazy NAD^+ : białko organizmów prokariotycznych
 - II-1. Egzotoksyny bakteryjne
 - II-2. ADP-rybozylotransferazy wirusów bakteryjnych
 - II-3. ADP-ribosylation of proteins in non infected cells of *Escherichia coli*
 - II-4. Znaczenie biologiczne modyfikacji białek pod wpływem ADP-rybozylotransferaz prokariotów
- III. Modyfikacje białek przez przyłączanie reszt poli ADP-rybozylowych
 - III-1. Właściwości chemiczne i struktura łańcucha poli ADP-rybozy
 - III-2. Występowanie i właściwości transferazy ADP-rybozylowej NAD^+ : poli ADP-ryboza
 - III-3. Znaczenie biologiczne modyfikacji białek resztami poli ADP-rybozylowymi

Contents

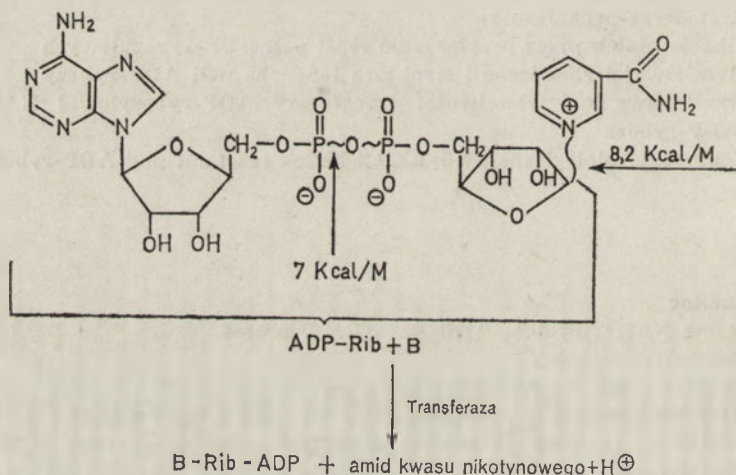
- I. Introduction
- II. Prokaryote NAD^+ : protein ADP-ribosyltransferases
 - II-1. Bacterial exotoxins
 - II-2. Bacteriophage ADP-ribosyltransferases
 - II-3. ADP-ribosylation of proteins in non infected cells of *Escherichia coli*
 - II-4. Biological function of protein modification by procaryotic ADP-ribosyltransferases
- III. Protein modifications by binding of poly (ADP-Rib)
 - III-1. Chemical properties and structure of the poly(ADP-Rib)
 - III-2. Occurrence and properties of NAD^+ : (ADP-Rib)_n ADP-ribosyltransferases
 - III-3. Biological role of ADP-ribosylation of proteins

*) Dr., Zakład Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet Gdański, Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Wykaz stosowanych skrótów: NAD^+ — forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego; AMP — mononukleotyd adeninowy; GTP — trifosforan guanozyny; NMN — mononukleotyd nikotynoamidowy; ADP-Rib — adenozyndwufosforyboza; EF-2 — aminoacylotransferaza II (czynn timerlongacyjny²); P-Rib-AMP — 2'(fosfo-5'-rybozyl)-5'-mononukleotyd adeninowy; P-5'-Rib — fosfo-5'-ryboza.

I. Wstęp

Proces przyłączania reszty ADP-rybozylowej lub poli ADP-rybozylowej do białek jest szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie drogą modyfikacji ich struktury i funkcji. Wiadomo, że zmodyfikowane w ten sposób białka biorą udział w regulacji procesów zachodzących w jądrze komórki. Stwierdzono również, że w komórkach bakterii zakażonych wirusem taka modyfikacja białek może powodować zmienioną transkrypcję DNA zarówno gospodarza jak i bakteriofaga. Obecność enzymu katalizującego reakcję przyłączania tych reszt wykryto również w mitochondriach oraz we frakcji białek rybosomowych. Znane są także silne egzotoksyny bakteryjne, których działanie na tkankę polega na enzymatycznym przyłączeniu reszty ADP-rybozylowej do niektórych jej białek. We wszystkich tu wymienionych modyfikacjach białek dawcą reszt ADP-rybozylowych jest NAD. Odszczepianie reszt ADP-rybozylowych od NAD, omawiane bardziej szczegółowo w części II i III tego artykułu, zachodzi poprzez enzymatyczne odłączenie od NAD amidu kwasu nikotynowego. Tak powstała reszta ADP-rybozylowa przenoszona jest przy udziale enzymu na odpowiednie białko akceptorowe. (Ryc. 1).



Ryc. 1. Reakcja modyfikacji białka przez przyłączenie do niego reszty ADP-rybozylowej. B — białko akceptorowe. Przy wiązaniach wysokoenergetycznych (~) podano wartości energii hydrolizy.

Reakcję tę katalizuje enzym ADP-rybozylotransferaza NAD: białko (E.C.2.7.8). Omawiana reakcja nie wymaga dodatkowego źródła energii, gdyż wykorzystuje energię hydrolizy wiązania N-glikozydowego (por. Ryc. 1) (1). W zależności od swoistości enzymu katalizującego reakcję białko akceptorowe mogą przyłączać jedną lub więcej reszt ADP-rybozylowych.

W ostatnich latach obserwuje się znaczne zainteresowanie tym proce-

sem, co znajduje odzwierciedlenie w coraz to większej ilości opublikowanych prac badawczych oraz artykułów przeglądowych (2, 3). Uzyskiwane informacje mają ważne znaczenie zarówno przy badaniu mechanizmów replikacji i reperacji DNA u eukariontów, jak przy badaniu regulacji transkrypcji DNA bakterii i bakteriofagów, czy też śledzeniu i ewentualnie zapobieganiu działania pewnych toksyn bakteryjnych.

W niniejszym artykule przedstawiono w skrócie wiadomości na temat enzymów biorących udział w procesie przyłączania reszt ADP-rybozylowych do białek zarówno w organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Podano również niektóre własności chemiczne produktów działania tych enzymów: związków mono ADP-rybozy i poli ADP-rybozy z modyfikowanymi białkami. Na tle tych danych omówiono dotychczasowe informacje o biologicznym sensie modyfikacji białek przez ich ADP-rybozylowanie.

II. ADP-rybozylotransferazy NAD^+ : białko w organizmach prokariotycznych

Niektóre toksyny wydzielane na zewnątrz przez bakterie posiadają zdolność enzymatycznego przyłączania reszty ADP-rybozylowej do określonego białka enzymatycznego komórki (czynnika EF-2 lub cyklazy adenylowej). Działają one na tkanki organizmów eukariotycznych. Toksyny te składają się z dwu elementów białkowych: fragmentu A i fragmentu B. Fragment B adsorbuje się na powierzchni komórki i umożliwia penetrację toksyny, bądź też samego fragmentu A do jej wnętrza. Fragment A z kolei działa wewnątrz komórki powodując ADP-rybozylowanie czynnika EF-2 lub cyklazy adenylowej, w zależności od rodzaju toksyny. W ostatecznym efekcie doprowadza to do blokady funkcji życiowych komórki.

Po zakażeniu komórek *E. coli* wirusem bakteryjnym T4, DNA zależna polimeraza RNA gospodarza ulega modyfikacji. Dokładniejsze badania wykazały, że zostaje ona zmodyfikowana przez przyłączenie reszty ADP-rybozylowej. Proces ten katalizują dwa enzymy pochodzące od faga zakażającego komórkę. Ostatnio wykryto również analogiczną ADP-rybozylotransferazę syntetyzowaną przez bakteriofag N4. Dokładne badania ekstraktu z niezakażonych komórek bakteryjnych *E. coli* wykazały, że zawiera on również enzym katalizujący reakcję przyłączania reszt mono ADP-rybozylowych do szeregu białek bakteryjnych.

II-1. Egzotoksyny bakteryjne

Toksyny produkowane przez *Corynebacterium diphtheriae*, *Vibrio cholerae* i *Pseudomonas aeruginosa*, mimo odmiennego mechanizmu działania fizjologicznego, charakteryzują się wspólną cechą, a mianowicie po

wniknięciu do wnętrza komórki wykazują aktywność ADP-rybozylotransferazy. Z wymienionych toksyn najdokładniej przebadano toksynę błonicy. Jest to toksyna produkowana przez lizogenny szczep *Corynebacterium diphtheriae* zawierający profaga β . Badania Uchida i wsp. (4) wykazały, że toksyna ta jest produktem genu fagowego. Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej około 63 000 (5). Enzymatycznie aktywną częścią jej cząsteczki jest jedynie fragment A o masie cząsteczkowej 24 000, powstały po redukcji łańcucha polipeptydowego toksyny ditiotreitolem i łagodnej hydrolizie trypsyną (6, 7).

Znany od 1959 roku fakt, że toksyna ta powoduje zahamowanie biosyntezy białek w komórkach HeLa (8) został ostatnio wyjaśniony (9—11). Zahamowanie procesu biosyntezy białka powstaje w wyniku zablokowania aminoacylotransferazy II — enzymu odpowiedzialnego za translokację peptydylo tRNA na rybosomie (tzw. czynnik EF-2), przez przyłączenie do niego pojedynczej reszty ADP-rybozy wg reakcji:

fragment A toksyny
błonicy



Reakcja ta jest odwracalna; inkubacja toksyny z amidem kwasu nikotynowego oraz zmodyfikowanym białkiem EF-2 doprowadza do odtworzenia cząsteczki NAD^+ oraz odzyskania aktywności czynnika EF-2 (13).

Analiza czynników EF-2 wydzielonych z tkanek różnych ssaków wykazała ich znaczne podobieństwo w budowie (13). Można więc przypuszczać, że podany powyżej mechanizm inaktywacji czynnika EF-2 z wątroby szczura ma charakter bardziej ogólny. Do chwili obecnej nie wiadomo, do którego aminokwasu łańcucha polipeptydowego czynnika EF-2 przyłącza się reszta ADP-rybozy. Analiza sekwencji aminokwasów odcinka czynnika EF-2, przyłączającego resztę ADP-rybozy sugeruje, że jest to prawdopodobnie słabo zasadowy aminokwas o strukturze odmiennej od aminokwasów powszechnie występujących w przyrodzie (14). Wyizolowany fragment A toksyny podany do organizmu zwierzęcego wywołuje znikomy efekt toksyczny, co może być spowodowane trudnością jego wnikiwania do komórki (15, 16). Ta obserwacja skłoniła do badań nad biologiczną funkcją fragmentu B. Stwierdzono, że łączy się on z błoną komórkową (17), co prawdopodobnie umożliwia przeniknięcie toksyny lub jej fragmentu A do wnętrza komórki (18). Chemiczna modyfikacja aminokwasów fragmentu A wskazuje, że istotną rolę w jego centrum aktywnym odgrywa reszta tyrozyny (19).

Biologiczny sens ADP-rybozylowania czynnika EF-2 nie jest poznany. Mimo utraty zdolności do udziału w biosyntezie białka, zmodyfikowany czynnik EF-2 utrzymuje nadal niektóre właściwości charakterystyczne dla

formy aktywnej: zachowuje zdolność wiązania się z rybosomem (20) oraz wiązania GTP. Kompleksy z GTP tworzy zarówno ADP-rybozylowa pochodna czynnika EF-2 pochodzącego z materiału zwierzęcego (21), jak i roślinnego, i to w stopniu niezależnym od obecności rybosomów (22). Przyłączenie reszty ADP-rybozylowej do czynnika EF-2 powoduje jednak utratę jego zdolności do wiązania się z rybosomowym RNA (23).

Toksyna produkowana przez *Pseudomonas aeruginosa*, mimo odmiennych symptomów klinicznych oraz własności molekularnych i immunologicznych w porównaniu z toksyną błonicy, wykazuje identyczny mechanizm działania wewnątrzkomórkowego. Blokująca biosyntezę białek w komórkach eukariontów poprzez inaktywację czynnika elongacji EF-2, w sposób analogiczny przenosząc reszty ADP-rybozylowe z NAD na białko EF-2 (24).

Mechanizm działania toksyny *Vibrio cholerae*, często zwanej cholera-genem, różni się od mechanizmu działania toksyn omówionych poprzednio. Toksyna ta, jak wykazał Gill (25), aktywuje cyklazę adenylową (E.C. 4.6.1.1.) poprzez enzymatyczne przeniesienie reszty ADP-rybozylowej z NAD na białko akceptorowe cyklazy adenylowej (26). Sama toksyna może również ulegać takiej modyfikacji (27). Z cholera-genem, podobnie jak z toksyny błonicy, można wyizolować podjednostki A i B. W tym celu wystarcza sączenie molekularne w roztworze 6,5 M mocznika (26). W obecności czynników redukujących obserwuje się dalszą fragmentację polipeptydu A (o m.c. 28 000) na jednostki A₁ (4000—4500) i A₂ (20 000—24 000) (28).

Podjednostka A toksyny jest czynnikiem aktywującym cyklazę adenylową, zaś podjednostka B wiąże się specyficznie z receptorem powierzchniowym komórki — monosjalogangliozydem GM₁ i, podobnie jak w przypadku toksyny błonicy, ułatwia przenikanie podjednostki A do nieuszkodzonej komórki (29, 30). Dotychczasowe badania mechanizmu działania cholera-genem wykazały, że przyłącza on resztę ADP-rybozylową do reszty argininowej białka receptorowego (31).

II-2. ADP-rybozylotransferazy wirusów bakteryjnych

W genomie bakteriofaga T4 zakodowane są dwie transferazy zdolne do przenoszenia reszty ADP-rybozylowej z NAD na swoiste białka (32). Jedną z nich jest „białkiem wewnętrznym” dojrzałego faga T4, prawdopodobnie zlokalizowanym w jego główce (33). Druga transferaza występuje tylko w komórce bakteryjnej i jest syntetyzowana w pierwszych minutach po zakażeniu komórki fagiem T4. W czasie zakażenia enzym pierwszy przenika do komórki bakterii łącznie z wirusowym DNA. W komórce następuje enzymatyczne przyłączanie reszty ADP-rybozylowej do pod-

jednostek bakteryjnej polimerazy RNA oraz do innych, niezidentyfikowanych dotąd białek bakteryjnych. Wśród białek zmodyfikowanych znajduje się również omawiana transferaza (34). Wyniki analizy chromatograficznej wykazały, że tylko jedna podjednostka α polimerazy RNA ulega modyfikacji przez przyłączenie jednej reszty ADP-rybozylowej (34, 35, 36, 37, 38). Podjednostki β , β' i czynnik σ polimerazy są znacznie słabszymi akceptorami niż podjednostka α ; tylko ich niewielki procent jest modyfikowany. Reakcja ta w warunkach *in vivo* jest odwracalna, prawdopodobnie przy udziale dodatkowego enzymu, glikohydrolazy (38).

ADP-rybozylotransferaza zawarta w fagu T4 jest pojedynczym polipeptydem o m.c.z. 70 000. Wykazuje maksimum aktywności w minutę po zakażeniu bakterii wirusem (34) niezależnie od intensywności syntezy białka w zakażonej komórce gospodarza (38). Przemiany w komórce bakteryjnej spowodowane czynnością jej nazwane zostały alteracją.

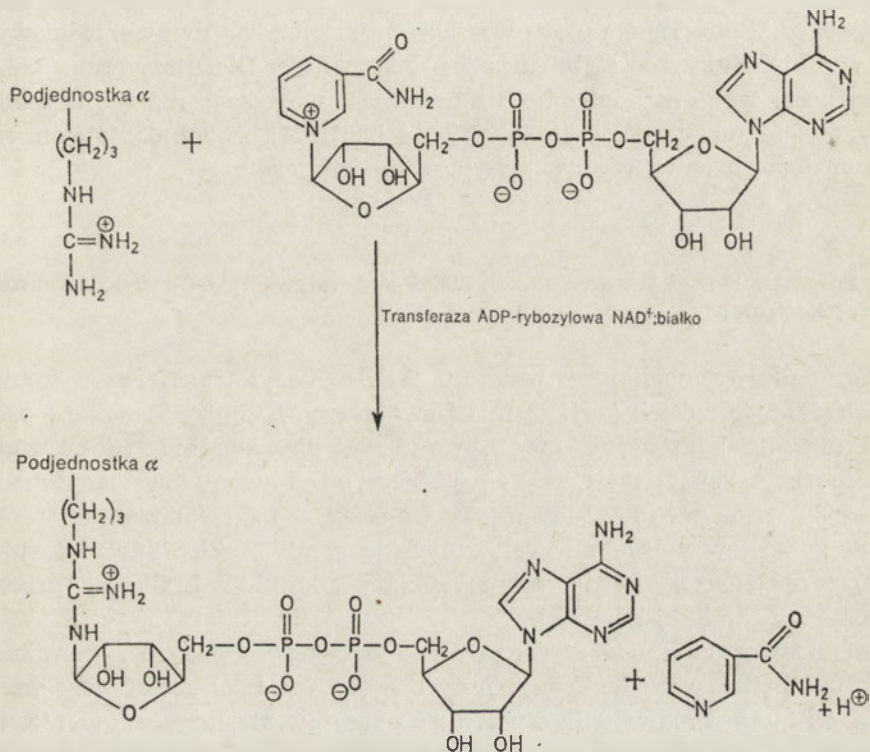
Po upływie dwóch minut od momentu zakażenia, w komórkach wykrywa się aktywność drugiej ADP-rybozylotransferazy. Charakteryzuje się ona bardzo dużą wybiórczością; modyfikuje wyłącznie dwa rodzaje białek: podjednostkę α polimerazy RNA i polipeptyd o m.c.z. ok. 13 000 (39). Największą aktywność ADP-rybozylotransferaza druga wykazuje w cztery minuty po zakażeniu bakterii fagiem, po czym jej aktywność szybko maleje spadając w ciągu dalszych sześciu minut do około 10% swej maksymalnej wartości. Modyfikuje ona obie podjednostki α polimerazy RNA. Przemiany w komórce gospodarza spowodowane jej aktywnością nazwano modyfikacją.

Transferaza katalizująca proces modyfikacji jest zbudowana najprawdopodobniej z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o m.c.z. 25—26 000. Jej trzykrotnie mniejsza masa cząsteczkowa w porównaniu z enzymem powodującym alterację umożliwia ominięcie zawady przestrzennej istniejącej w kompleksie podjednostek polimerazy RNA i modyfikację obu cząsteczek α .

Mimo różnic w swoistości działania transferaz powodujących procesy alteracji i modyfikacji, enzymy te posiadają szereg cech wspólnych. Podobnie do innych poznanych enzymów wirusowych są bardzo wrażliwe na wzrost siły jonowej: optymalne stężenie soli jest dla nich znacznie niższe od wartości wymaganej przez enzymy bakteryjne i nie przekracza 20 mM. Oba enzymy charakteryzuje jednakowe optimum pH wynoszące 7,5 oraz zbliżona wartość K_M (dla enzymu „alterującego” $K_M = 0,5 \times 10^{-4}$ M zaś dla enzymu „modyfikującego” $K_M = 1,4 \times 10^{-4}$ M). Inhibitorem kompetetywnym obu enzymów jest produkt rozszczepienia NAD — amid kwasu nikotynowego. Omawiane enzymy nie wymagają obecności jonów Mg^{+2} , są w pełni aktywne w obecności EDTA, a związki redukujące działają na nie stabilizująco. Oba enzymy w układach bezkomórkowych są wrażliwe na działanie podwyższonej temperatury. Enzym katalizujący proces alte-

racji po inkubacji przez 15 minut w temp. 37°C traci 40% swej aktywności wyjściowej. W związku z tym aktywność obu enzymów należy badać w przedziale temperatur od 15–20°C.

Z wyników analizy „finger printing” po hydrolizie enzymatycznej można wnioskować, że zarówno w procesie alteracji jak i modyfikacji reszta ADP-rybozy przyłączana zostaje tylko do jednego miejsca podjednostki α polimerazy RNA (39, 40) przy czym reszta ADP-rybozy wiąże się najprawdopodobniej z grupą guanidynową reszty arginy w sposób podany na ryc. 2.



Ryc. 2. Proponowany przebieg reakcji modyfikacji podjednostki polimerazy RNA przez przyłączenie reszty ADP-Rib do grupy guanidynowej reszty arginy (39).

Amid kwasu nikotynowego dodany do układu zawierającego zmodyfikowaną podjednostkę α oraz którąkolwiek z omawianych transferaz nie usuwa reszty ADP-rybozylowej z białka, tak jak ma to miejsce w przypadku toksyny błonicy. Wskazuje to na nieodwracalność reakcji modyfikacji (39).

ADP-rybozylotransferazę wykryto również w dojrzałym bakteriofagu N4. Enzym ten, podobnie jak u faga T4, jest białkiem wewnętrznym wirusa i katalizuje reakcje przenoszenia reszty ADP-rybozylowej z NAD na około 30 różnych białek bakteryjnych. W odróżnieniu jednak od ADP-rybozylotransferazy faga T4 to białko enzymatyczne nie modyfikuje podjednostek polimerazy RNA (42, 43).

II-3. ADP-rybozylowanie białek w niezakażonych komórkach *E. coli*

W trakcie badań szczepu *E. coli* B/r zakażonego fagiem T4 oprócz aktywności transferazy pochodzenia wirusowego stwierdzono także obecność podobnej aktywności enzymatycznej pochodzenia bakteryjnego (39, 44). Enzym bakteryjny katalizuje reakcję rozszczepiania NAD^+ i przenoszenia powstałej reszty ADP-rybozylowej na szereg białek bakteryjnych, a w układzie *in vitro* również na lizozym jaja kurzego. Podobnie jak enzym faga N4, nie przyłącza on reszt ADP-rybozylowych do żądanej z podjednostek polimerazy RNA i jest hamowany przez amid kwasu nikotynowego. Nie wymaga ponadto obecności jonów dwuwartościowych a czynniki redukujące stabilizują jego aktywność. Dla utrzymania pełnej aktywności tego enzymu potrzeba natomiast większego niż w przypadku enzymów fagowych stężenia soli (rzędu 200 mM). Podobnie jak enzymy fagowe jest on wrażliwy na podwyższoną temperaturę.

II-4. Znaczenie biologiczne modyfikacji białek pod wpływem ADP-rybozylotransferaz prokariotów

Molekularny mechanizm działania ADP-rybozylotransferaz w komórce w zależności od ich pochodzenia bywa różny. Enzymy te, jak na przykład toksyny bakteryjne, mogą powodować blokadę biosyntezy białka w komórkach zakażonych zwierząt poprzez inaktywację aminoacylotransferazy II, bądź też powodować szybki rozkład nagromadzonych w komórce związków wysokoenergetycznych (z grupy nukleotydtrójfosforanów) przez znaczne uaktywnienie cykazy adenylowej. Oba te procesy prowadzą do śmierci komórki.

ADP-rybozylotransferazy faga T4 (a być może i enzym z niezakażonych bakterii *E. coli*) wykazują inny mechanizm działania. Polega on na regulacji i ukierunkowywaniu pewnych procesów biochemicznych (45, 46). Zmodyfikowanie przez te enzymy podjednostki α polimerazy RNA powoduje, że kompleks enzymatyczny podjednostek $\alpha_{\text{zmod.}}$ $\beta\beta'$ polimerazy wykazuje zmniejszone powinowactwo do czynnika σ (36) i zmienione oddziaływanie z białkiem terminatorowym ρ (47). Następstwa tej modyfikacji nie zostały jeszcze w pełni zbadane. Jednakże w układzie *in vitro* udało się wykazać wyraźne różnice działania normalnej i zmodyfikowanej polimerazy RNA, które uwidaczniają się przy badaniu swoistości transkrypcji: polimeraza zmodyfikowana odczytuje wolniej informację genetyczną zawartą w DNA komórek *E. coli* niż niezmieniona polimeraza, lecz proces ten przebiega z normalną szybkością w genomie faga T4 (48). Są również dane wskazujące, że może ona odczytywać nawet większą ilość tak zwanych „nie wczesnych” i „późnych” genów faga T4 w porównaniu z niezmienioną polimerazą (48, 49). Zjawisko to bywa tłumaczone różną zdol-

nością polimerazy RNA do tworzenia kompleksów w miejscach promotorowych DNA. Miejsca promotorowe DNA mogą się różnić między sobą trwałością tworzonych kompleksów DNA—polimeraza RNA (50). Modyfikacja polimerazy RNA może powodować zmiany utrudniające tworzenie kompleksów ze „słabymi” promotorami *E. coli* (tj. z sekwencjami nukleotydów w miejscu promotorowym charakteryzujących się tworzeniem nietrwałych kompleksów z polimerazą) (51). Natomiast w przypadku DNA faga T4, o którym wiadomo, że posiada tzw. „silne” miejsca promotorowe, modyfikacja polimerazy RNA nie powoduje zmniejszenia zdolności jej wiązania z DNA fagowym, co pozwala na transkrypcję nowych genów.

III. Modyfikacja białek przez przyłączanie reszt poli ADP-rybozylowych

Mechanizm modyfikacji białek polegający na przyłączaniu do nich reszt ADP-rybozylowych jest różny u prokariotów i eukariotów. W organizmach prokariotycznych nie posiadających wykształconego jądra komórkowego, modyfikacja białek polega na przyłączaniu wyłącznie monomerów ADP-rybozy. Organizmy wyżej zorganizowane mogą natomiast modyfikować swe białka również przez przyłączanie reszt poli ADP-rybozylowych. Do chwili obecnej nie zostało jeszcze stwierdzone ile enzymów bierze udział w procesie poli ADP-rybozylowania białek. W reakcji tej mogą brać udział ligaza i transferaza (Ryc. 3A) bądź też dwie lub więcej transferaz (Ryc. 3B). Za układem dwu lub wieloenzymatycznym przemawiają dwie wartości K_M reakcji poli ADP-rybozylowania przebiegającej w jądrach komórek HeLa przy użyciu NAD jako substratu (52), a także odmienne wartości K_M w reakcjach syntezy krótkich i długich łańcuchów poli ADP-rybozy (53). W tworzeniu poli ADP-rybozy z ADP-rybozy i przyłączaniu utworzonego polimeru do białka można wyróżnić conajmniej dwa różne typy wiązań chemicznych, co przemawia również za udziałem w tej reakcji złożonego układu enzymatycznego (55, 56).

Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* z użyciem oczyszczonej transferazy poli ADP-rybozylowej oraz w obecności DNA, jako czynnika stymulującego, sugerują jednak, że reakcję przyłączania do białka kolejnych reszt ADP-rybozylowych przeprowadza jeden enzym (Ryc. 3C) (57, 58). W doświadczeniach *in vitro* dobrze oczyszczony enzym syntetyzuje polimer ADP-rybozy tylko w obecności DNA i NAD (59). Wykryto przy tym powstawanie oligomeru ADP-rybozy kowalencyjnie związanego z białkiem enzymatycznym nawet po bardzo krótkim okresie inkubacji. Wydaje się zatem, że ta reakcja może przebiegać w obecności tylko jednego enzymu (Ryc. 3C). Wysłunięto przypuszczenie, że proces przyłączania reszty poli ADP-rybozylowej do białek przebiega najpierw poprzez przyłączenie

pojedynczej reszty ADP-rybozylowej do białka, a następnie przez dołączanie do niej dalszych reszt ADP-rybozylowych (60). W przypadku braku odpowiednich akceptorów białkowych polimery ADP-rybozylowe syntetyzowane są na białku enzymatycznym i *in vitro*, mogą być od niego odczepiane w środowisku alkalicznym. Uwolniony enzym może katalizować następną reakcję polimeryzacji (58, 59).

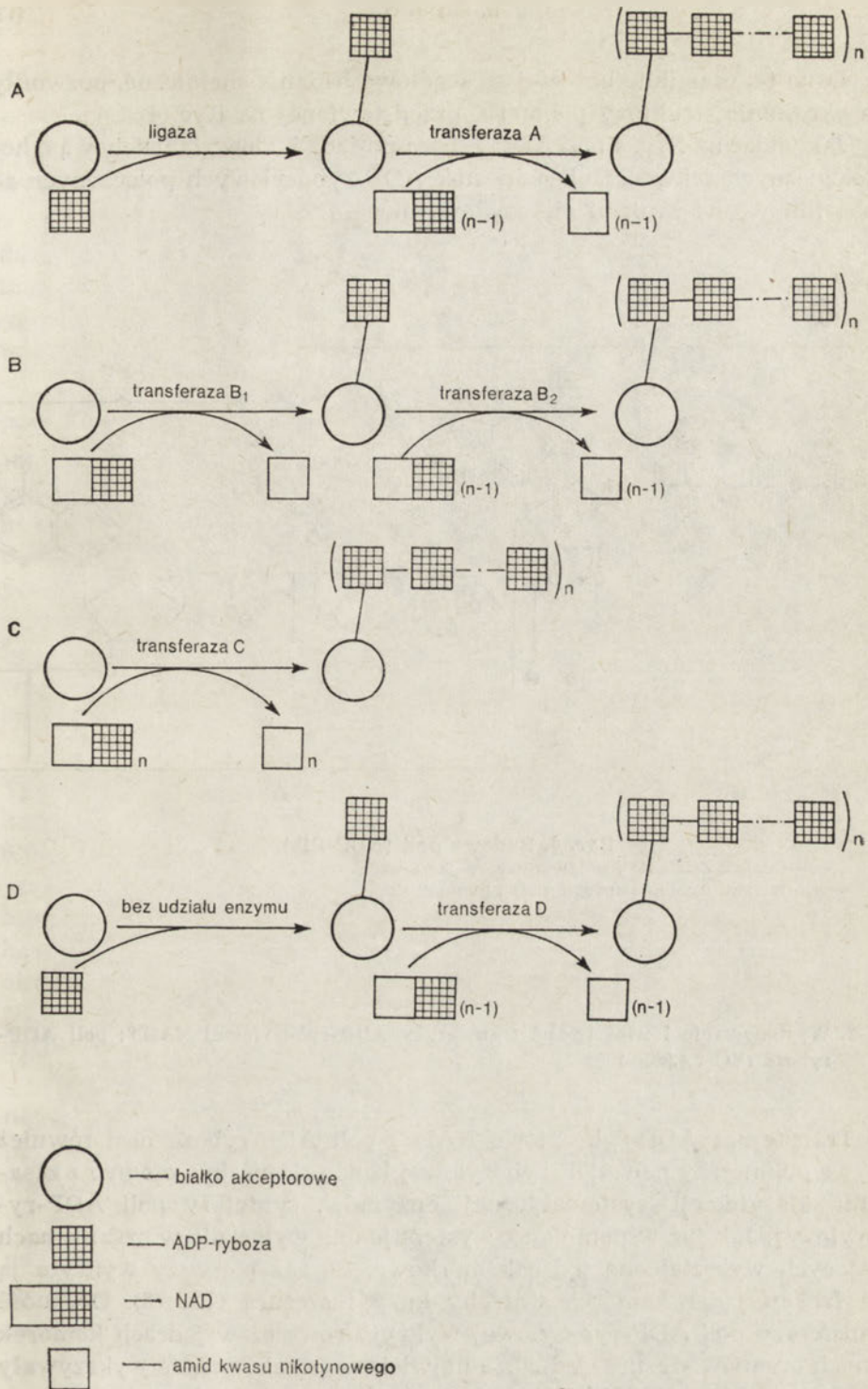
Badania Kuna i wsp. wykazały, że cząsteczka ADP-rybozy może łączyć się z grupą ϵ aminową reszty lizyny bez udziału enzymu tworząc wiązanie typu zasady Schiffa (61). Tak więc inicjacja reakcji poli ADP-rybozylowania białka, polegająca prawdopodobnie na przyłączeniu do niego pojedynczej cząsteczki ADP-rybozy, może zachodzić w drodze nieenzymatycznej (Ryc. 3D). Modyfikacji przez przyłączanie reszty poli ADP-rybozylowej mogą ulegać białka histonowe (62—65) i białka niehistonowe (66), a wśród nich niektóre enzymy jądra komórkowego (67, 68).

Do chwili obecnej nie wiadomo do jakich aminokwasów ulegają przyłączeniu reszty poli ADP-rybozy. Wyniki analiz zmodyfikowanego histonu H_1 z jądra komórki wątroby szczura wskazują, że w wiązaniu tym mogą brać udział grupy karboksylowe reszt kwasu asparaginowego bądź glutaminowego (3), albo też reszta seryny (67). Nie znana jest również maksymalna długość łańcuchów poli ADP-rybozy syntetyzowanych *in vivo*. W jądrach komórek HeLa wykryto połączenie polimeru zawierające 15 jednostek ADP-rybozy z dwoma łańcuchami białka histonowego H_1 (69). W warunkach *in vitro* udało się uzyskać polimery zawierające aż 38 reszt ADP-rybozy (70).

III-1. Właściwości chemiczne i struktura łańcucha poli ADP-rybozy

Dłuższe łańcuchy poli ADP-rybozy od 20 do 30 jednostek monomerycznych rozpuszczalne są wprawdzie w wodzie i roztworach zasadowych, ale łatwo jest je wytrącić z roztworu w środowisku kwaśnym, co pozwala na oddzielenie ich od krótkich oligomerów, pozostających w tych warunkach w roztworze (71). Procesowi wytrącania sprzyja obecność jonów Mg^{+2} (72).

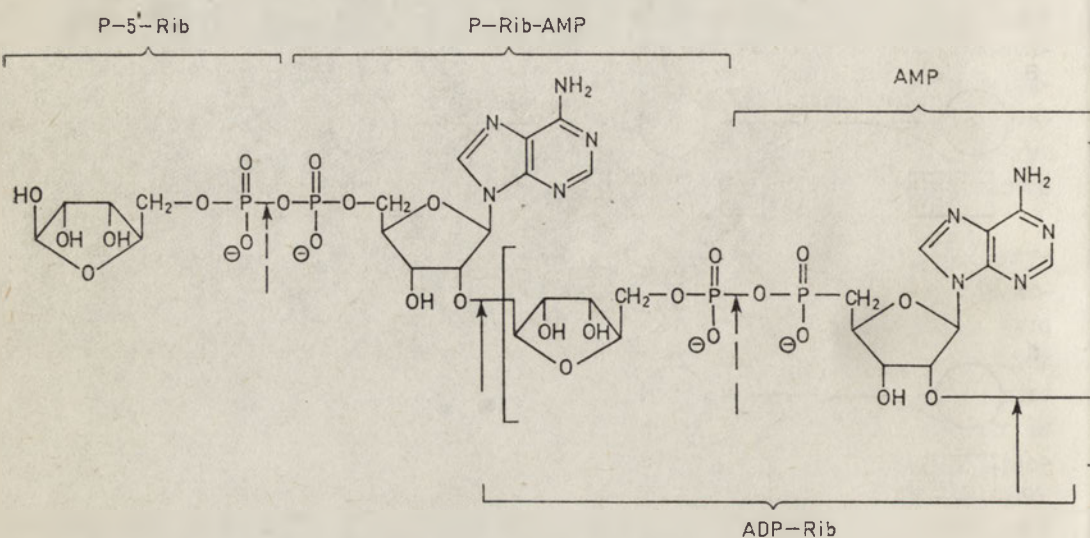
Łańcuchy poli ADP-rybozy, w przeciwieństwie do monomerów są odporne na działanie zasad natomiast łatwo hydrolizują w 1N roztworze kwasu solnego (73). Stwierdzono, że polimery te są odporne na działanie takich enzymów jak DNA-aza I, DNA-za II (z trzustki), RNA-za I, RNA-za II, nukleaza z *Micrococcus sp.*, pirofosfataza nukleotydowa z ziemniaka oraz fosfodwuesteraza ze śledziony (73), a ulegają hydrolizie tylko pod wpływem fosfodwuesterazy jadu grzechotnika (71) i fosfodwuesterazy wątroby szczura (74) z wytworzeniem AMP, P-rybozo-AMP oraz P-5'-rybozy (Ryc. 4). Ponadto poli ADP-ryboza ulega również rozkładowi do monomerów ADP-rybozy pod wpływem swoistej glikohydrolizy, zwykle towarzyszącej w komórce transferazie poli ADP-rybozylowej.



Ryc. 3. Schematy przebiegu reakcji poli ADP-rybozylowania białek z udziałem wielu enzymów (A, B) lub jednego enzymu (C, D). Omówienie w tekście.

Dane te, oraz inne bardziej szczegółowe badania chemiczne, pozwoliły na określenie struktury polimeru, przedstawionej na Ryc. 4

Jak widać na Ryc. 4 poli ADP-ryboza posiada budowę łańcuchową o homologicznych sekwencjach jednostek ADP-rybozylowych połączonych ze sobą liniowo wiązaniami glikozydowymi



Ryc. 4. Budowa poli (ADP-Rib).

-----> miejsce działania fosfodwuesterazy jadu węża
 —————> miejsce działania specyficznej glikohydrolazy

III-2. Występowanie i właściwości transferazy ADP-rybozylowej NAD^+ : poli ADP-ryboza (EC 2.4.99.—)

Transferaza ADP-rybozylowa NAD^+ : poli ADP-ryboza nosi również nazwę polimerazy poli ADP-rybozylowej bądź też, niezbyt zgodnie z zasadami klasyfikacji systematycznej enzymów, syntetazy poli ADP-rybozylowej. Jak już wspomniano, występuje ona wyłącznie w organizmach mających wykształcone jądro komórkowe. Po raz pierwszy wykryto ją we frakcji jąder komórek wątroby kury i szczura (73, 75). Obecność transferazy poli ADP-rybozylowej wykryto również w jądrach komórek innych organów szczura, jednakże największą jej aktywność wykazywały preparaty z wątroby (73). Dalsze badania doprowadziły do wykrycia tego enzymu w komórkach wielu innych organizmów zarówno zwierzęcych jak i roślinnych (2).

Transferaza poli ADP-rybozylowa występuje w jądrze w połączeniu z chromatyną (60, 76), zaś w cytoplazmie komórek HeLa ze strukturami rybosomowymi (77). Poza jądrem komórkowym udało się ją odnaleźć także w mitochondriach (76).

Poznane dotychczas transferazy poli ADP-rybozylowe są białkami zbudowanymi z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej (72, 79, 80). W trakcie oczyszczania preparatu drogą sączenia molekularnego enzym występuje zwykle w paru szczytach, wskutek skłonności do agregacji (81).

Reakcja przyłączania reszt poli ADP-rybozylowych przez transferazę poli ADP-rybozylową jest nieodwracalna (73).

Optymalne stężenie jonów wodorowych w reakcji polimeryzacji katalizowanej przez transferazy wyodrębniane z różnych organizmów odpowiada wartości pH około 8. Transferaza charakterystyczna dla komórek eukariontów, w przeciwieństwie do transferazy mono ADP-rybozylowej prokariontów, wymaga obecności w środowisku reakcji jonów Mg^{+2} a czasami Mn^{+2} (82), przy czym optymalne stężenie jonów Mg^{+2} może być uzależnione od stężenia NAD (83). W celu zapewnienia optymalnych warunków reakcji w doświadczeniach *in vitro* wymagana jest również obecność substancji redukujących jak ditiotreitól (83).

Omawiany enzym charakteryzuje się dużą wybiórczością substratową. Tylko dwa związki: βNAD^+ i 4'dezoksy βNAD^+ mogą być przez niego wykorzystywane jak substrat (84). Analogi tych związków, takie jak βNAD^+H_2 , αNAD^+ czy też NADP nie są wykorzystywane przez enzym jako dawcy grup ADP-rybozylowych, a ich obecność w środowisku reakcji hamuje aktywność badanego enzymu. Transferaza poli ADP-rybozylowa hamowana jest również przez amid kwasu nikotynowego — produkt reakcji ADP-rybozylowania oraz przez jego analogi (kwas nikotynowy, NMN, 3-acetylopirydyna) a także tymidynę i jej analogi (dezoksytymidyna, bromodezoksyurydyna, bromourydyna, rybozotymidyna) (86).

Optymalna temperatura reakcji syntezy poli ADP-rybozy prowadzonej w doświadczeniach *in vitro* jest przeważnie o 10—15°C niższa od temperatury, w której normalnie rozwijają się komórki wytwarzające daną transferazę i wynosi od 10—25°C.

DNA oraz białka histonowe silnie pobudzają aktywność transferazy poli ADP-rybozylowej (2, 3), a oddziaływanie DNA zachodzi w sposób następujący. Omawiany enzym może istnieć w dwu różnych stanach konformacyjnych: jednym, zapewniającym mu pełną aktywność i niezależność od obecności DNA oraz drugim, nieaktywnym. Ten drugi stan konformacyjny ulega przekształceniu w postać aktywną dopiero w obecności preparatu DNA (87).

Funkcja białek histonowych w procesie zwiększania aktywności oma-

wianej transferazy nie została dotąd wyjaśniona. Być może pełnią one rolę akceptora białkowego dla reszt ADP-rybozylowych, jednakże w układach *in vitro* zawierających dobrze oczyszczone preparaty enzymatyczne zarówno reakcja przyłączania pierwszych reszt ADP-rybozylowych jak i dalszy proces polimeryzacji przebiega w obrębie cząsteczek samej transferazy, bez udziału histonów (58, 59). Przypuszcza się więc, że białka histonowe stymulują omawianą reakcję enzymatyczną poprzez oddziaływanie na cząsteczki enzymu, szczególnie gdy jest on w kompleksie z DNA (57).

III-3. Znaczenie biologiczne modyfikacji białek resztami poli ADP-rybozylowymi

Istnieje wiele danych które wskazują, że poli ADP-rybozylowanie białek jest jednym z podstawowych procesów regulacji replikacji i transkrypcji w organizmach eukariontycznych. Wykryto, że w jądrach komórek ssaków praktycznie wszystkie reszty ADP-rybozylowe są kowalencyjnie powiązane z białkami (88). Fakt ten sugeruje, że ADP-rybozylowanie białek stanowi nowy typ regulacji aktywności wewnątrzkomórkowej, który jest realizowany poprzez zmiany konformacji i funkcji białek, przede wszystkim białek jądra komórkowego, w sposób analogiczny jak w przypadku ich fosforylacji, metylacji czy acetylacji.

Zważywszy na fakt, że wiele biologicznie ważnych białek ulega takiej modyfikacji (62, 68), można przypuszczać, że jest to proces o szerokim zakresie działania. Przemawia za tym również obecność transferazy poli ADP-rybozylowej nie tylko w jądrze komórkowym, ale również w izolowanej frakcji rybosomów oraz mitochondriach (77, 76). Wiadomo, że wśród białek jądra ulegają takiej modyfikacji endonukleazy zależne od Ca^{+2} i Mg^{+2} , tracąc przy tym aktywność (67). ADP-rybozylowanie białek może mieć także związek z replikacją DNA. Jak wiadomo, największą aktywność transferazy poli ADP-rybozylowej wykrywa się w jądrze komórkowym, gdzie jest ona stymulowana przez białka histonowe i DNA. O współzależności procesów replikacji i rybozylowania białek dodatkowo mogą świadczyć obserwowane zmiany aktywności tej transferazy w zależności od fazy jej cyklu komórkowego. Najwyższa aktywność transferazy występuje w komórkach po zakończeniu biosyntezy DNA (faza G2), natomiast w czasie biosyntezy DNA (to jest w fazie S) aktywność tego enzymu jest najniższa (89). Bardzo prawdopodobny jest także udział transferazy poli ADP-rybozylowej w procesie reperacji DNA (90). Przemawiają za tym następujące obserwacje: a) W reakcji prowadzonej *in vitro* fragmenty DNA bardziej stymulują aktywność transferazy poli ADP-rybozylowej niż natywne cząsteczki DNA (91). b) Dodanie do mieszaniny reakcyjnej, zawierającej jądra komórek HeLa, DNA-zy I lub nukleazy z *Micrococcus* powoduje cztero—sześciokrotny wzrost aktywności tej

transferazy (92). Wykrycie w jądrach komórek HeLa kompleksów poli ADP-rybozy z cząsteczkami histonu H₁ nasuwa również przypuszczenie, że polimer ów może brać udział w sieciowaniu włókien chromatyny, lub wpływać na lokalne zmiany jej struktury z bardziej na mniej rozproszoną, utrudniającą transkrypcję i replikację (69).

Modyfikacja białek na drodze poli ADP-rybozylowania może być odwracalna *in vivo*. Transferazom poli ADP-rybozylowym towarzyszą zwykle w komórce swoiste glikohydrolazy, zdolne do hydrolizy przyłączonych łańcuchów poli ADP-rybozylowych i uwalniania zablokowanych białek enzymatycznych (93—99).

Zatem układ swoistych transferaz ADP-rybozylowych i glikohydrolaz wydaje się być jeszcze jednym elementem układu regulującego funkcje genomu komórkowego a być może także czynności rybosomów i mitochondriów.

Zaakceptowano do druku 7.9.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Zatman L. J., Kaplan N. O., Colowick S. P., (1953), *J. Biol. Chem.*, **200**, 197—212
2. Hilz H., Stone P., (1976), *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1—58
3. Hayaishi O., Ueda K., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 95—116
4. Uchida T., Gill D. M., Pappenheimer IR. A. M., (1971), *Nature (Lond.) New. Biol.*, **233**, 8—11
5. Everse J., Garndner D. A., Kaplan N. O., Galasiński W., and Moldave K., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 899—901
6. Collier R. J., Cole H. A. (1969), *Science*, **1964**, 1179—1182
7. Collier R. J., Traugh J. A. (1969), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 589—594
8. Strauss N., Hendee E. D. (1959), *J. Exp. Med.*, **109**, 145—163
9. Honjō T., Nishizuka Y., Hayaishi O., Kato I., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3553—3555
10. Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O., (1969), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **34**, 603—608
11. Honjo T., Nishizuka Y., Kato I., Hayaishi O. (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4251—4260
12. Honjo T., Hayaishi O. (1973) w *Current Topics in Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 7, str. 87—127, Academic Press, London
13. Merrick W. C., Kemper W. M., Kantor J. A., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2620—2625
14. Maxwell E. S., Robin'son E. A., Henriksen O., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 9_p—b
15. Collier R. J., Kandel J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1496—1503
16. Gill D. M., Pappenheimer A. M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1492—1495
17. Everse J., Lappi D. A., Beglan J. M., Lee C.-L., Kaplan N. O., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 472—476
18. Drazin R., Kandel J., Collier R. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1504—1510

19. Beugnier N., Zanen J., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **490**, 225—234.
20. Bermek E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6544—6549
21. Chuang D. M., Weissbach H., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 114—124
22. Twardowski T., Legocki A., (1977), *Acta Biochem. Polon.*, **24**, 21—33
23. Traugh J. A., Collier R. J., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2357—2366
24. Iglewski B. H., Kabat D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2284—2289
25. Gill D. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2064—2068
26. Moss J., Manganillo V. C., Vaughan M., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4424—4427
27. Trepel J. B., Chuang D. M., Neff N. H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5440—5442
28. Finkelstein R. A., Boesman M., Neoh S. H., La Rue M. K., Delaney R., (1974), *J. Immunol.*, **113**, 145—150
29. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3547—3558
30. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3558—3566
31. Moss J., Vaughan M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2455—2457
32. Horvitz H. R., (1974), *J. Mol. Biol.*, **90**, 739—750
33. Laemmli U. K., (1970), *Nature (Lond.)*, **227**, 680—685
34. Rohrer H., Zillig W., Mailhammer R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 227—238
35. Seifert W., Rabussay D., Zillig W., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 175—179
36. Rabussay D., Mailhammer R., Zillig W., (1972), w *Metabolic Interconversion of Enzymes*, red. Wieland O., Helmreich E., Holzer H., str. 213—227, Springer Verlag, Berlin
37. Goff C. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6181—6190
38. Horvitz H. R., (1974), *J. Mol. Biol.*, **90**, 727—738
39. Skórko R., Zillig W., Rohrer H., Fujiki H., Mailhammer R., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 55—66
40. Zillig W., Fujiki H., Mailhammer R., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)* **77**, 1—11
41. Mailhammer R., (1976), rozprawa doktorska: Strukturelle Modifikationen der DNA-Abhängigen RNA Polymerase in *E. coli* nach Infektion mit dem Bakteriophagen T4, Schadel und Wehle, München
42. Pesce A., Casoli C., Schito G. C., (1976), *Nature*, **262**, 412—414
43. Schito G. C., Ceci M., Pesce A., Casoli C., (1976), *Proceedings of the 4th Internat. Symp. on „Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins”*, red. Hilz H., str. 10—11, Walter de Gruyter, Berlin
44. Skórko R., badania własne
45. Zillig W., Mailhammer R., Skórko R., Rohrer H., (1977), w *Current Topics in Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 12, str. 263—271, Academic Press, London
46. Mailhammer R., Rohrer H., Skórko R., Zillig W., (1976), *Proceedings of the 4th Internat. Symp. on „Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins”*, red. Hilz H., str. 10, Walter de Gruyter, Berlin
47. Schäfer R., Zillig W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 215—226
48. Mailhammer R., Yang H.-L., Reiness G., Zubay G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 4928—4932
49. Rabussay D., Geiduschek E. P., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5305—5309
50. Chamberlin M. J., (1976), RNA Polymerase str. 159—191, Cold Spring Harbor Laboratory.

51. Khesin R., Bogdanowa E., Goldfarb A., Zograff J., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 299—313
52. Kidwell W. R., Burdette K. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 766—773
53. Dietrich L. S., Siebert G., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 1133—1140
54. Stone P. R., Hilz H., (1975), *FEBS Letters*, **57**, 209—212
55. Smith J. A., Stocken L. A., (1975), *Biochem. J.*, **147**, 523—529
56. Adamietz P., Hilz H., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 527—534
57. Yamada M., Sugimura T., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3303—3308
58. Ueda K., Okayama H., Fukushima M., Hayaishi O., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 1
59. Yoshihara K., Hashida T., Yoshihara H., Tanaka Y., Ohgushi H., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **78**, 1281—1288
60. Nishizuka Y., Ueda K., Yoshihara K., Yamamura H., Takeda M., Hayaishi O., (1969), *Cold Spr. Harb. Symp. on Quant Biol.*, **34**, 781—786
61. Kun E., Chang A. C. Y., Sharma M. L., Ferro A. M., Nitecki D., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3131—3135
62. Ord. M. G., Stocken L. A., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 583—592
63. Tanuma S., Emato T., Yamada Y., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 599—605
64. Roberts J. H., Stark P., Giri C. P., Smulson M., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **171**, 305—315
65. Ueda K., Omachi A., Kawaichi M., Hayaishi O., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 205—209
66. Adamietz P., Phillips C., Hilz H., (1976), Proceedings of the 4th Internat. Symp. on „Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins”, red. Hilz H., str. 3, Walter de Gruyter, Berlin
67. Yoshihara K., Tanigawa Y., Burzio L., Koide S. S., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 289—293
68. Müller W. E. G., Zahn R. K., (1976), *Mol. Cell. Biochem.* **12**, 147—158
69. Stone P. R., Lorimer III W. S., Kidwell W. R., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 9—18
70. Hilz H., Bredehorst R., Nolde S., Kittler M., (1972), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **353**, 848—849
71. Stone P. R., Bredehorst R., Kittler M., Lengyel H., Hilz H., (1976), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.*, **357**, 51—56
72. Mandel P., Okazaki H., Niedergang C., (1977), *FEBS Letters*, **84**, 331—336
73. Nishizuka Y., Ueda K., Nakazawa K., Hayaishi O., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3164—3171
74. Futai M., Mizuno D., Sugimura T., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 395—399
75. Chambon P., Weill J. D., Doly J., Strosser M. T., Mandel P., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 638—643
76. Kun E., Zimmer P. H., Chang A. C. Y., Puschendorf B., Grunicke H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1436—1440
77. Roberts J. H., Stark P., Smulson M., (1973), *Biochem. Biophys. Commun.*, **52**, 43—50
78. Ueda K., Reeder R. H., Honjo T., Nishizuka Y., Hayaishi O., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 379—385

79. Yamada M., Miwa M., Sugimura T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 579—586
80. Kristensen T., Holtlund J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 441—446
81. Khan M. G., Mc Claren E., Tsopanakis Ch., Shall S., (1976), *Proceedings of the 4th Internat. Symp. on „Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins”*, red. Hilz H., str. 2, Walter de Gruyter, Berlin
82. Mandel P., Okazaki H., (1976), *Proceedings of the 4th Internat. Symp. on „Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins”*, red. Hilz H., str. 1, Walter de Gruyter, Berlin
83. Shall S., Brightwell M., O'Farel M. K., Stone P. R., Whish W. J. D., (1972), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **353**, 846—847
84. Suhadolnik R. J., Baur R., Roberts J., Stark P., Smulson M., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1419
85. Fujimura S., Hasegawa S., Shimizu Y., Sugimura T., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **145**, 247—259
86. Preiss J., Schlaeger R., Hilz H., (1971), *FEBS Letters*, **19**, 244—246
87. Ueda K., Hayaishi O., (1974), *Fogarty Intern. Center Proceedings*, red. Harris M., t. 26, str. 77—84, DHEW Publication No. (NIH) 74—477
88. Adamietz P., Hilz H., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 1118—1120
89. Kidwell W. R., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 6p—7p
90. Davies M. I., Shall S., Skidmore C. I., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 949—950
91. Gill D. M., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 1—20
92. Miller E. G. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 191—200
93. Miwa M., Sugimura T., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6362—6364
94. Miwa M., Tanaka M., Matsuhima T., Sugimura T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3475—3482
95. Ueda K., Oka J., Nammiya S., Miyakawa N., Hayaishi O., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 516—523
96. Miyakawa N., Ueda K., Hayaishi O., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 239—245.
97. Stone P. R., Whish W. J. D., Shall S., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 334—338
98. Miwa M., Nakatsugawa K., Hara K., Matsuhima T., Sugimura T., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 54—60
99. Tanaka M., Miwa M., Matsuhima T., Sugimura T., Shall S., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 224—229.

LIDIA SADZIŃSKA *)

Struktura i transkrypcja wirusa SV40

The Structure and Transcription of SV40 Virus

Spis treści

- I. Właściwości wirusa SV40
- II. Organizacja genomu SV40
- III. Schemat transkrypcji genomu SV40 podczas cyklu litycznego
- IV. Jądrowe wirusowe RNA
- V. Wczesny wirusowy mRNA
- VI. Późny wirusowy mRNA
- VII. Kontrola transkrypcji genomu SV40
- VIII. Oddziaływanie polimeraz RNA z DNA SV40
- IX. Regiony niekodujące w genomie SV40
- X. Wirusowy kompleks transkrypcyjny

Contents

- I. Properties of SV40 virus
- II. Organisation of the SV40 genome
- III. Scheme of the SV40 genome transcription in lytic cycle
- IV. Nuclear virus-specific RNA
- V. Early virus-specific RNA
- VI. Late virus-specific RNA
- VII. The control of SV40 genome transcription
- VIII. Interaction of RNA polymerases with SV40 DNA
- IX. Noncoding regions of the SV40 genome
- X. Viral transcription complex

*) Mgr, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, ul. Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice

Wykaz stosowanych skrótów: SV40 — wirus małpi 40 (z ang. simian virus 40); ts SV40 — mutant SV40 wrażliwy na podwyższoną temperaturę; antygen T i t — antygeny nowotworowe (z ang. tumor antigen); TSTA — antygen transplantacyjny (z ang. tumor-specific transplantation antigen); VP — białko kapsydu (z ang. virus protein; fragmenty Hind — fragmenty DNA uzyskane po trawieniu genomu SV40 enzymami restrykcyjnymi wyizolowanymi z *Haemophilus influenzae* typ d; Eco RI — *Escherichia coli* RTF I; poli(A) — kwas poliadenylowy; RI — miejsce inicjacji replikacji wirusowego DNA (z ang. initiation of replication).

Wirus SV40 jest od dawna przedmiotem intensywnych badań jako model organizacji i ekspresji genów w komórkach zakażanych wirusami nowotworowymi, których genom zbudowany jest z DNA. Poznanie mechanizmu procesów transkrypcji genomu SV40 i tworzenia informacyjnych wirusowych RNA może być również pomocne w badaniach kontroli ekspresji genów w układach eukariotycznych.

I. Właściwości wirusa SV40

Wirus SV40 należy do grupy wirusów wywołujących nowotwory u zwierząt w warunkach laboratoryjnych. Fizyczne właściwości wirusa SV40 przedstawia Tabela 1.

Tabela 1

Fizyczne właściwości wirusa SV40

wielkość wirionu	45 m μ (1)
symetria	dwudziestościan równoboczny (1)
liczba białkowych podjednostek w kapsydzie	420 (1)
liczba kapsomerów	72 (1)
ciężar cząsteczkowy wirionu	28×10^6 (1)
ciężar cząsteczkowy DNA	$3,6 \times 10^6$ (2,3)
konformacja DNA	a) forma I — zamknięty kołowy dwuniciowy, superspiralny DNA (21S) b) forma II — otwarty kołowy dwuniciowy DNA (16S) (4)
białka rdzenia wirionu	pochoǳą z czterech histonów komórkowych H2A, H2B, H3, H4 (5—7)
białka kapsydu wirionu	VP-1 C. cząst. — 43.000 VP-2 C. cząst. — 39.000 VP-3 C. cząst. — 39.000 (5,8,9)

W nawiasach podano odnośniki do piśmiennictwa.

Wirus SV40 w zależności od rodzaju komórek zakażanych przez wirusa w warunkach hodowli *in vitro* przechodzi 2 rodzaje cyklu życiowego różniącego się ekspresją funkcji wirusowych. Tabela 2 przedstawia systemy komórkowe najczęściej stosowane w badaniach SV40.

Zakażenie komórek wrażliwych (permissyjnych) prowadzi do cyklu litycznego wirusa, który przebiega w dwóch fazach. Faza wczesna trwa do momentu rozpoczęcia replikacji wirusowego DNA tj. 12 do 20 godzin od zakażenia komórki. W tym okresie w komórce stwierdza się obecność trzech wirusowych białek: antygenów T i U w jądrze komórkowym (12, 13) i antygeny transplantacyjnego (TSTA) na powierzchni zakażonej komórki (14). W momencie rozpoczęcia syntezy wirusowego DNA zaczyna

się okres późny cyklu litycznego, który kończy się lizą komórki w 36—90 godzin po zakażeniu. Okres późny charakteryzuje się wzrostem aktywności enzymów biorących udział w replikacji DNA (10) oraz znaczną stymulacją szybkości syntezy komórkowego DNA (15) i histonów (7, 16).

Tabela 2

Wrażliwość komórek różnych gatunków zwierząt na zakażenie wirusem SV40 (10,11)

Gatunek i linia komórkowa	Rodzaj wrażliwości
Małpa (AGMK)	permisyjne
Mysz (3T3)	niepermisyjne
Człowiek (WI—38)	półpermisyjne
Chomik	półpermisyjne
Szczur	nie — lub półpermisyjne
Królik	nie — lub półpermisyjne

Komórki permisyjne są to takie komórki w których po zakażeniu wirusem zachodzi produkcja wirionów, a proces zakażenia kończy się lizą komórki.

Komórki niepermisyjne — brak produkcji wirionów.

Komórki półpermisyjne — tylko w pewnej części komórek zachodzi produkcja wirionów.

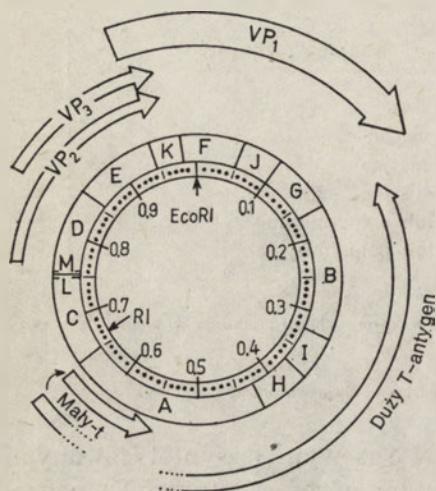
Histony komórki w połączeniu z DNA wirusowym^{*} i zsyntetyzowanymi w późnym okresie białkami strukturalnymi wirusa (antygen V) nagromadzają się na terenie jądra tworząc dojrzałe zakaźne wiriony (17). Wirusowy DNA zorganizowany jest z histonami komórkowymi w zwarty nukleoproteinowy kompleks, który po uwolnieniu histonu H1 tworzy chromatyno-podobną strukturę zwaną minichromosomem zawierającą 21 ± 2 nukleosomów (18—20). Komórki niewrażliwe (niepermisyjne) są poronnie zakażane wirusem SV40. W tego rodzaju zakażeniu dochodzi do ekspresji tylko wczesnych funkcji wirusowych i większość komórek pozostaje żywa. Pewna zmienna część poronnie zakażonych komórek zostaje trwale transformowana i wówczas mamy do czynienia z cyklem transformacyjnym wirusa SV40.

II. Organizacja genomu SV40

Podstawą skonstruowania mapy genomu SV40 była analiza fragmentów powstałych w wyniku trawienia wirusowego DNA enzymami restrykcyjnymi. Enzymy restrykcyjne, w większości wyizolowane z bakterii, rozpoznają specyficzny układ sekwencji DNA na ogół o długości 4—6 par zasad i trawią w tych miejscach obie nici DNA (21—23). Analiza powstałych w wyniku trawienia specyficznych fragmentów DNA, jak również uzyskanych z nich w reakcji transkrypcji *in vitro* komplementarnych RNA, pozwoliła na określenie kolejności 5224 par zasad DNA SV40 oraz

na zlokalizowanie na mapie genetycznej wirusa niektórych jego funkcji biologicznych.

Powszechnie przyjętą jest mapa opracowana na podstawie analizy 13 fragmentów wirusowego DNA, oznaczanych Hind od A do M, powstałych po trawieniu genomu SV40 enzymami restrykcyjnymi Hind II+III wyizolowanymi z *Haemophilus influenzae* typ d (24—26), (Ryc. 1).



Ryc. 1. Mapa genomu SV40 i rozmieszczenie głównych funkcji biologicznych.

Miejsce endonukleolitycznego rozbitcia DNA przez enzym restrykcyjny Eco RI przyjęto jako punkt zerowy na mapie podzielonej na 100 jednostek (pierścień wewnętrzny). Literami od A do M w pierścieniu zewnętrznym oznaczono położenie restrykcyjnych fragmentów Hind II+III.

RI wskazuje początek replikacji wirusowego DNA.

Pozycje pięciu białek kodowanych przez wirus oznaczono blokami zakończonymi strzałkami; linią przerywaną oznaczono regiony, których dokładna pozycja nie jest znana.

Miejsce endonukleolitycznego rozbitcia wirusowego DNA przez enzym Eco RI z *Escherichia coli* RTF I, przyjęto jako punkt zerowy; począwszy od niego genom SV40 umownie podzielono zgodnie z ruchem wskazówek zegara na 100 jednostek (27, 28). Na mapie zaznaczono jako punkt RI w pozycji 0,663 początek dwukierunkowej replikacji wirusowego DNA (20). Połowa genomu wirusa od pozycji 0,67 do 0,17 obejmująca fragmenty Hind C, L, M, D, E, K, F, J, G ulega replikacji i transkrypcji zgodnie z ruchem wskazówek zegara i jest określana jako późny region DNA SV40, a segment replikujący i transkrybowany w stronę przeciwną od 0,67 do 0,17 jednostki — fragmenty A, H, I, B — nazywa się wczesnym regionem genomu.

Lokalizację genów kodujących poszczególne białka wirusowe określono na podstawie danych genetycznych (analiza komplementacyjna mutantów delecyjnych SV40 z zmianami określonych funkcji biologicznych) oraz metodą hybrydyzacji informacyjnych wirusowych RNA z fragmentami DNA SV40, połączonej transkrypcji — translacji poszczególnych fragmentów DNA SV40 w systemie bezkomórkowym i analizą sekwencji nukleotydowych genomu SV40.

Wrażliwe na podwyższoną temperaturę mutanty SV40 zmienione w wczesnej funkcji odpowiadają grupie komplementacyjnej A i zostały zaznaczone na mapie w pozycji od 0,32 do 0,43 jednostki w fragmentach Hind H i I (30, 31). Wczesny region genomu SV40 zwany także genem A

zawiera informację o syntezie dwóch pokrewnych immunologicznie białek; dużego antygenu T o ciężarze cząsteczkowym 90.000—100.000 i małego antygenu t o ciężarze cząsteczkowym 15.000—20.000 (32—34), (Ryc. 1). Część kodująca oba białka zaczyna się w pozycji 0,65 wspólnym kodonem inicjacji. Antygen t kodowany jest przez odcinek DNA SV40 od 0,65 do 0,55 jednostek mapy (35, 36), a sekwencje nukleotydowe kodujące antygen T zawarte są w dwóch oddalonych fragmentach genu A od 0,65 do 0,59 i od 0,54 do 0,18 jednostki mapy (34, 37). Insercja w genie A obejmuje odcinek 346 par zasad od 0,54 do 0,59 jednostki.

Produkt genu A jest białkiem o oddziaływaniu wielokierunkowym (ang. pleiotropic protein). W komórkach permissyjnych funkcjonalny antygen T jest konieczny do replikacji wirusowego DNA i stymulacji funkcji komórkowych (38, 39), w komórkach niepermissyjnych jest niezbędny do inicjacji i utrzymania stanu transformacji komórki (40, 41). Obecnie niewiele jest wiadomo o funkcji biologicznej antygenu t, znana jest jedynie jego rola w transformacji polegająca na zmianie cech wzrostu komórek transformowanych (33, 42). Poza tym informacja genetyczna środkowej i dystalnej części wczesnego regionu wirusowego DNA jest odpowiedzialna za występowanie antygenów TSTA i U oraz za wzrost ludzkich adenowirusów w komórkach małpy (11, 43).

Produkt genu A ma charakter autoregulatora — reguluje swoją syntezę na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego (44—46).

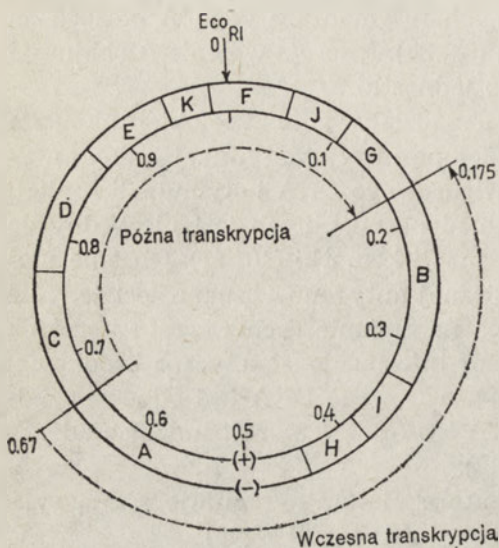
W późnym regionie genomu SV40 znaleziono 3 klasy mutacji delecyjnych (30). Komplementacja między mutantami B i C jest wewnątrzgenowa a gen B/C obejmujący fragmenty K, F, J, G koduje główne białko strukturalne wirusa VP₁ (47), którego ciężar cząsteczkowy, oznaczony elektroforetycznie, wynosi 43.000—48.000. Delecyjne mutanty grupy D produkują zmienione dwa mniejsze białka strukturalne wirusa VP₂ i VP₃ o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 39.000 i 27.000. Mutanty te zlokalizowano w fragmentach E i K (31, 47). Delecje mutantów grupy E mają miejsce w fragmencie Hind D i wywołują zmiany białka VP₂.

Gen kodujący główne białko strukturalne wirusa VP₁ zaczyna się w pozycji 0,941 blisko miejsca połączenia fragmentów E/K, a kończy w pozycji 0,161 w fragmencie G (48, 49), (Ryc. 1). Informacja o syntezie VP₂ zawarta jest w regionie DNA od 0,77 do 0,97 jednostki mapy (35, 48), a sekwencje kodujące VP₃ zaczynają się wewnątrz regionu kodującego VP₂ w fragmencie D i kończą kodonem terminacji wspólnym z VP₂ położonym w początkowej części genu VP₁ (35, 48).

III. Schemat transkrypcji genomu SV40 podczas cyklu litycznego

Transkrypcja genomu SV40 w zakażonych litycznie komórkach permissyjnych odbywa się w dwóch fazach. W wczesnym okresie cyklu litycznego transkrybowane jest 45—50% długości jednej nici DNA określanej

jako nić minus lub E (ang. early). W późnym okresie cyklu litycznego wczesna transkrypcja trwa nadal i towarzyszy jej synteza nowych rodzajów wirusowego RNA będących transkryptami z 50—55% długości drugiej nici DNA SV40 oznaczanej jako nić plus lub L (ang. late), (Ryc. 2), (50—52). Transkrypcji ulega zatem ekwiwalent jednej nici wirusowego DNA.



Ryc. 2. Schemat transkrypcji genomu SV40.

Region późny (fragmenty Hind C, D, E, K, F, J, G nici plus) ulega transkrypcji od pozycji 0,87 do 0,175 w kierunku zgodnym z ruchem wskazówek zegara, natomiast region wczesny (fragmenty A, H, I, B nici minus) ulega transkrypcji w kierunku przeciwnym.

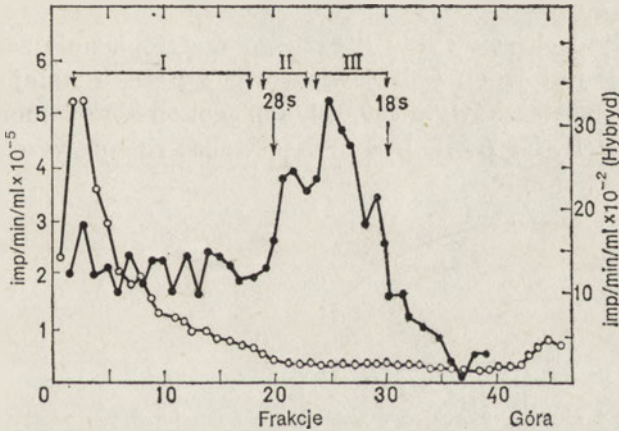
Terminy „wczesna transkrypcja” i „wczesny RNA” są używane na określenie transkrypcji wczesnego regionu genomu SV40 (fragmenty A, H, I, B) i pochodzących z niego transkryptów (powstających również w późnej fazie cyklu litycznego); terminem „późna transkrypcja” i „późne RNA” określamy transkrypcję późnego regionu genomu SV40 tj. fragmentów C, D, E, K, F, J, G i transkrybowanych z nich RNA (Ryc. 2). Schemat powyższy jest jedynie obrazem sytuacji na terenie cytoplazmy w zakażonych komórkach, gdyż uwzględnia on tylko stabilne informacyjne RNA swoiste dla wirusa SV40. W rzeczywistości transkrypcja SV40 jest zjawiskiem o wiele bardziej złożonym — transkrypcji ulegają również niekodujące (antysensowne) regiony genomu SV40 — a w procesach regulacji biorą udział nie tylko elementy kontroli na poziomie transkrypcji, lecz również mechanizmy potranskrypcyjnych przekształceń pierwotnych transkryptów i być może aktywnego transportu dojrzałych wirusowych mRNA.

IV. Jądrowe wirusowe RNA

W wczesnym okresie cyklu litycznego synteza wirusowego RNA stanowi zaledwie 0,01% całkowitej syntezy RNA w komórce (53, 54) co stwarza istotne trudności w badaniach cechującego się szybką syntezą pierwotnego transkryptu. Uważa się, że zawiera on tylko jeden rodzaj

cząsteczek wirusowego RNA, o stałej sedymentacji 19S i ciężarze cząsteczkowym $0,7-0,8 \times 10^6$ odpowiadający transkryptowi z połowy długości jednej nici DNA SV40 (53). Ten szybkoznakujący się RNA wydaje się być identyczny pod względem wielkości i sekwencji nukleotydowych z wczesnym wirusowym RNA izolowanym z cytoplazmy.

W późnym okresie cyklu litycznego około 20% jądrowego wirusowego RNA sedymentuje jako heterogenne cząsteczki od 28S do 60S (55, 56), (Ryc. 3). Wysokocząsteczkowe transkrypty o wielkości $1,9-10 \times 10^6$ daltonów, a więc znacznie przekraczające wielkość genomu SV40, oprócz sekwencji kodowanych przez wirus zawierają sekwencje komórkowego RNA kowalennie związane z RNA wirusowym (57, 58). Ten rodzaj cząsteczek może powstać w wyniku transkrypcji genomu wirusa zawierającego włączone fragmenty DNA komórkowego, bądź też jako ciągły transkrypt z zintegrowanego w cyklu litycznym wirusowego DNA i sąsiednich sekwencji DNA gospodarza (59). Większość wirusowego RNA izolowanego z jąder w późnym okresie cyklu, sedymentuje w gradiencie sacharozy jako cząsteczki dające oddzielne szczyty o stałych sedymentacji 26S, 24S i 19S (55, 56), (Ryc. 3).



Ryc. 3. Profil sedymentacji jądrowego wirusowego RNA (56).

48 godzin po zakażeniu komórek wirusem SV40, RNA znakowano przez okres 20 minut i wirowano w liniowym gradiencie 15–30% sacharozy a następnie poszczególne frakcje hybrydyzowano z DNA SV40.

(O) — całkowita ilość impulsów

(●) — ilość impulsów w hybrydzie RNA—DNA SV40

Strzałkami zaznaczono pozycje markerów 18S i 28S rRNA.

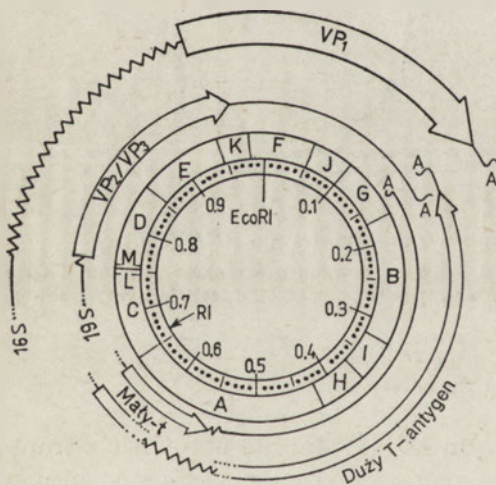
Klasę 26S o ciężarze cząsteczkowym $1,5 \times 10^6$ można porównać z transkryptem z całego genomu SV40. Badając pochodzenie cząsteczek wirusowego RNA w poszczególnych klasach wielkości stwierdzono, że od 5% do 9% RNA każdej klasy jest komplementarne wobec nici minus DNA SV40, a aż 91%—95% hybryduje z nią plus (55, 56). W jądrze komórki zakażonej SV40 w późnym okresie cyklu te dwa rodzaje wirusowych trans-

kryptów występują zatem w różnych stężeniach; transkryptów z nici plus jest 20 razy więcej niż transkryptów z nici minus. Poza tym, cząsteczki jądrowego wirusowego RNA mogą tworzyć stabilne, odporne na działanie rybonukleazy struktury dwuniciowe o długości równej cząsteczce DNA SV40 (56), co pozwala przypuszczać, że w późnym okresie cyklu litycznego cały genom SV40 ulega transkrypcji symetrycznej (60, 61).

Istnieje również ewentualność, że symetrycznie transkrybowana jest tylko część genomu SV40. Hybrydując późny jądrowy RNA z fragmentami Hind II, III obu nici DNA SV40 stwierdzono, że zawiera on sekwencje komplementarne wobec wszystkich fragmentów nici plus i tylko wobec fragmentów A, H, I, B, i C nici minus (52). Nie można jednak wykluczyć, że przyczyną braku hybrydyzacji z pozostałymi fragmentami nici minus była hybrydyzacja RNA—RNA pomiędzy cząsteczkami „anty-późnymi” a występującymi w dużym stężeniu rzeczywistymi późnymi cząsteczkami wirusowego RNA.

V. Wczesny wirusowy mRNA

W wczesnym okresie cyklu litycznego w cytoplazmie zakażonych komórek obecny jest jeden rodzaj wirusowego RNA o stałej sedymentacji 19S i ciężarze cząsteczkowym 900.000 (61). Jest on komplementarny z fragmentami Hind II, III A, H, I, B a więc wobec całego wczesnego regionu



Ryc. 4. Rozmieszczenie wczesnych i późnych wirusowych mRNA na mapie genomu SV40.

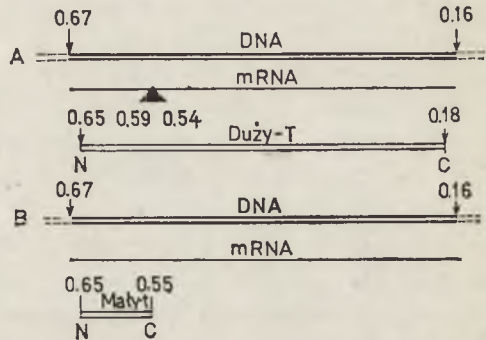
Kodujące regiony mRNA zaznaczone są blokami zakończonymi strzałkami, regiony nie ulegające translacji — liniami ciągłymi. Linie zgięte oznaczają sekwencje nie występujące w wirusowych mRNA, linie przerywane — odcinki, których dokładna pozycja jest nieznana. Sekwencje poli (A) przy końcu 3' zaznaczono liniami falistymi.

nici minus DNA SV40 (52, 63). W późnym okresie cyklu transkrypt z wczesnego regionu genomu SV40 reprezentuje w cytoplazmie 2% wirusowego RNA (56). Wczesny wirusowy mRNA jest poliadenylowany przy

końcu 3' gdzie znajduje się 130—150 reszt kwasu adenyłowego (64), a koniec 5' tego RNA zawiera zmetylowane nukleotydy typu m⁷G(5)ppp(5')N^m, które tworzą charakterystyczną sekwencję „cap”, (65). Koniec 5' wczesnego RNA zaznaczono na mapie genomu SV40 w fragmencie C przy pozycji 0,67 (36, 66, 67), a koniec 3' czytywany jest z nukleotydów fragmentu G przy 0,16 jednostki (36, 37), (Ryc. 4). Wczesny wirusowy mRNA jest transkryptem powstającym z dwóch oddzielnych segmentów wczesnego regionu genomu SV40 — nie zawiera transkryptu 346 par zasad z odcinka 0,54—0,59 (34, 36). W systemie translacji *in vitro* 19S RNA kieruje syntezą antygenów T i t (33). Analizując produkty genu A syntetyzowane przez mutanty SV40 z delecjami w różnych częściach wczesnego regionu DNA stwierdzono, że delecje w segmencie 0,54—0,59 zmieniają strukturę antygeny t nie wywołując zmian w antygenie T, natomiast mutanty SV40 z delecją w dystalnej części wczesnego regionu produkują zmieniony T pozostając bez wpływu na strukturę małego antygeny t (34). Fakty powyższe może tłumaczyć obecność dwóch wczesnych mRNA (34, 36), (Ryc. 5). Informacyjny RNA antygeny T zawiera sekwencje komple-

Ryc. 5. Schemat organizacji i ekspresji sekwencji nukleotydowych kodujących antygeny duży — T (A) i mały — t (B) (34).

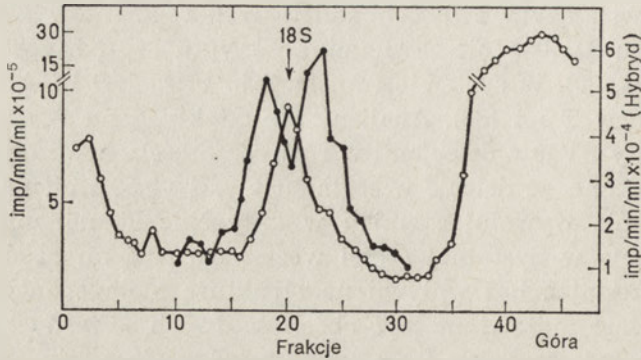
Trójkątem zaznaczono brakujący fragment w mRNA antygeny T. Cyfry są jednostkami mapy fizycznej genomu SV40. Literami oznaczono N i C końce polipeptydów.



mentarne do regionu 0,67—0,59 połączone z transkryptem z regionu 0,54—0,16, natomiast mRNA antygeny t jest transkrybowany z całego wczesnego regionu DNA SV40 od 0,67 do 0,16 jednostki mapy. Jak wynika z wstępnych doniesień, również w mRNA antygeny t brakuje transkryptu z regionu 0,58—0,54 o długości około 50 nukleotydów. Wspólny dla obu białek kodon inicjujący ich syntezę znajduje się w pozycji 0,65 na mapie (Ryc. 5) — w efekcie oba antygeny mają wspólne N-terminalne sekwencje aminokwasowe pochodzące z regionu 0,65—0,59, co tłumaczy ich pokrewieństwo immunologiczne. Antygen t jest kodowany przez 174 nukleotydy zakończone kodonem terminacji w pozycji 0,55; kodon terminacji dla antygeny T znajduje się w pozycji 0,18. Poza regionami kodującymi, wczesny wirusowy mRNA zawiera przy końcach 5' i 3' sekwencje nie ulegające translacji (Ryc. 4), (35—37).

VI. Późny wirusowy mRNA

W cytoplazmie zakażonych komórek, w późnym okresie cyklu litycznego występują 2 klasy cząsteczek wirusowego RNA o stałych sedymentacji 19S i 16S i ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 900.000 i 600.000 (Ryc. 6), (56).



Ryc. 6. Profil sedymentacji późnego wirusowego mRNA (56).

RNA znakowano od 43 do 48 godziny po zakażeniu komórek wirusem, wirowano w liniowym gradiencie 15–30% sacharozy i poszczególne frakcje hybrydyzowano z DNA SV40.

(O) — całkowita ilość impulsów

(●) — ilość impulsów w hybrydzie RNA—DNA SV40

Strzałka oznacza pozycję markera 18S rRNA.

Wirusowy RNA o stałej sedymentacji 16S jest komplementarny wobec fragmentów K, F, J, G nici plus, a więc wobec części późnego regionu (56, 63, 68). Klasa 19S zawiera 2 rodzaje cząsteczek wirusowego RNA. Jeden z nich odpowiada transkryptowi z wczesnego regionu syntetyzowanemu w późnym okresie cyklu, natomiast cząsteczki drugiego rodzaju, występujące w 40–50-krotnym nadmiarze w stosunku do wczesnego, hybrydują z wszystkimi fragmentami Hind C, D, E, K, F, J, G nici plus (52, 56, 63, 68) — a więc reprezentują transkrypty z całego późnego regionu. Oba późne wirusowe RNA są poliadenylowane, a ich końce 5' zawierają struktury „cap” typu m⁷GpppAm i m⁷Gppm⁸Am (69), przy czym wydaje się, że drugi typ występuje głównie w 16S RNA (70). 19S i 16S późne RNA zawierają również zmetylowane nukleotydy wewnątrz cząsteczki (69, 71). Późne transkrypty cytoplazmatyczne zaznaczono na mapie genomu SV40: 19S w rejonie 0,77—0,17 (72, 73) a 16S od 0,95—0,17 (72—75). Oba późne RNA zawierają wspólne sekwencje przy końcu 3' cząsteczek. Hybrydyzacja poliadenylowanych wirusowych RNA z fragmentami późnego regionu SV40 wykazała również obecność w cytoplazmie cząsteczek RNA komplementarnych z fragmentami C, L, M regionu 0,67—0,76 (76), a więc wobec regionu leżącego poza zaznaczonymi na mapie 5' końcami 16S i 19S późnych RNA. Analiza zmetylowanych końców 5' i przylegających do nich sekwencji z 16S i 19S późnych RNA wykazała,

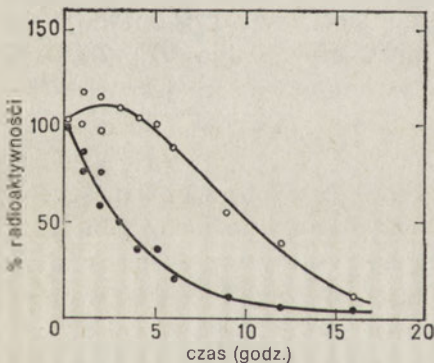
że struktury „cap” i sąsiadujące z nimi odcinki RNA pochodzą z fragmentów 0,72—0,76 (76—78). Sekwencje poprzedzające kodującą część cząsteczki RNA, pochodzące z odcinków DNA oddalonych od genu, noszą nazwę sekwencji liderowych. Są one wspólne w obu późnych RNA, a ich wielkość wynosi 170—200 nukleotydów. Dokładna pozycja końców 5' nie jest znana.

16S późny wirusowy RNA jest wspólnym transkryptem z dwóch oddzielnych segmentów późnego regionu: nie ulegających translacji sekwencji liderowych i głównej części informacyjnego RNA, w której początkowe 40 nukleotydów również nie ulega translacji (71), (Ryc. 4). 16S RNA zawiera informację o syntezie głównego białka strukturalnego — VP₁ (79, 80). Kodon inicjujący VP₁ znajduje się w odległości 15 nukleotydów od połączenia fragmentów Hind E/K (71, 81). Dalej występuje 361 sensownych tripletów zakończonych kodonem terminacji położonym w odległości 80 nukleotydów od połączenia Hind G/B (71, 82, 83). Za kodonem terminacji w 16S RNA znajduje się 80 nukleotydów niekodujących, które kończą się sekwencjami poli A dokładnie w pozycji 0,175 (49). 19S późny RNA jest również transkrybowany z dwóch oddzielnych segmentów późnego regionu DNA SV40; między sekwencjami liderowymi a kodonem inicjującym VP₂ brakuje transkryptu z odcinka DNA o długości około 40 nukleotydów (Ryc. 4), (71, 84, 85). W systemie bezkomórkowej translacji 19S RNA kieruje syntezą białka VP₂ (86) oraz zawiera informację o syntezie VP₃. Część kodująca VP₂ obejmuje 351 kodonów (87, 88), wśród których w fragmencie D w odległości 834 nukleotydów od RI znajduje się także kodon inicjujący syntezę 233 aminokwasów białka VP₃ (35, 36). Informacja o syntezie VP₂ i VP₃ jest czytywana w tej samej fazie i kończy się wspólnym kodonem terminacji znajdującym się w odległości 22 nukleotydów od kodonu inicjującego VP₁. Sekwencje kodujące VP₁ odczytywane są w innej fazie (88). Ten przykład „wewnątrzpenetrujących” genów jest wyrazem maksymalizacji wykorzystania informacji genetycznej w SV40. Nie wiadomo czy VP₂ i VP₃ są syntetyzowane na jednym mRNA, czy też istnieje oddzielny RNA kodujący VP₃, jak 18S RNA w przypadku pokrewnego wirusa Polyoma (89). Interesujący jest również brak ekspresji informacji o syntezie VP₁ przez 19S mRNA. Przyczyną tego może być duża odległość kodonu inicjacji VP₁ od struktury „cap” przy końcu 5', bądź też obecność struktury typu „hairpin”, którą zidentyfikowano w regionie kodonu inicjacji VP₁ (48).

VII. Kontrola transkrypcji genomu SV40

Mechanizmy regulujące proces transkrypcji genomu SV40 są nieznanne, niemniej szereg zjawisk obserwowanych w trakcie transkrypcji świadczy o kontroli tego procesu zarówno na etapie samej transkrypcji jak i po-

transkrypcyjnych przekształceń obejmujących redukcję wielkości i selekcję składu sekwencji cząsteczek wirusowego RNA. Jak już wspomniano, w późnym okresie cyklu litycznego w jądrze komórki zakażonej obserwuje się 20-krotną przewagę ilości późnych transkryptów nad wczesnymi, a w cytoplazmie przewaga ta jeszcze ulega zwiększeniu do 50-krotnej. Główną przyczyną preferencyjnego nagromadzenia się późnych transkryptów jest zwiększona szybkość transkrypcji z nici plus (90); za różnicę zaś stężeń późnych RNA między jądrem a cytoplazmą mogą być odpowiedzialne mechanizmy selektywnego transportu. Zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie komórek zakażonych wirusem SV40 muszą przebiegać procesy degradacji przekształcające duże pierwotne transkrypty w cząsteczki mniejsze, stanowiące właściwe cząsteczki informacyjnego RNA. W jądrze znajdują się transkrypty zawierające sekwencje komplementarne wobec regionów kodujących wirusa połączone z sekwencjami pochodzącymi z regionów antysensownych (sekwencje późne i „antywczesne”), natomiast nie stwierdza się obecności tego rodzaju cząsteczek na terenie cytoplazmy. Jak wynika z badań nad stabilnością metaboliczną poszczególnych klas jądrowego wirusowego RNA, duże transkrypty wirusowe o stałych sedymentacji 26S i 24S mogą być prekursorami bardziej od nich stabilnych cząsteczek klasy 19S (55). Uważa się również, że cząsteczki cytoplazmatycznego wirusowego RNA klasy 16S powstają w wyniku degradacji 19S późnego RNA, lub też pochodzą z wspólnej cząsteczki prekur-



Ryc. 7. Krzywe rozpadu późnych wirusowych mRNA (55)

(○) — 16S RNA
(●) — 19S RNA

sorowej. Kinetyka rozpadu cząsteczek późnego mRNA obu klas wskazuje na istnienie między nimi zależności typu prekursor—produkt (55). W komórkach pozbawionych jąder, a więc w układzie, w którym nie zachodzi synteza RNA *de novo*, okres półtrwania cząsteczek 19S RNA wynosi około 3 godzin, a ich rozpad przebiega zgodnie z kinetyką reakcji pierwszorzędowej (Ryc. 7). Okres półtrwania dla 16S RNA wynosi 6 godzin, a krzywa rozpadu wykazuje początkowy wzrost, który może wynikać z przejściowego powiększenia się puli cząsteczek 16S RNA o cząsteczki pochodzące z degradacji 19S RNA. Cząsteczki klasy 19S występują zarówno na terenie

jądra, jak i cytoplazmy, zaś 16S RNA występuje tylko w cytoplazmie. Poza tym, jak już wspomniano, późne RNA o stałej sedymentacji 16S i 19S mają takie same sekwencje przy końcu 5' (liderowe) i część sekwencji kodujących. Powyższe fakty mogą sugerować, że przekształcenie tych wirusowych RNA przebiega w cytoplazmie, gdzie zachodzić ma połączenie — „splicing” obu typów sekwencji. Jaki jest jednak mechanizm i powód „splicingu”: czy rzeczywiście jest on wynikiem procesów wycięcia i łączenia cząsteczek wirusowego RNA czy też konsekwencją „skakania” polimerazy w trakcie transkrypcji? W każdym razie musi to być proces niezwykle precyzyjny, a zwłaszcza w przypadku wczesnego RNA, gdzie dotyczy regionów kodujących. Na poszczególne fazy kontroli transkrypcji genomu SV40 zapewne mają wpływ takie elementy jak powinowactwo polimerazy do matrycy, specyficzne układy sekwencji DNA SV40 oraz konformacja matrycy.

VIII. Oddziaływanie polimeraz RNA z DNA SV40

Zakażenie komórek wirusem SV40 stymuluje aktywność komórkowych DNA-zależnych polimeraz RNA. Maksymalny wzrost aktywności przypada na okres syntezy późnych wirusowych RNA i dotyczy w głównym stopniu polimerazy II (91). O udziale polimerazy II w procesie transkrypcji genomu SV40 świadczy wrażliwość syntezy późnych wirusowych RNA na α -amanitynę (92). Nie wiadomo jednak czy polimeraza z komórek zakażonych jest identyczna z enzymem komórek normalnych. Niewiele również można powiedzieć na temat specyfiki inicjacji i selekcji nici podczas transkrypcji *in vivo*. Wiadomo, że w warunkach *in vitro* forma I DNA SV40 jest matrycą znacznie bardziej wydajną dla polimeraz zwierzęcych niż DNA kołowy czy otwarty (93). *In vitro* polimeraza II transkrybuje genom SV40 symetrycznie a powstałe produkty są heterogenne, mają jednakże graniczną wielkość 18S—20S, podczas gdy polimeraza I przechodzi własne miejsce inicjacji dając cząsteczki RNA kilkakrotnie większe od matrycy (94, 95). Forma I DNA SV40 posiada około 3 miejsc wiążących polimerazę II. Enzym i cząsteczka DNA w konformacji superhelisy mogą tworzyć stabilny kompleks, co jest niemożliwe w przypadku formy liniowej DNA SV40 (96). Przypuszcza się, że superhelikalna konformacja DNA powoduje tworzenie regionów słabo sparowanych, ułatwiających wiązanie się enzymu z matrycą (93, 96). W większości badań nad specyfiką interakcji enzymu z matrycą używano polimerazę bakteryjną. Enzym z *E. coli* wybiórczo transkrybuje nieć minus DNA SV40 (97). W warunkach obniżonej temperatury wirusowy DNA zawiera preferowane miejsce inicjacji w pozycji 0,17, na granicy fragmentów G/B (98, 99). W warunkach standardowych zidentyfikowano na DNA SV40 aż 9 miejsc wiążących enzym bakteryjny (100). Terminacja transkrypcji wydaje się być niespecyficzną

na — uzyskuje się produkty o wielkości od 4S do 4-krotnie większej od DNA SV40 (101). Można jednak w warunkach obniżonego stężenia substratu otrzymać cząsteczki o wielkości nieprzekraczającej 11S (102). Jako nukleotydy inicjujące syntezę wirusowego RNA przy pomocy polimerazy bakteryjnej, służą ATP i GTP, przy czym włącza się 2 razy więcej ATP niż GTP (103). W cząsteczce SV40 istnieje 5 głównych miejsc inicjacji w których synteza RNA rozpoczyna się przyłączeniem ATP (103); jedno odpowiada uprzednio zidentyfikowanemu preferowanemu miejscu leżącemu w odległości 30 nukleotydów od połączenia G/B. Cztery inne miejsca znajdują się w fragmencie A. Poza tym w fragmentach D, E, F, G zidentyfikowano cztery miejsca w których nukleotydem inicjującym syntezę wirusowego RNA jest GTP (100). Jak wynika z badań wpływu różnych stężeń rifampicyny na wysycanie matrycy przez cząsteczki polimerazy wszystkie te miejsca wiązania charakteryzuje jednakowe powinowactwo do enzymu. Preferowana inicjacja w pozycji 0,17 może być wynikiem bliskiego sąsiedztwa dwóch miejsc wiązania dla ATP i GTP. Charakterystyczne jest położenie miejsc inicjacji na genomie SV40. W większości znajdują się w regionach DNA mogących tworzyć struktury dwupasmowe typu „hairpin” (104). Jednakże nie wiadomo czy i w jakim stopniu te właściwości mogą wpływać na rozpoznanie, wiązanie enzymu i inicjację transkrypcji.

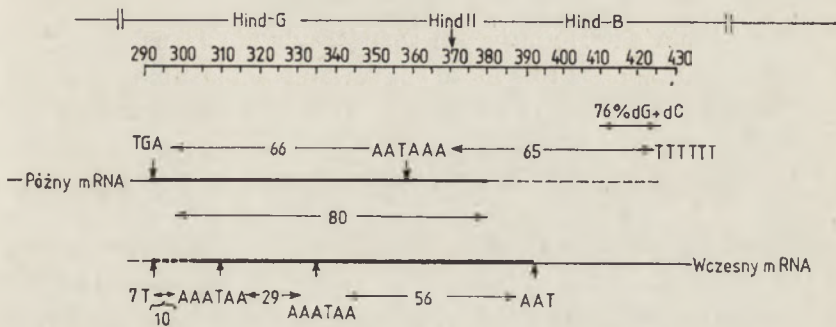
IX. Regiony niekodujące w genomie SV40

DNA SV40 zawiera bloki sekwencji o podwójnej osi symetrii, których układ pozwala na powstawanie struktur typu „hairpin” — takie same struktury mogą powstawać na transkryptach pochodzących z tych regionów. Przyпускаjąc, że tego typu struktury mogą mieć znaczenie w regulacji transkrypcji i potranskrypcyjnych przekształceń wirusowych RNA, analizowano rozmieszczenie charakterystycznych układów sekwencji w genomie SV40. Okazało się, że struktury typu „hairpin” tworzą się w regionach, które można określić jako tzw. „miejsca strategiczne” (105, 106).

Takim interesującym regionem jest segment między genami VP₂ i T. Odcinek ten, o długości 622 nukleotydów, nie koduje żadnego białka, gdyż we wszystkich trzech fazach czytania występują w nim kodony terminacji (107). Fragment ten zawiera informację o replikacji wirusowego DNA oraz prawdopodobnie o inicjacji wczesnej i późnej transkrypcji, o wiązaniu rybosomu i inicjacji translacji, a także, być może, degradacji RNA. Oczywiście te „biologiczne sygnały” mogą zachodzić na siebie lub na część strukturalnych genów. Najbardziej charakterystyczną cechą tego fragmentu jest obecność długiego palindromu zawierającego 17 nukleotydów AT położonych między sekwencjami GC (108). Struktura typu GC-AT-GC jest podobna do układu sekwencji DNA SV40 w miejscu wiązania

polimerazy *E. coli*. Możliwe, że te sekwencje służą również jako „promotor” polimerazie eukariotycznej. Ponadto region ten zawiera układy sekwencji typu „odwróconych powtórzeń” (ang. inverted repeated sequences) — tzw. prawdziwe palindromy, które mogą być sygnałem dla „processing” (106, 108). W cytoplazmie stwierdza także się niewielką ilość RNA pochodzącego z fragmentu 0,64—0,7 (107, 108). Charakterystyczną cechą tego regionu jest wysoka zawartość par AT rozmieszczonych asymetrycznie (tzn. w jednej nici DNA SV40), (35, 36). Wysoką zawartością par AT odznaczają się również insercje w DNA SV40. Insercja w wczesnym regionie zawiera 82% par AT z czego 18 środkowych to wyłącznie AT. Podobnie, odcinki między sekwencjami liderowymi a częścią kodującą w późnych mRNA są bogate w AT (35, 36). Czy ma to jakieś znaczenie w mechanizmie „splicing” — trudno obecnie powiedzieć.

Interesującym regionem niekodującym jest odcinek DNA SV40, w którym zachodzą na siebie końce 3' wczesnych i późnych mRNA (37, 49, 82, 109). Strukturę tego regionu przedstawia Ryc. 8.



Ryc. 8. Schemat struktury regionu DNA SV40 między genami T i VP₁.

Region niekodujący zaczyna się przy 292 nukleotydzie w fragmencie G (kodon terminacji dla VP₁), obejmuje połączenie fragmentów Hind II+III G/B (zaznaczone strzałką) i kończy się przy 394 nukleotydzie w fragmencie B (kodon terminacji dla T). Koniec 3' wczesnego RNA zlokalizowany jest przy nukleotydzie 300, a koniec 3' późnego RNA przy nukleotydzie 380. Zachodzące na siebie odcinki obu mRNA o długości ok. 80 nukleotydów narysowane są grubszą linią. Na obu mRNA zaznaczono strzałkami położenie sekwencji AAUAAA i układu 6 i 7 reszt U.

Za kodonem terminacji UGA w późnym wirusowym RNA znajduje się odcinek zawierający 83 niekodujące nukleotydy (37, 49). Występuje w nim heksanukleotyd AAUAAA oddalony o około 20 nukleotydów od fragmentu 3' poli (A) znajdującego się przy końcu 3'. Nie ulegająca translacji część wczesnego RNA przy końcu 3' to odcinek o długości około 65 nukleotydów zawierający dwukrotne powtórzenie powyższych sekwencji. Heksanukleotyd AAUAAA występuje we wszystkich eukariotycznych mRNA jako układ poprzedzający o około 20 nukleotydów sekwencje poli (A). Nie wydaje się jednak, aby ten heksanukleotyd był wystarczającym sygnałem determinującym położenie poliadenylowanego końca 3' RNA, gdyż wy-

stępuje również w środkowej części wczesnego mRNA. Drugą charakterystyczną cechą tego regionu jest układ 6 i 7 kolejnych reszt U poprzedzonych sekwencjami bogatymi w GC (35, 110). Tego typu układy są charakterystyczne dla miejsc terminacji u organizmów prokariotycznych. Poza tym region końców 3' wirusowych RNA odznacza się wysoką zawartością par AT (75%), (37), co ułatwia tworzenie się jednoniciowych struktur — a więc miejsc wrażliwych na nukleazę S₁ (49). Mimo wysokiego składu AT środkowa część tego regionu tworzy bardzo stabilne struktury typu „hairpin” (48, 97). Układy sekwencji typu „odwróconych powtórzeń” występują również na początku i końcu regionu kodującego VP₃ (105). Struktury te występując przy końcach 3' i 5' wszystkich wirusowych mRNA mogą funkcjonować w procesach degradacji jako sygnały rozpoznawcze dla enzymów „processingu” na pierwotnym transkrypcie lub na 19S mRNA.

X. Wirusowy kompleks transkrypcyjny

W mechanizmie determinującym różną szybkość transkrypcji wczesnych i późnych RNA, dużą rolę może odgrywać topologia matrycy, tzn. czy w czasie procesu transkrypcji wirusowy DNA jest zintegrowany z DNA komórkowym, czy też transkrypcja zachodzi na wolnych cząsteczkach DNA SV40. Jeżeli zachodzi na wolnych cząsteczkach, to z kolei czy występują one w formie superhelisowej czy kołowej, oraz czy matryce na których zachodzi wczesna i późna transkrypcja są jednakowe. Wyniki badań nad zależnością później transkrypcji od replikacji wirusowego DNA mogły sugerować, że późne RNA są transkrybowane z replikujących się cząsteczek DNA SV40. Inhibitory syntezy DNA (arabinozyd cytozyny, fluorodezoksyurydina, aktynomycyna D) dodane w niewielkich stężeniach do kultur bezpośrednio po zakażeniu komórek wirusem SV40, uniemożliwiają początek replikacji DNA SV40 i transkrypcję późnych wirusowych RNA, nie wywierając wpływu na syntezę wczesnego RNA i wczesnych białek (111—113). Fakty te mogły więc implikować, że pojawienie się matrycy dla transkrypcji późnych RNA jest konsekwencją replikacji wirusowego DNA. Również w komórkach zakażonych mutantem tsA30 SV40 ekspresja genu A i inicjacja replikacji wirusowego DNA są niezbędne dla inicjacji późnej transkrypcji; natomiast dla jej kontynuacji (już po zainicjowaniu) ani stała ekspresja genu A ani synteza DNA SV40 nie są już konieczne (114). Jednakże w toku dalszych badań nad zależnością późnej transkrypcji od replikacji wirusowego DNA okazało się, że w komórkach zakażonych SV40 i poddanych działaniu inhibitorów syntezy DNA obserwuje się wprawdzie znaczny spadek transkrypcji późnych RNA, ale zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie występują sekwencje RNA komplementarne wobec późnej nici DNA SV40 (115). Obecność tych póź-

nych wirusowych RNA może być konsekwencją niecałkowitej inhibicji syntezy DNA SV40 lub też inicjacja późnej transkrypcji jest niezależna od replikacji wirusowego DNA. Problem ten pomogły wyjaśnić badania wirusowego kompleksu transkrypcyjnego — VTC (ang. viral transcription complex). VTC zawiera związane z matrycą cząsteczki endogennej polimerazy, która zainicjowała proces transkrypcji *in vivo* i który można kontynuować *in vitro* (116). Kinetyka reakcji w obecności $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jonów Mg^{++} i Mn^{++} oraz wpływ na reakcję transkrypcji α -amanityny potwierdza udział polimerazy II w procesie wczesnej i późnej transkrypcji DNA SV40 (117, 118). Tylko część cząsteczek z całej puli DNA służy jako matryca do transkrypcji; VTC ma stałą sedymentacji 26S (117—120), podczas gdy przeważająca część wirusowego DNA znajduje się w rejonie 21S. Rozpuszczalny w sarkosylu kompleks syntetyzuje 70—90% wirusowego RNA co wskazuje, że matrycą jest wolny DNA SV40 a nie genom wirusa zintegrowany z komórkowym DNA (118, 120). RNA zsyntetyzowany przez późny VTC jest heterogenny, o stałej sedymentacji od 4 do 25S, z główną frakcją cząsteczek 20S (118, 120). Część RNA (około 10%) po usunięciu białka tworzy z matrycą stabilne struktury odporne na działanie rybonukleazy. Są to końce 3' RNA długości 35—200 nukleotydów, połączone wiązaniami wodorowymi z matrycą. Ten stabilny hybryd DNA—RNA wirowany w obecności bromku etydyny zachowuje się jak dwuniciowa, kowalentnie zamknięta cząsteczka z ujemnymi skrętami superhelisy (121), co wskazuje, że forma I DNA SV40 służy jako matryca do transkrypcji w późnej fazie cyklu litycznego. Od 3—7% wirusowego RNA zsyntetyzowanego *in vitro* przez późny VTC jest komplementarne wobec nici minus DNA SV40, a 93—97% do nici plus (117), co jest zgodne z obserwacjami *in vivo*. Wśród produktów transkrypcji, oprócz sekwencji komplementarnych wobec wczesnych i późnych regionów DNA SV40, znajdują się również „antywcześnie” i „antypóźne RNA” (122, 123). Transkrypcja regionów niekodujących może być wyrazem symetrycznej transkrypcji genomu SV40, nie można jednak wykluczyć usuwania przez sarkosyl czynników niezbędnych dla terminacji transkrypcji.

Nieoczekiwane natomiast okazały się wyniki analizy produktów transkrypcji wczesnego VTC (123). Wirusowe RNA zsyntetyzowane przez kompleksy transkrypcyjne pochodzące z zakażonych komórek, w których replikacja wirusowego DNA była zahamowana (komórki w wczesnej fazie cyklu litycznego oraz komórki zakażane mutantem ts A58 w temperaturze niepermissyjnej) zawierały mianowicie 10—20% późnego RNA, przy czym były to sekwencje komplementarne zarówno wobec regionu kodującego jak i „antywcześnie”.

Obecność transkryptów z nici plus w wczesnym VTC potwierdza inicjację późnej transkrypcji niezależnie od replikacji DNA; wirusowa transkrypcja jest inicjowana na nici plus i minus przed rozpoczęciem syntezy

DNA SV40. Można zatem przypuszczać, że istotne różnice między wczesnymi a późnymi kompleksami transkrypcyjnymi są raczej ilościowe, a nie jakościowe; RNA transkrybowane przez wczesne VTC pochodzą głównie (90%) z nici minus, podczas gdy późne VTC wydają się syntetyzować przede wszystkim RNA komplementarne wobec nici plus. Sugeruje się, że za tego typu różnice może odpowiadać funkcjonalny antygen T, który reguluje poziom syntezy wczesnego RNA (123). Przeniesienie komórek zakażonych mutantem ts A58 do temperatury niepermissyjnej wywołuje ogólny wzrost poziomu transkrypcji przez VTC, przy czym znacznie wyższy jest wzrost transkrypcji z nici minus (3-krotnie zwiększa się stosunek transkrypcji minus do plus w porównaniu z temperaturą permissyjną), (122). Zakażenie komórek mutantami SV40 z defektem syntezy funkcjonalnego antygeny T wywołuje zwiększenie symetrycznej transkrypcji przez VTC (124).

Biorąc pod uwagę powyższe dane można zaproponować następujący model „przejęcia” z wczesnej do późnej transkrypcji (123). W nieobecności funkcjonalnego antygeny T inicjacja wczesnej transkrypcji jest bardziej wydajna niż późnej. Z ograniczonej liczby matryc DNA SV40 we wczesnym okresie cyklu litycznego transkrybowana jest mała liczba cząsteczek RNA SV40, z czego większość to wczesny RNA. Po rozpoczęciu syntezy antygeny T następuje inicjacja replikacji wirusowego DNA i ograniczenie wczesnej transkrypcji, natomiast wzrasta wydajność transkrypcji późnej. Część zsyntetyzowanych cząsteczek DNA może wchodzić do puli transkrypcyjnej zwiększając liczbę matryc, na których zachodzi transkrypcja głównie późnego RNA. Nie wiadomo jednak czy inicjacja replikacji wirusowego DNA jak również obecność funkcjonalnego antygeny T są konieczne dla dominacji (a nie inicjacji) późnej transkrypcji. Czy te same cząsteczki wirusowego DNA służą jako matryca jednocześnie do transkrypcji wczesnych i późnych RNA? Wydaje się interesującą wstępną identyfikacją dwóch rodzajów wczesnego kompleksu transkrypcyjnego (123). Kompleks lżejszy, o stałej sedymentacji 16—25S syntetyzuje RNA komplementarny wobec obu nici wirusowego DNA (podobnie jak późny VTC), podczas gdy kompleks cięższy o stałej sedymentacji powyżej 45S, syntetyzuje najprawdopodobniej tylko wczesny RNA. Aktywność transkrypcyjna związana z kompleksem 45S może reprezentować transkrypcję z innej matrycy, różniącej się konfiguracją DNA lub też zaasocjowanymi z nim białkami. Nie należy zapominać, że DNA SV40 występuje *in vivo* w postaci nukleoproteinowego kompleksu. Jak stwierdzono, kompleks taki w czasie reakcji transkrypcji *in vitro* pozostaje zaasocjowany z białkami zarówno gdy służy polimerazie RNA z *E. coli* jako matryca (125), jak i polimerazie endogennej (126—128). Co więcej, endogenna polimeraza w optymalnych warunkach może syntetyzować na nukleoproteinowym kompleksie niewielką część cząsteczek wirusowego RNA o długości odpo-

wiadającej transkryptowi z całego genomu SV40, które pozostają związane z minichromosomem SV40. Chromatyna SV40 jest jednak matrycą o wiele mniej wydajną niż DNA SV40. Najprawdopodobniej nukleosomy ograniczają szybkość transkrypcji w warunkach *in vitro* (128). Stymulujący wpływ na przebieg reakcji transkrypcji *in vitro* wywiera siarczan amonu, przy czym wydaje się, że efekt ten jest wywołany raczej zmianami konformacyjnymi w strukturze chromatyny niż dysocjacją białek (127). Najprawdopodobniej proces transkrypcji minichromosomu SV40 *in vivo* wymaga również ciągłej modyfikacji nukleosomów.

Zaakceptowano do druku 23.9.1978

PISMIENICTWO

1. Anderer F. A., Schlumberger H. D., Koch M. A., Frank H., Eggers H. J., (1967), *Virology*, **32**, 511—523.
2. Crawford L. V., Black P. H., (1964), *Virology*, **24**, 388—392.
3. Tai H. T., Smith C. A., Sharp P. A., Vinograd J., (1972), *J. Virol.*, **9**, 317—325.
4. Mayer F., Mazaitis A. J., Puhler A., (1975), *J. Virol.*, **15**, 585—598.
5. Lake R. S., Barban S., Salzman N. P., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 640—647.
6. Pett D., Estes M. K., Pagano J. S., (1975), *J. Virol.*, **15**, 379—385.
7. Tan K. B., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2805—2810.
8. Estes M. K., Huang E. S., Pagano J. S., (1971), *J. Virol.*, **7**, 635—641.
9. Tan K. B., Howe C. C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **478**, 99—108.
10. The Molecular Biology of Tumour Viruses (1973) red. J. Tooze, str. 356, Cold Spring Harbor Laboratory.
11. Levine A. J., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **458**, 213—241.
12. Black P. H., Rowe W. P., Turner H. C., Huebner R. J., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **50**, 1148—1156.
13. Lewis A. M., Rowe W. P., (1971), *J. Virol.*, **7**, 189—197.
14. Girardi A. J., Defendi V., (1970), *Virology*, **42**, 688—698.
15. Hatanaka M., Dulbecco R., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 736—740.
16. Winocour E., Robbins E., (1970), *Virology*, **40**, 307—312.
17. Howe C. C., Tan K. B., (1977), *Virology*, **78**, 45—56.
18. Bellard M., Oudet P. O., Germond J. E., Chambon P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 543—553.
19. Varshavsky A. J., Nedospasov S. A., Schmatchenko V. V., Bakayer V. V., Chumackov P. M., Georgiew G. P., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3303—3325.
20. Ponder B. A. J., Crawford L. V., (1977), *Cell*, **11**, 35—49.
21. Smith H. O., Nathans D., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 419—423.
22. Dugaiczuk A., Hedgepeth J., Boyer H. W., Goodman H. M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 503—512.
23. Old R., Murray K., Roizes G., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 331—332.
24. Danna K. J., Nathans D., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2913—2917.
25. Danna K. J., Sack G., Nathans D., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 363—376.
26. Yang R., Danna K., Van de Voorde A., Fiers W., (1975), *Virology*, **68**, 260—265.

27. Mulder C., Delius H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3215—3219.
28. Morrow J. F., Berg P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3365—3369.
29. Danna K. J., Nathans D., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3097—3100.
30. Lai C. J., Nathans D., (1974), *Virology*, **60**, 466—475.
31. Lai C. J., Nathans D., (1975), *Virology*, **66**, 70—81.
32. Rundell K., Collins J. K., Tegtmeyer P., Oour H. L., Lai C. J., Nathans D., (1977), *J. Virol.*, **21**, 636—646.
33. Prives C., Gilboa E., Revel M., Wincour E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 457—461.
34. Crawford L. V., Cole C. N., Smith A. E., Pancha E., Tegtmeyer P., Rundell K., Berg P., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 117—121.
35. Reddy V. B., Thimmappaya B., Dhar R., Subramanian K. N., Zain B. S., Pan J., Ghosh P. K., Celma M. L., Weissman S. M., (1978), *Science*, **200**, 494—502.
36. Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R., Van de Voorde A., Van Heuverswyn H., Van Herreweghe J., Volckaert G., Ysebaert M., (1978), *Nature*, **273**, 113—120.
37. Van Heuverswyn H., Van de Voorde A., Fiers W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 335—344.
38. Tegtmeyer P., (1972), *J. Virol.*, **10**, 591—598.
39. Chou J. Y., Martin R. G., (1974), *J. Virol.*, **13**, 1101—1109.
40. Martin R. C., Chou J. Y., (1975), *J. Virol.*, **15**, 599—612.
41. Kimura G., Itagaki A., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 673—677.
42. Cole C., Landers T., Goff S., Manteuil-Brutlag S., Berg P., (1977), *J. Virol.*, **24**, 277—294.
43. Lebowitz P., Kelly T. J., Nathans D., Lee T. N. H., Lewis A. M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 441—445.
44. Tegtmeyer P., Schwartz M., Collins J. K., Rundell K. J., (1975), *J. Virol.*, **16**, 168—178.
45. Reed S. I., Stark G. R., Alwine J. C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3083—3087.
46. Alwine J. C., Reed S. J., Stark G. R., (1977), *J. Virol.*, **24**, 22—27.
47. Lai C. J., Nathans D., (1976), *Virology*, **75**, 335—345.
48. Contreras R., Rogiers R., Van de Voorde A., Fiers W., (1977), *Cell*, **12**, 529—538.
49. Van Heuverswyn H., Van de Voorde A., Fiers W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 325—334.
50. Aloni Y., Winocour E., Sachs L., (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 415—429.
51. Lindstrom D. M., Dulbecco R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1517—1529.
52. Khoury G., Howley P., Nathans D., Martin M., (1975), *J. Virol.*, **15**, 433—437.
53. Tonegawa S., Walter G., Bernardini A., Dulbecco R., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 823—831.
54. Acheson N. H., (1976), *Cell*, **8**, 1—12.
55. Aloni Y., Shani M., Reuveni Y., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2587—2591.
56. Laub O., Aloni Y., (1975), *J. Virol.*, **16**, 1171—1183.
57. Jaenisch R., (1972), *Nature New Biol.*, **235**, 46—47.
58. Rosenblatt S., Winocour E., (1972), *Virology*, **50**, 558—566.
59. Hirai K., Defendi V., (1972), *J. Virol.*, **9**, 705—707.
60. Aloni Y., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2404—2409.
61. Aloni Y., (1973), *Nature New Biol.*, **243**, 2—6.

62. Weinberg R. A., Ben-Ishai Z., Newbold J. E., (1974), *J. Virol.*, **13**, 1263—1273.
63. Khoury G., Carter B. J., Ferdinand F. J., Howley P. M., Brown M., Martin M. A., (1976), *J. Virol.*, **17**, 832—840.
64. Weinberg R. A., Ben Ishai Z., Newbold J. E., (1972), *Nature New Biol.*, **238**, 111—113.
65. Lavi S., Shatkin A., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2012—2016.
66. Dhar R., Subramanian N., Pan J., Weissman S. M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 368—376.
67. Reed S. I., Alwine J. C., (1977), *Cell*, **11**, 523—531.
68. May E., Kopecka H., May P., (1975), *Nucleic Acids Res.* **2**, 1995—2005.
69. Aloni Y., (1975), *FEBS Letters*, **54**, 363—367.
70. Groner Y., Carmi P., Aloni Y., (1977), *Nucleic Acids Res.* **4**, 3959—3969.
71. Haegman G., Fiers W., (1978), *Nature*, **273**, 70—73.
72. May E. M., Maizel J. V., Salzman N. P., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 496—500.
73. Hsu M. T., Ford J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4982—4985.
74. Dhar R., Zain B. S., Subramanian K. N., Weissman S. M., Pan J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 371—375.
75. Dhar R., Subramanian K., Zain B. S., Pan J., Weissman S., (1974), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **39**, 153—160.
76. Aloni Y., Dhar R., Laub O., Horowitz M., Khoury G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3686—3690.
77. Lavi S., Groner Y., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5323—5327.
78. Celma M. L., Dhar R., Pan J., Weissman S. M., (1977), *Nucleic Acids Res.* **4**, 2549—2561.
79. Prives C. L., Aviv H., Paterson B. M., Roberts B. E., Rozenblatt S., Reveland M., Winocour E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 302—306.
80. Rozenblatt S., Mulligan R. C., Gorecki M., Roberts B. E., Rich A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2747—2751.
81. Pan J., Reddy V. B., Thimmappaya B., Weissman S. M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 2539—2548.
82. Thimmappaya B., Zain B., Dhar R., Weissman S. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1613—1618.
83. Contreras R., Van de Voorde A., Fiers W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 317—324.
84. Ahmadzadeh C., Allet B., Greenblatt J., Weil R., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1097—1101.
85. Dhar R., Reddy V. B., Weissman S. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 612—620.
86. Prives C. L., Aviv H., Gilboa E., Revel M., Winocour E., (1974), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **39**, 309—316.
87. Contreras R., Volckaert G., Thys F., Van de Voorde A., Fiers W., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1001—1014.
88. Reddy B., Dhar R., Weissman S. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 621—630.
89. Lai C. J., Nathans D., (1976), *Virology*, **75**, 335—345.
90. Gilboa E., Aviv H., (1976), *Cell*, **7**, 567—573.
91. Righthand V. F., Bagshaw J. C., (1974), *Intervirology*, **4**, 162—170.
92. Jackson A. H., Sugden B., (1972), *J. Virol.*, **10**, 1086—1089.
93. Mandel J. Z., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 367—378.
94. Mandel J. L., Keding C., Gissinger F., Chambon P., Fried A. H., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 109—112.

95. Mandel J. L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 379—395.
96. Hossenlopp P., Oudet P., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 397—411.
97. Westphal H., (1970), *J. Mol. Biol.*, **50**, 407—420.
98. Zain B. S., Dhar R., Weissman S. M., Lebowitz P., Lewis A. M., (1973), *J. Virol.*, **11**, 682—690.
99. Zain B. S., Weissman S. M., Dhar R., Pan J., (1974), *Nucleic Acids Res.*, **1**, 577—594.
100. Hale P., Lebowitz J., (1978), *J. Virol.*, **25**, 298—304.
101. Delius H., Westphal H., Axelrod N., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 677—687.
102. Lebowitz P., Bloodgood R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **94**, 183—201.
103. Lebowitz P., Stern R., Ghosh P. K., Weissman S. M., (1977), *J. Virol.*, **22**, 430—445.
104. Dhar R., Weissman S. M., Zain B. S., Pan J., Lewis A. M., (1974), *Nucleic Acids Res.*, **1**, 595—613.
105. Shen C. K. J., Hearst J. E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1363—1367.
106. Hsu M. T., Jelinek W. R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 1631—1634.
107. Dhar R., Subramanian K. N., Pan J., Weissman S. M., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 827—831.
108. Subramanian K. N., Dhar R., Weissman M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 355—367.
109. Zain B. S., Thimmappaya B., Dhar R., Weissman S. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1606—1612.
110. Van de Voorde A., Contreras R., Rogiers R., Fiers W., (1976), *Cell*, **9**, 117—120.
111. Butel J. S., Rapp F., (1965), *Virology*, **24**, 490—495.
112. Gilden R. V., Carp R. J., Taguchi F., Defendi V., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 684—692.
113. Sauer G., (1971), *Nature New Biol.*, **231**, 135—138.
114. Cowan K., Tegtmeyer P., Anthony D. D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1927—1930.
115. Rosenthal L. J., Brown M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 551—567.
116. Green M. H., Brooks T. L., (1976), *Virology*, **72**, 110—120.
117. Laub O., Aloni Y., (1976), *Virology*, **75**, 346—355.
118. Gariglio P., Mousset S., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 583—591.
119. Gariglio P., Mousset S., (1975), *FEBS Letters*, **56**, 149—155.
120. Shani M., Birkenmeier E., May E., Salzman N. P., (1977), *J. Virol.*, **23**, 20—29.
121. Birkenmeier E., Radonowich M., Shani M., Salzman N. P., (1977), *Cell*, **11**, 495—505.
122. Birkenmeier E., May E., Salzman N. P., (1977), *J. Virol.*, **22**, 702—711.
123. Ferdinand F., Brown M., Khoury G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5443—5447.
124. Kuff E. L., Ferdinand F. J., Khoury G., (1978), *J. Virol.*, **25**, 28—37.
125. Hall M. R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 698—705.
126. Brooks T. L., Green M. H., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4261—4279.
127. Green M. H., Brooks T. L., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4279—4291.
128. Cremisi C., Chestier A., Dauquet C., Yaniv M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 74—82.

RYSZARD FARBISZEWSKI *), HALINA GABRYEL **)

Rola argininy w regulacji metabolizmu komórkowego

Role of Arginine in Regulation of Cellular Metabolism

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wpływ argininy na wzrost wirusów, komórek prawidłowych i nowotworowych
- III. Wpływ argininy na aktywność niektórych enzymów
- IV. Rola argininy w regulacji wydzielania niektórych hormonów
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Effects of arginine on growth of viruses, normal and neoplastic mammalian cells
- III. Effects of arginine on activity of some enzymes
- IV. Role of arginine in regulation of hormone secretion
- V. Concluding remarks

I. Wstęp

W licznych badaniach stwierdzono zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wyraźny wpływ niektórych aminokwasów na metabolizm komórek prokariotycznych i eukariotycznych. W hodowli komórek zwierzęcych nawet niewielkie zmiany składu środowiska, np. obniżenie stężenia jednego niezbędnego aminokwasu, powodują daleko posunięte i różnorodne konsekwencje metaboliczne. Można przypuszczać, że powstają one w wyniku zmian wewnątrzkomórkowej puli aminokwasów, która z kolei wywiera wpływ na intensywność w komórce syntezy białek, RNA i DNA (1). Sądzi się, że zapotrzebowanie komórek na określone aminokwasy może wynikać niejednokrotnie z upośledzenia biosyntezy danego aminokwasu.

Jednym z ważniejszych aminokwasów, z uwagi na udział w cyklu

*) Doc. dr hab., **) mgr chem., Zakład Chemii Nieorganicznej, Instytut Chemii i Biofizyki, Akademia Medyczna, Mickiewicza 2, 15-230 Białystok

mocznikowym i rolę we wzroście komórek jest arginina, której działanie uzależnione jest od warunków doświadczalnych, a także od rodzaju i typu komórek. Arginina jest niezbędna w diecie młodego, szybko rosnącego zwierzęcia, gdyż ilość syntetyzowanego aminokwasu *in vivo* jest niewystarczająca do zapewnienia normalnego jego rozwoju. Przy braku argininy obserwuje się zmniejszenie tempa wzrostu organizmu.

Przeżywalność *in vitro* niektórych komórek zwierzęcych, ich wzrost i mnożenie wyraźnie zależy od obecności argininy w środowisku hodowlanym. Dotyczy to zwłaszcza komórek HeLa, komórek chłoniakomięsaka myszy L5178 i L1210 oraz komórek chłoniaka Burkitta (2—4).

W niniejszym artykule omówiony został wpływ argininy na wzrost wirusów oraz na funkcje komórek, zwłaszcza komórek nowotworowych; ponadto przedstawiono dane dotyczące roli argininy w regulacji aktywności niektórych enzymów cyklu mocznikowego oraz jej wpływu na wydzielanie pewnych hormonów.

II. Wpływ argininy na wzrost niektórych wirusów oraz na wzrost komórek prawidłowych i nowotworowych ssaków.

Stwierdzono, że wzrost niektórych wirusów w komórkach zależy od właściwego stężenia argininy. I tak, w nieobecności argininy w środowisku hodowlanym wzrost wirusa krowianki (*Vaccinia virus*) w komórkach linii KB jest całkowicie zahamowany. Ilość zsyntetyzowanego wirusowego DNA wynosi jednak aż 70% ilości wirusowego DNA syntetyzowanego w obecności argininy (5). Sugeruje to, że arginina jest niezbędna w późniejszych etapach cyklu wzrostu wirusa. Przy braku argininy w środowisku hodowlanym komórek linii KB stwierdza się tylko syntezę wczesnego mRNA. Wydaje się, że w przypadku wzrostu wirusa krowianki w komórkach KB etapem wymagającym argininy jest proces syntezy późnego mRNA. Można zatem wnioskować, że w komórkach KB poziom argininy (obok innych czynników) reguluje syntezę wirusowego mRNA.

Opisany wpływ argininy na wzrost wirusa krowianki ogranicza się do komórek KB. Stwierdzono bowiem, że w hodowli komórek linii HeLa zainfekowanych tym samym wirusem w nieobecności argininy następuje zahamowanie syntezy wirusowego DNA (cyt. za 5).

Wzrost onkogennych adenowirusów typu SA7 w ludzkich komórkach embrionalnych nerki i komórkach małych linii HDC-17 zależy również od stężenia argininy w środowisku hodowlanym (6). Wyciągi z komórek zainfekowanych tym wirusem w nieobecności argininy wykazywały mniejszy poziom adenowirusów niż wyciągi z komórek zainfekowanych w środowisku hodowlanym bogatym w argininę. Nie zaobserwowano jed-

nak w środowisku hodowlanym w takich warunkach defektywnych form adenowirusów.

Adenowirusy typu 12 wymagają prawidłowego stężenia argininy w środowisku hodowlanym do biosyntezy swoistych białek wirusowych, spełniających głównie funkcje antygenów, w komórkach linii KB (7). Stwierdzono, że w adenowirusach typu 2 występują białka bogate w argininę, jeśli środowisko hodowlane komórek linii KB zawiera nadmiar argininy (8). Zakażenie komórek zarodków myszy wirusami polyoma i wakuolizującym wirusem małpim SV 40, wymaga również argininy. Przy braku argininy w środowisku dochodzi do zahamowania biosyntezy wirusowych białek bogatych w argininę (9).

Wzrost wirusów opryszczki (*Herpes simplex*) w fibroblastach zarodków kurczęcia i w małpich komórkach nerek zależy również od stężenia argininy. Aminokwas ten jest konieczny do inicjacji biosyntezy specyficznych białek wirusowych, spełniających funkcje antygenów (10).

W komórkach zwierzęcych hodowanych w warunkach niedoboru chociażby jednego z niezbędnych aminokwasów pojawiają się bardzo często zmiany degeneracyjne (11—13). W komórkach wyhodowanych z jajnika chomika chińskiego na przykład przy niedoborze w środowisku argininy, pojawiają się liczne aberacje chromosomalne, których ilość zwiększa się w miarę wydłużania okresu niedoboru tego aminokwasu (12). Również w ludzkich leukocytach hodowanych w środowisku pozbawionym argininy przez okres 3 dni stwierdzono pęknięcia chromosomów oraz dwukrotnie zmniejszony indeks mitotyczny. Dodanie argininy do środowiska zapobiega tym zmianom (14). Jąderka mioblastów i fibroblastów zarodków kurczęcia hodowane w środowisku pozbawionym argininy przybierają postać, określaną jako jąderkowe naszyjniki (15). Twory te powstające w wyniku zwolnienia tempa biosyntezy białek jąderkowych zawierają białka, RNA i ślady DNA. Dodanie argininy do środowiska hodowlanego tych komórek przywraca jąderkom ich prawidłową formę (15).

W ostatnich latach stwierdzono, że podczas cyklu podziałowego komórek HeLa S—3, a także i innych komórek ssaków, zachodzą zmiany w powierzchniowych składnikach błon. W fazie S, G₂ i M wzrasta znacznie ilość reszt arginyłowych w glikoproteidach umiejscowionych na powierzchni komórek (16). Wiąże się to z pojawianiem się białka bogatego w argininę o znacznej liczbie grup guanidynowych, co zwiększa ilość dodatnich ładunków na powierzchni komórek podczas ich podziału. Zablockowanie reszt arginyłowych glikoproteidów fenyloglioksałem — odczynnikiem reagującym specyficznie z grupami guanidynowymi argininy — przyczynia się do zahamowania podziałów komórkowych (17). Zatem można sądzić, że reszty arginyłowe glikoproteidów na powierzchni komórek HeLa S—3 są niezbędne do prawidłowego ich wzrostu. Badania wykazały, że w obecności fenyloglioksału komórki HeLa, będące w fazie

G₁ przechodziły z prawidłową szybkością w fazę S, jednakże synteza DNA była w tych warunkach zahamowana i komórki nie dzieliły się. Natomiast enzymatyczne jodowanie laktoperoksydazą tyrozyny, zawartej w białkach na powierzchni komórek, nie hamowało wzrostu komórek (18). Dlatego też Stein i Berestecky uważają, że hamujące wzrost komórek HeLa działanie fenylogliksalu powoduje „maskowanie” reszt arginylowych w glikoproteidach błon komórkowych, co z kolei hamuje syntezę DNA (16).

Poglądy na temat wpływu argininy na wzrost komórek nowotworowych nie są jednolite. Wykazywano wprawdzie w badaniach *in vivo* i *in vitro* zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych przy braku argininy. Stwierdzono jednak również przeciwstawne działanie tego aminokwasu na komórki zwierzęce *in vivo*. U zwierząt żywionych dietą wzbogacaną w argininę (dieta zawierała 5% l-argininy i 15% kazeiny mleka) dochodziło do hamowania wzrostu guzów gruczołu piersiowego szczura wywoływanych przez 7,12-dwumetylobenzantracen (DMBA) (19). Ponadto obserwowano zmniejszenie szybkości indukcji guzów i ich liczby, a badania histologiczne wykazały znacznie mniejszą ich złośliwość. Usunięcie argininy z diety przyspieszało u 80% badanych zwierząt indukcję guzów, wzbudzanych przez DMBA. Podobne działanie l-argininy na wzrost szpiczaka u myszy zaobserwowali inni autorzy (20). Hamujący wpływ argininy na wzrost guzów zaobserwowano także w przypadku kilku innych doświadczalnych nowotworów, jak mięsaka Emge u szczurów (21), włókniakomięsaka UCLA, mięsaka Jensena (22) i mięsakoraka Walkera u szczurów (23) oraz mięsaka 180 u myszy (24).

Wyniki badań większości autorów wskazują jednak, że arginina jest niezbędna do wzrostu komórek nowotworowych tak *in vivo* jak i *in vitro*. Badania *in vitro* komórek chłoniakomięsaka myszy L1210 i L5178Y wykazały, że inkubacja ich z arginazą lub ekstraktem wątrobowym o aktywności arginazowej, powodowała całkowite ich zniszczenie w ciągu 24 godzin (3). Proces rozpadu komórek można było zahamować przez dodanie do środowiska hodowlanego argininy, a także częściowo przez dodanie prekursorów argininy takich jak kwas arginino-bursztynowy, cytrulina i ornityna. Krytyczne stężenie argininy w środowisku wynosiło 8 μ M; poniżej tego stężenia następowała szybka i dość znaczna destrukcja komórek guza. Obecność argininy była konieczna nawet wówczas w środowisku hodowlanym populacji komórek chłoniakomięsaka, gdy były one w stanie stacjonarnym. Pomimo, że prekursorzy argininy mogły w pewnym stopniu zapobiegać stanom destrukcyjnym, to jednak komórki te bardzo szybko ginęły. Badania włączania znakowanej ³H-tymidyny i ³H-urydyny do DNA komórek chłoniakomięsaka wykazały, że przy niedoborze argininy w środowisku inkorporacja znakowanych nukleozydów w makrocząsteczki jest nieznaczna (3).

Arginaza hamuje także *in vivo* wzrost nowotworów Walkera 256. Jednorazowe podanie arginazy powodowało dość wyraźne zahamowanie wzrostu guza u szczurów (25). Prawidłowe komórki zwierzęce są prawdopodobnie mniej czułe na niedobór argininy niż komórki nowotworów. Powyższą sugestię potwierdzają dane doświadczalne, w których wykazano, że pomimo tego, iż poziom argininy we krwi myszy obniżał się na skutek ich zainfekowania pierwotniakami z rodzaju *Schistosoma* prawie do zera, to jednak myszy przeżywały okres wielu tygodni (26).

Wykazano również, że niedobór argininy w medium hamuje transformację limfocytów, wzbudzaną przez fitohemaglutyninę lub inne związki karcinogenne (27). Z badań nad wpływem argininy na aktywność proliferacyjną komórek chłoniaka Burkitta wynikało, że przy niedoborze argininy w środowisku dochodziło do zahamowania wzrostu tych komórek i hamowania biosyntezy białek receptorowych na powierzchni błon komórkowych. Wzrost komórek ulegał zahamowaniu w fazie G₁ cyklu podziałowego. Inni autorzy inkubując ³H-tymidynę, ³H-urydynę i ¹⁴C-aminokwasy w środowisku pozbawionym argininy z limfocytami Burkitta EB, uzyskali podobne wyniki. Zaobserwowano wyraźne zmniejszenie włączania znakowanych prekursorów w DNA, RNA i białka komórkowe (28). Arginina jest więc niezbędna tym komórkom do rozpoczęcia procesu biosyntezy DNA w fazie S.

Badania nad wpływem argininy na szybkość wzrostu przeszczepialnego nabłonia Guerin w mięśniach szkieletowych szczura wykazały, że arginina znacznie przyspiesza wzrost tkanki nowotworowej (29). Przejawia się to w większej masie guzów oraz w liczniejszych i rozleglejszych przerzutach. Po dodaniu argininy w ilości 0,111 mg/g wagi szczura stwierdza się znacznie więcej nieprawidłowych podziałów komórkowych.

Spośród aminokwasów zasadowych ¹⁴C-arginina jest najszybciej włączana w białka guza Walkera, mięsaka Jensena i raka wysiękowego Ehrlicha (30, 31). Włączanie tego aminokwasu w białka cytosolu nabłonia Guerin jest również znacznie szybsze niż w białka błony śluzowej macicy, z której wywodzi się ten nowotwór (32). Znaczna ilość ¹⁴C-argininy wykorzystywana jest do biosyntezy białek cytosolu tego nowotworu, wśród których znajdują się białka zasadowe bogate w argininę (32, 33). Białka te nie występują natomiast w cytosolu tkanki kontrolnej, którą stanowi błona śluzowa macicy (32). Hamując transport i włączanie aminokwasów do białek chłoniakomięsaka PI798 myszy zaobserwowano, że oba procesy dotyczą w największym stopniu aminokwasów zasadowych, argininy i lizyny (34).

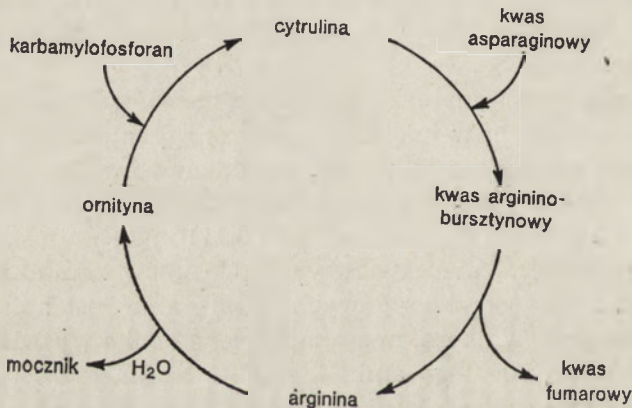
Nasuwa się pytanie z jakich źródeł pochodzi arginina służąca do biosyntezy białek zasadowych bogatych w ten aminokwas w komórkach nowotworowych. Wydaje się, że jest ona częściowo „wychwytywana” z krążenia; zaobserwowano bowiem spadek poziomu wolnej argininy w surowicy krwi zwierząt z doświadczalnymi nowotworami (32, 35, 36). Ponadto

w komórkach nabłoniaka Guerin brak jest arginazy (32), a aktywność aminotransferazy argininy jest niezmiernie niska (37). Wolna arginina może pochodzić również z proteolizy wewnątrzkomórkowych białek, zwłaszcza że stwierdzono zwiększoną szybkość ich degradacji w porównaniu z białkami tkanek prawidłowych (38, 39).

Właściwy mechanizm działania argininy na wzrost komórek nowotworowych pozostaje nadal niewyjaśniony. Najbardziej prawdopodobna wydaje się hipoteza wskazująca powiązania między arginina a intensywnością biosyntezy poliamin (19), które są konieczne do szybkiego wzrostu tkanek w tym również tkanek nowotworowych (40—44).

III. Wpływ argininy na aktywność niektórych enzymów

Szczególnie ważne jest oddziaływanie argininy z enzymami cyklu mocznikowego. W cyklu tym bowiem zachodzi synteza argininy a także jej rozpad z odszczepieniem mocznika. Rycina 1 ilustruje schematycznie cykl mocznikowy.

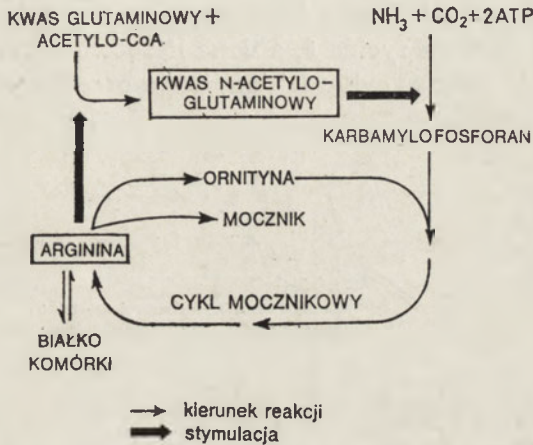


Ryc. 1. Schemat cyklu mocznikowego w mitochondriach wątroby ssaków.

W mitochondriach wątroby szczurów występuje acetylotransferaza glutaminianowa (EC 2.3.1.1), syntetyzująca kwas N-acetyloglutaminowy (45). Enzym ten różni się od innych enzymów acylujących aminokwasy dwiema charakterystycznymi właściwościami, a mianowicie: ścisłą specyficznością substratową wobec kwasu l-glutaminowego i acetylo-CoA oraz tym, że jest stymulowany przez l-argininę. Inne związki zawierające grupy aminowe i guanidynowe nie stymulują aktywności tego enzymu. Stwierdzono (45), że w obecności 2 mM argininy synteza kwasu N-acetyloglutaminowego w mitochondriach wątroby ssaków była około 10 razy większa niż w próbie kontrolnej bez argininy. Powstający kwas N-acetyloglutaminowy, wiążąc jony amonowe przy udziale syntetazy karbamyl-

fosforanowej (EC 2.7.2.5) tworzy karbamylofosforan, który reagując z grupą aminową w pozycji δ ornityny przekształca się w argininę (Ryc. 2).

Jak przedstawiono na Rycinie 2 arginina wpływa stymulująco na intensywność biosyntezy kwasu N-acetyloglutaminowego i karbamylofosforanu, które odgrywają ważną rolę w kontroli biosyntezy argininy i mocznika. Stymulacja biosyntezy kwasu N-acetyloglutaminowego i karbamylofosforanu przez argininę może tłumaczyć także ochronny jej wpływ wobec toksycznego działania nadmiaru amoniaku, jaki wykazano w doświadczeniach *in vivo* (46, 47).



Ryc. 2. Schemat regulacji cyklu mocznikowego przez argininę w mitochondriach wątroby szczura (45).

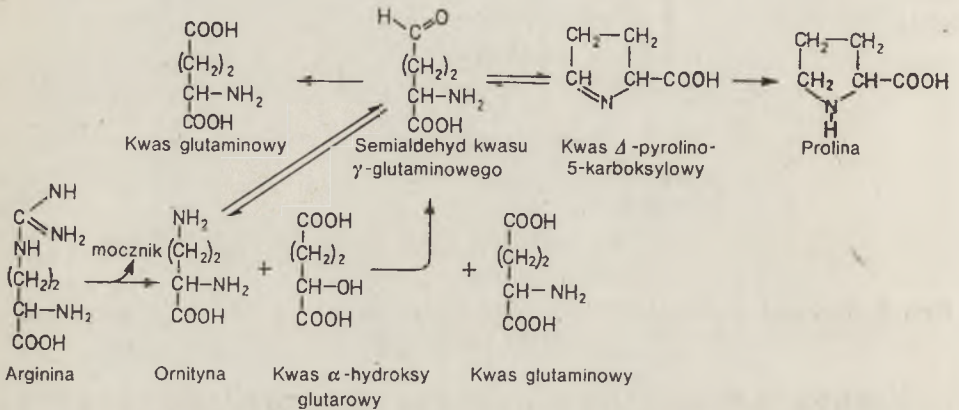
Kontrola biosyntezy argininy odbywa się również poprzez zmianę aktywności innych enzymów cyklu mocznikowego. U szczurów żywionych dietą pozbawioną argininy stwierdzono ponad dwukrotny wzrost poziomu pierwszych czterech enzymów związanych z biosyntezą argininy, podczas gdy aktywność arginazy, enzymu katabolizującego argininę, pozostaje niezmienną (48). Przyczyniać się to może w znacznym stopniu do utrzymania stałego, prawidłowego poziomu argininy w organizmie.

Wpływ argininy na aktywność wspomnianych enzymów, został potwierdzony innymi badaniami (49). Gdy inkubowano komórki wątroby w środowisku hodowlanym w obecności argininy w różnych, stopniowo malejących stężeniach, aktywność enzymów biorących udział w przemianie cytruliny w argininę, wyraźnie zwiększyła się. Zwiększenie stężenia cytruliny natomiast nie powodowało wzrostu aktywności obu wymienionych enzymów.

Rogers i wsp. (50) uważają, że u szczurów nie tylko wątroba ale i nerki odgrywają ważną rolę w biosyntezie argininy. W wątrobie szczurów synteza cytruliny zachodzi z dużą wydajnością, jednak tylko część cytruliny ulega przemianie w argininę bezpośrednio w wątrobie, reszta zaś

transportowana jest przez układ krwionośny do nerek, gdzie jest przetwarzana w argininę. Większość produkowanej w wątrobie arginy ulega tu rozkładowi przez arginazę do mocznika i ornityny (51, 52). Nerki wykazują mniejszą aktywność enzymów cyklu mocznikowego niż wątroba, jednakże stosunek aktywności arginazy do aktywności enzymów syntetyzujących argininę jest w nerkach niższy niż w wątrobie. Nerki głównie uzupełniają zapotrzebowanie organizmu na argininę (50, 53).

Rola arginy w przemianach metabolicznych nie ogranicza się tylko do regulacji cyklu mocznikowego. Stwierdzono, że arginina jest ważnym źródłem proliny i kwasu glutaminowego w gruczole piersiowym ssaków w okresie laktacji (54). Schemat biosyntezy proliny i kwasu glutaminowego z arginy ilustrują rycina 3, a dane liczbowe dotyczące biosyntezy obu aminokwasów podczas cyklu laktacyjnego przedstawia tabela 1.



Ryc. 3. Schemat biosyntezy kwasu glutaminowego i proliny z arginy.

Tabela 1.

Powstawanie kwasu glutaminowego i proliny w komórkach gruczolów piersiowych szczurów z ^{14}C -argininy po jednorazowym jej podaniu (54).

Badane aminokwasy	Dzień laktacji			
	8	11	15	19
	względna specyficzna radioaktywność c.p.m./ μmol			
arginina	0,56	0,40	0,61	0,39
ornityna	0,87	0,88	0,66	1,15
prolina	0,016	0,014	0,086	0,052
kwas glutaminowy	0,006	0,005	0,023	0,023
stosunek radioaktywności proliny w gruczole i osocz	1,9	—	4,9	3,0

Równomiernie znakowaną ^{14}C -argininę podano w ilości 25/ μCl .

Jak przedstawiono w tabeli 1 podanie znakowanej ^{14}C -argininy w czasie cyklu laktacyjnego powoduje wzrost aktywności enzymów doprowadzających do biosyntezy proliny i kwasu glutaminowego. Występujący w gruczole piersiowym izoenzym arginazy jest odpowiedzialny za syntezę tych aminokwasów. Nie towarzyszą mu inne enzymy cyklu mocznikowego (55—57), o czym świadczy fakt, że znakowana ornityna nie ulegała przemianie w cytrulinę (54). W okresie laktacji komórki gruczołu piersiowego kóz pobierają z krążenia więcej argininy a mniej proliny i kwasu glutaminowego niż wydzielają z białkiem mleka (58). Arginina jest w komórkach gruczołu szybko katabolizowana do kwasu glutaminowego i proliny, uzupełniając ich niedobór (59).

Wzrost ilości kwasu glutaminowego w komórkach wątroby szczurów powoduje wtórne zwiększenie zawartości kwasu asparaginowego i alaniny, w efekcie transaminacji, zachodzących przy udziale kwasu szczawowego i pirogronowego (60). Po jednorazowym podaniu szczurom dootrzewnowo argininy, już po 20 minutach dochodzi do wzrostu ilości wyżej wymienionych aminokwasów (60).

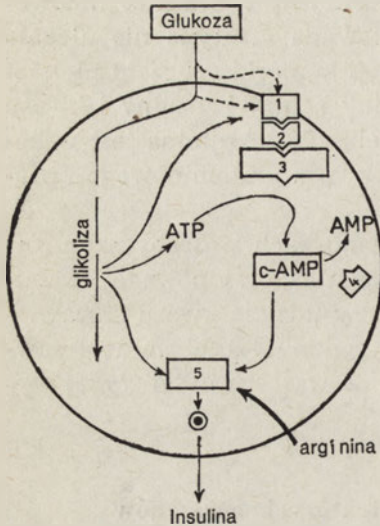
IV. Rola argininy w regulacji wydzielania niektórych hormonów

Mimo licznych badań nad wpływem argininy na wydzielanie insuliny, nieznanym jest jeszcze mechanizm stymulującego działania tego aminokwasu na komórki β -trzustki. Na podstawie wyników *in vivo* u ludzi przyjmuje się, że arginina może wpływać na wydzielanie insuliny nie przez bezpośrednie oddziaływanie na komórki β -trzustki lecz poprzez wzmaganie insulinogennego sygnału wywołanego uprzednio przez glukozę (61—63). Insulinogenny efekt argininy występuje przy odpowiednim stężeniu glukozy we krwi, a synergizm działania argininy i glukozy pojawia się tylko wówczas, gdy obecność samej glukozy wystarcza, by spowodować uwolnienie insuliny. Zaproponowano następujący schemat „modulującego” wpływu argininy na wydzielanie insuliny (63) (Ryc. 4).

Arginina, podobnie jak pochodna sulfonylotiomocznika — tolbutamid, środek leczniczy o działaniu hypoglikemicznym, stosowany u ludzi przy zmniejszonym wydzielaniu insuliny, może wzmacniać wydzielanie hormonu, wywołane glukozą (63).

Badania przeprowadzone *in vitro* nie w pełni potwierdzają dane uzyskane *in vivo* nad wpływem argininy na wydzielanie insuliny. Stwierdzono, że arginina stymuluje uwalnianie insuliny nawet w nieobecności glukozy (64—68). Efekt ten jednak jest nieznaczny w porównaniu z intensywnością pobudzania wydzielania insuliny przez glukozę. Można przypuszczać, że glukoza i arginina oddziałują na wydzielanie insuliny poprzez różne mechanizmy (69—72). Brak współzawodnictwa między tymi związkami sugeruje, że nie działają one na ten sam receptor umiejscow-

wiony w komórkach β -trzustki. Hipoteza istnienia receptorów argininyowych w komórkach β stała się bardzo prawdopodobna po stwierdzeniu, że niemetabolizowane analogi argininy także mogą stymulować wyzwalanie insuliny (73).



Ryc. 4. Hipotetyczna regulacja wydzielania insuliny.

1 — specyficzny receptor glukozy, 2 — jednostka przenosząca sygnał, 3 — cyklaza adenylova, 4 — fosfodwuesteraza, 5 — jednostka uwalniająca insulinę. Linie przerywane wskazują miejsca, w których sygnał łańcucha może być „modulowany”.

Interpretacja wyników uzyskanych *in vitro* wymaga jednak dużej ostrożności. Wydaje się, że arginina i glukoza w stężeniach fizjologicznych (odpowiednio < 2 i $< 5,5$ mM) stymulują w bardzo niewielkim stopniu wydzielanie insuliny, lecz znacznie wpływają na wydzielanie glukagonu. Niemniej jednak dużą rolę w wydzielaniu insuliny u szczurów, być może i u ludzi (74), przypisuje się synergicznemu działaniu glukozy i niektórych aminokwasów (67—75).

Arginina może również stymulować wyzwalanie ludzkiego hormonu wzrostowego (HGH). Od czasu opracowania pierwszego testu pozwalającego na stwierdzenie stymulacji wyzwalania ludzkiego hormonu wzrostowego przez różne aminokwasy, a szczególnie przez argininę (76), nagromadzono wiele danych na temat tego zjawiska (77, 78). Stwierdzono, że ogólna zawartość hormonu wzrostowego w osoczu jest wyższa u kobiet niż u mężczyzn i że odpowiedź tego hormonu na stymulujące działanie argininy zależy od ilości estrogenów w organizmie (79). Wyzdzielanie osoczkowego hormonu wzrostowego pod wpływem argininy jest zmniejszone u osobników otyłych, a spadek wagi przywraca jej stymulującą właściwość (78).

V. Uwagi końcowe

Arginina jest konieczna do rozwoju niektórych onkogennych wirusów i prawidłowych komórek zwierzęcych w hodowlach tkankowych. U zwierząt żywionych dietą pozbawioną argininy, wzrost nowotworów jak chło-

niakomęsaka myszy, chłoniaka Burkitta oraz innych nowotworów jest upośledzony.

Arginina ponadto posiada znaczenie w regulacji metabolizmu komórkowego wpływając na aktywność enzymów cyklu mocznikowego oraz na wydzielanie insuliny, glukagonu i hormonu wzrostowego.

W ostatnich latach pojawiły się dane, na podstawie których można sądzić, że guanidynowe grupy argininy odgrywają ważną rolę w specyficznym „rozpoznawaniu” kwasów nukleinowych przez białka (80, 81) i że metylacja grup guanidynowych może wpływać na stabilność powstającego kompleksu (82).

Zaakceptowano do druku 30.9.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 1—22.
2. Borysiewicz J., Koj A., (1972), *Folia Biol.*, **20**, 23—34.
3. Storr J. N., Burton A. F., (1974), *Brit. J. Cancer*, **30**, 50—59.
4. Weinberg A., Becker Y., (1970), *Exptl. Cell Res.*, **60**, 470—474.
5. Obert G., Tripier F., Guir J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 362—367.
6. Mäntyjärvi R. A., (1972), *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **80 B**, 117—122.
7. Lewkowitz S. S., Hung C. Y., (1972), *Experientia*, **28**, 464—465.
8. Layer W. G., (1970), *Virology*, **41**, 488—500.
9. Winters A. L., Consigli R. A., Rogers Q. R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1044—1050.
10. Spring S. B., Roizman B., Spear P. G., (1969), *Virology*, **38**, 710—712.
11. Cohen E. P., Nylen M. U., Scott D. B., (1961), *Exptl. Cell Res.*, **23**, 443—453.
12. Freed J. J., Schatz S. A., (1969), *Exptl. Cell Res.*, **55**, 393—409.
13. Lane N. J., Novikoff A. B., (1965), *J. Cell Biol.*, **27**, 603—620.
14. Aula P., Nichols W. W., (1967), *J. Cell Physiol.*, **70**, 280—290.
15. Granick S., Granick D., (1971), *J. Cell Biol.*, **54**, 636—642.
16. Stein S. M., Berestecky J. M., (1975), *J. Cell Physiol.*, **85**, 243—249.
17. Stein S. M., Berestecky J. M., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 3112—3116.
18. Tsai C. M., Huang C. C., Carnellakis E. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **332**, 47—58.
19. Takeda Y., Tominaga T., Tei N., Kitamura M., Taga S., Murase J., Taguchi T., Miwatani T., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 2390—2393.
20. Pryme I. F., (1976), *Cancer Letters*, **1**, 177—182.
21. Beard H. H., (1943), *Arch. Biochem.*, **1**, 177—186.
22. Levy H. M., Mantanez G., Feaver E. R., Murphy E. A., Dunn M. S., (1954), *Cancer Res.*, **14**, 198—200.
23. Nakanishi K., (1969), *Osaka Univ. Med. J.*, **21**, 193—204.
24. Kojima R., Shimada K., Asano H., (1973), *Exp. Animals*, **22**, 237—242.
25. Bach S. J., Swaine D., (1965), *Br. J. Cancer*, **19**, 379—386.
26. Senft A. W., (1967), *Comp. Biochem. Physiol.*, **21**, 299—304.
27. Osunkoya B. O., Adler W. H., Smith R. T., (1970), *Nature*, **227**, 398—399.
28. Becker Y., Weinberg A., (1971), *Israel J. Med. Sci.*, **7**, 561—567.

29. Nowak H. F., Cylwik B., Duda D., (1976), *Pat. Pol.*, **27**, 127—137.
30. Starbuck W., Busch H., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 891—896.
31. Busch H., Honig C. R., Davis J. R., Nyhan W. L., Anderson D. C., Nair P. V., (1959), *Cancer Res.*, **19**, 1030—1039.
32. Farbiszewski R., (1976), Praca habilitacyjna, Białystok.
33. Farbiszewski R., Wincewicz A., Rzczycki W., (1977), *Mol. Cell. Biochem.*, **17**, 3—6.
34. Nashburn L. T., Landin L. M., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 313—318.
35. Oliver R., (1960), Tezy pracy doktorskiej, Bordeaux, 1—65.
36. Yamamoto H., Aikawa T., Matsutaka H., Ishikawa E., (1974), **23**, 1017—1022.
37. Jaroszewicz L., Wincewicz A., Rzczycki W., (1976), *Neoplasma*, **23**, 259—263.
38. Farbiszewski R., Rzczycki W., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 280—283.
39. Farbiszewski R., Worowski K., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 407—423.
40. Bachrach U., (1973) w *Function of Naturally Occurring Polyamines*, str. 1—34, Academic Press Inc., New York, London.
41. Bachrach U., (1976), *Ital. J. Biochem.*, **25**, 77—93.
42. Cohen S. S., (1971) w *Introduction to the Polyamines*, str. 1—109, Englewood Cliff N. J., Prentice Hall.
43. Jäne J., Pösö H., Raina A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 241—293.
44. Farbiszewski R., Kilczewska D., (1978), *Post. Biol. Kom.*, w druku.
45. Shigesada K., Tatibana M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1117—1124.
46. Harper H. A., Najarian J. S., Silen W., (1956), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **92**, 558—560.
47. Gullino P., Winitz M., Birnbaum S. C., Cornfield J., Otey M. C., Greenstein J. P., (1955), *Arch. Biochem. Biophys.*, **58**, 255—257.
48. Schimke R. T., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1012—1018.
49. Schimke R. T., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 136—145.
50. Rogers Q. R., Freedland R. A., Symmons R. A., (1972), *Am. J. Physiol.*, **223**, 236—240.
51. Swick R. W., (1957), *J. Biol. Chem.*, **231**, 751—764.
52. Schimke R. T., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3808—3817.
53. Featherston W. R., Rogers Q. R., Freedland R. A., (1973), *Am. J. Physiol.*, **224**, 127—129.
54. Mezl V. A., Knox W. E., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 105—113.
55. Folley S. J., Greenbaum A. L., (1947), *Biochem. J.*, **41**, 261—268.
56. Yip M. C., Knox W. E., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 893—899.
57. Glass R. D., Knox W. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5785—5789.
58. Mephram T. B., Linzell J. L., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 76—83.
59. Mephram T. B., Linzell J. L., (1967), *Nature*, **214**, 507—508.
60. Griffaton G., Rozen R., Maon R., Lowy R., (1972/73), *Enzyme*, **14**, 325—339.
61. Efendic S., Cerasi E., Luft R., (1974), *Diabetes*, **23**, 161—171.
62. Efendic S., Cerasi E., Luft R., (1972), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **34**, 67—72.
63. Efendic S., Cerasi E., Luft R., (1971), *Metabolism*, **20**, 568—579.
64. Gerich J. E., Charles M. A., Grodsky G. M., (1974), *J. Clin. Invest.*, **54**, 833—841.
65. Gray N. J., Goldring S., Kipnish D. M., (1970), *Nobel Symp.*, **13**, 155—171.

66. Basabe J., Lopez N., Viktora J., Wolff F., (1971), *Diabetes*, **20**, 449—456.
67. Levin S. R., Grodsky G. M., Hagura R., Smith D. F., Forsham R. H., (1972), *Endocrinology*, **90**, 624—631.
68. Hertelandy F., Machlin L. J., Takahashi Y., Kipnis D. M., (1968), *J. Endocrinol.*, **41**, 605—606.
69. Cerasi E., Luft R., (1970), *Horm. Metab. Res.*, **2**, 246—249.
70. Hellman B., Sehlin J., Täljedal I., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 147—154.
71. Malaisse W. J., (1973), *Diabetologia*, **9**, 167—173.
72. Grodsky G. M., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 2047—2059.
73. Fajans S. S., Floyd J. C. Jr., Knopf R. F., Pek S., Weissman P., Conn J. W., (1972), *Isr. Med. J.*, **8**, 233—243.
74. Goodner C. Jr., Porte D. Jr., (1972), *Handb. Physiol.*, **1** (Sect. 7), 597—609.
75. Levin S. R., Karam J. H., Hane S., Grodsky G. M., Forsham P. H., (1971), *Diabetes*, **20**, 171—176.
76. Knopf R. F., Conn J. W., Fajans S. S., Floyd J. C., Guntsche E. M., Rull J. A., (1965), *J. Clin. Endocrinol.*, **25**, 1140—1144.
77. Johnson S. E., Norman N., Sjastad O., (1974), *Acta Endocrinol.*, **77**, 686—690.
78. El-Khodary A. Z., Ball M. F., Stein B., Canary J. J., (1971), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **32**, 42—51.
79. Marimee T. J., Rabinowitz D., Riggs L., (1967), *New England J. Med.*, **276**, 434—439.
80. Seeman N. C., Rosenberg J. M., Rich A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 804—808.
81. Mansy S., Engstrom S. K., Peticolas W. L., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1242—1247.
82. Christensen M. E., Beyer A. L., Walker B., Le Sturgeon W. M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 621—629.

Nowi profesorowie

W dniu 18 stycznia 1979 r. Rada Państwa nadała tytuły naukowe profesora następującym biochemikom:

tytuł profesora zwyczajnego — prof. nadzw. Jerzemu Buchowiczowi, prof. nadzw. Kazimierzowi Kleczkowskiemu, prof. nadzw. Janowi Szarkowskiemu, prof. nadzw. Kazimierzowi Lechowi Wierzchowskiemu z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, prof. nadzw. Józefowi Lisowskiemu z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Hirszfelda, PAN we Wrocławiu, prof. nadzw. Danucie Frąckowiak z Politechniki Poznańskiej, prof. nadzw. Stanisławowi Przestalskiemu z Akademii Rolniczej we Wrocławiu, prof. nadzw. Tadeuszowi Lachowiczowi z Uniwersytetu Wrocławskiego;

tytuł profesora nadzwyczajnego — doc. dr hab. Marii Piechowskiej z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego

Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepsze doniesienia przedstawione na XVI Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi we wrześniu 1978 r. otrzymali:

1. Marek Dominiczak (*Gdańsk*),
2. Andrzej Joachimiak (*Poznań*),
3. Henryk Luboń (*Kielce*),
4. Elżbieta Medyńska (*Toruń*),
5. Jolanta Szyszko (*Warszawa*),
6. Tadeusz Zwierzyński (*Poznań*).

XIII Zjazd FEBS w Jerozolimie (1980)

XIII Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych odbędzie się w sierpniu 1980 r. w Jerozolimie. Ponieważ Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego otrzymał jedynie ograniczoną liczbę egzemplarzy pierwszego komunikatu, nie będzie on rozesłany do wszystkich członków Towarzystwa, lecz zostanie udostępniony na życzenie. Osoby interesujące się Zjazdem proszone są zatem o pisemne zgłoszenie na adres Zarządu Głównego (ul. Freta 16, 00-227 Warszawa) chęci otrzymania pierwszego komunikatu. Komunikat zawiera również formularz wstępnego zgłoszenia uczestnictwa, co zapewnia otrzymanie dalszych informacji o Zjeździe.

ANDRZEJ SZUTOWICZ *)

Synteza acetylocholin w synaptosomach

Acetylcholine Synthesis in Synaptosomes

Spis treści

Wstęp

- I. Izolowanie zakończeń nerwowych z mózgu
- II. Acetylotransferaza cholinowa (EC 2.3.1.6)
 - II-1. Regulacja aktywności
 - II-2. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie
- III. Transport cholin
 - III-1. Układ transportu cholin
 - III-2. Transport cholin w układzie cholinergicznym
 - III-3. Metabolizm energetyczny a transport cholin
- IV. Synteza reszty acetylowej acetylocholin
 - IV-1. Wewnątrzmitochondrialna synteza acetylo-CoA
 - IV-2. Pośredni transport reszt acetylowych z mitochondriów do cytoplazmy w układzie nerwowym
 - IV-3. Aktywność enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu
 - IV-4. Rola liazy cytrynianowej w transporcie acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy
- V. Bioenergetyczne aspekty magazynowania i wydzielania acetylocholin
- VI. Podsumowanie

Contents

Introduction

- I. Isolation of nerve endings from brain
- II. Choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6)
 - II-1. Regulation of activity
 - II-2. Intracellular localization
- III. Choline transport
 - III-1. Choline uptake systems
 - III-2. Choline uptake in cholinergic system
 - III-3. Energy metabolism and choline transport

*) Dr, Zakład Biochemii Klinicznej, Instytut Patologii, Akademia Medyczna, Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; acetylo-CoA — acetylowany koenzym A; CoA — koenzym A.

IV. Synthesis of acetyl residue of acetylcholine

IV-1. Intramitochondrial acetyl-CoA synthesis

IV-2. Intermediate acetyl groups transport from mitochondria to cytoplasm in the nervous system

IV-3. The role citrate lyase in acetyl-CoA transport from mitochondria to cytoplasm

V. Bioenergetics of storage and release of acetylcholine

VI. Concluding remarks

Acetylocholina (ACh) jest substancją przekaźnikową (neurotransmiterem) występującą w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym zwierząt różnych gatunków. Wytwarzają ją specjalne grupy komórek nerwowych zwanych neuronami cholinergicznymi. Charakterystyczną cechą przewodnictwa bodźców w układzie cholinergicznym jest wydzielanie acetylocholinoz z zakończeń nerwowych, które są jednocześnie głównym miejscem jej syntezy (1, 2). Dlatego też zakończenia nerwowe izolowane z tkanki nerwowej stanowią dobry materiał doświadczalny do badań nad syntezą i wydzielaniem acetylocholinoz.

Szereg zagadnień związanych z metabolizmem acetylocholinoz omówiono już na łamach Postępów Biochemii (3). Obecnie szczególną uwagę zwrócono na biosyntezę reszt acetylowych acetylocholinoz, na który to temat opublikowano wiele sprzecznych doniesień.

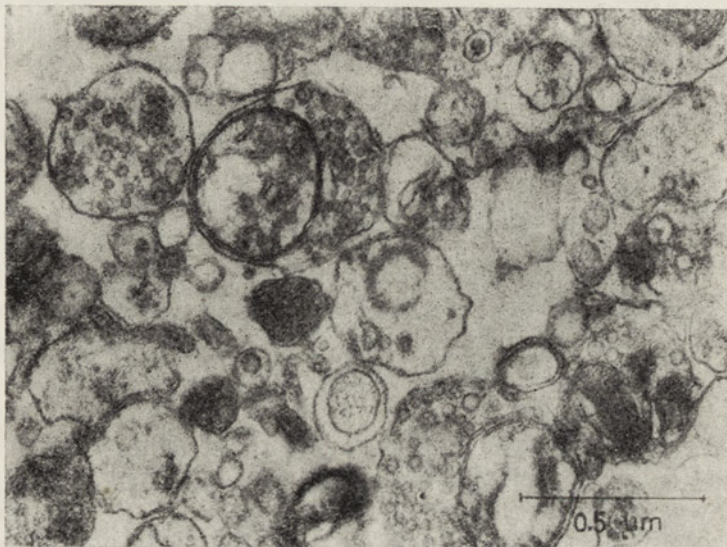
I. Izolowanie zakończeń nerwowych z mózgu

W trakcie homogenizacji mózgu w izotonicznych roztworach sacharozy lub mannitolu, zakończenia wypustek komórek nerwowych ulegają oderwaniu od włókna aksonu tworząc zamknięte błoną plazmatyczną twory — synaptosomy, które stosunkowo łatwo można oddzielić od innych struktur subkomórkowych mózgu. Osiąga się to przez wirowanie różnicowe oraz wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy (4, 5) lub polimerów takich, jak Ficoll i diatrizoat (6, 7, 8). Dobre wyniki można też uzyskać przez flotację surowej frakcji mitochondrialnej w nieciągłym gradiencie — Ficoll w izosmotycznej sacharozie (9) lub mannitolu (10). Synaptosomy, po odwirowaniu w gradiencie roztworów o różnym ciężarze właściwym, znajdują się między lekką, bogatą w lipidy frakcją mielinową a cięższymi od nich mitochondriami, pochodzącymi głównie z rozbitych komórek glejowych i w mniejszym stopniu z ciał komórek nerwowych (perikarionów) (11, 12).

Synaptosomy mają średnicę od 0,5 do 5 μm , zawierają jeden lub kilka mitochondriów, które zajmują około 24% objętości, pęcherzyki synap-

tyczne (4% objętości), synaptoplazmę (64% objętości) i błonę plazmatyczną (8% objętości) (11) (Ryc. 1). Można je zatem uważać za miniaturowe bezjądrzaste komórki o wysoce wyspecjalizowanej czynności, jaką jest synteza neurotransmitera (13).

Synaptosomy cholinergiczne stanowią niewielką część zakończeń nerwowych mózgu (14, 15). Dlatego też dąży się do zastosowania metod pozwalających na uzyskanie z mózgu synaptosomów o możliwie dużej za-



Ryc. 1. Obraz frakcji synaptosomalnej mózgu szczura uzyskanej przez flotację frakcji surowych mitochondriów w nieciągłym gradiencie — Ficoll w izotonicznym manitolu (10).

Powiększenie około 70 000 razy.

wartości zakończeń cholinergicznych. W tym celu stosuje się na przykład rozdział frakcji surowych mitochondriów przez wirowanie w gradiencie ciągłym (16) lub wielostopniowym. Uzyskane taką drogą dane są jednak rozbieżne i budzą wątpliwości (11, 17, 18).

Inną możliwością uzyskania frakcji synaptosomalnej bogatej w zakończenia cholinergiczne jest izolowanie jej ze struktur mózgu takich jak prądkowie, które zawiera około 15% synaps cholinergicznych (19, 20). Bardzo dogodnym materiałem do badań modelowych metabolizmu acetylocholin jest narząd elektryczny ryb z rodziny *Torpedinidae* zawierający niemal wyłącznie (95%) synaps cholinergicznych (21). Ostatnio opracowano metodę otrzymywania synaptosomów z narządu elektrycznego, która stwarza dalsze możliwości badań (22, 23).

II. Acetylotransferaza cholinowa (EC 2.3.1.6)

II-1. Regulacja aktywności

Reakcję biosyntezy acetylocholin katalizuje specyficzny enzym acetylotransferaza cholinowa. Wartości jej K_m wobec cholin wahają się od 150 do 900 μM , a wobec acetylo-CoA od 11 do 26 μM , wykazując wyraźną zależność od stężenia KCl w środowisku (24—28). Stężenie cholin w tkance mózgowej jest niskie rzędu 25—50 μM (28, 29), a stężenie acetylo-CoA 5—11 μM (29—31). Dlatego niektórzy autorzy sugerują że dostępność w cytoplazmie synaptosomów cholinergicznyc cholin i acetylo-CoA może regulować szybkość syntezy acetylocholin (32). Wiadomo jednak, że stężenie cholin w neuronach cholinergicznyc jest wyższe (33) niżby to wynikało z danych dotyczących całej tkanki mózgowej (28—30).

Produkty reakcji hamują aktywność acetylotransferazy cholinowej. Jednakże w przypadku acetylocholin inhibicja przez produkty nie ma istotnego znaczenia dla regulacji jej aktywności. Stała inhibitorowa acetylocholin jest bowiem rzędu kilkudziesięciu mM (34, 35), natomiast jej stężenie w całym mózgu nie przekracza 40 μM (36—38). Sytuacji nie zmienia fakt, że rzeczywiste stężenie acetylocholin w cytoplazmie synaptosomów cholinergicznyc jest znacznie wyższe i wynosi od 0,5 do kilku mM. Trzeba bowiem pamiętać, że zakończenia cholinergiczne stanowią zaledwie 1% objętości tkanki mózgowej (11, 14), a cała acetylocholin mózgowa występuje w tych zakończeniach (39—41). Koenzym A, drugi produkt reakcji, jest silnym inhibitorem aktywności enzymu (K_i — 16 μM), kompetycyjnym w stosunku do acetylo-CoA (24). Stężenie CoA w mózgu jest 10—20 razy wyższe niż stężenie acetylo-CoA (31). Dlatego też zmiana stężenia lub stosunku stężeń CoA/acetylo-CoA może mieć istotny wpływ na szybkość biosyntezy acetylocholin (42). Dotychczas jednak nie ma danych o stężeniach tych substancji w neuronach cholinergicznyc.

Wartość stałej równowagi reakcji katalizowanej przez acetylotransferazę cholinową wynosi 12—41 (43, 44), co oznacza przesunięcie reakcji w kierunku syntezy acetylocholin. Porównanie wartości stałej równowagi ze stężeniami substratów i produktów acetylotransferazy w mózgu wskazuje, że szybkość syntezy acetylocholin *in vivo* może podlegać regulacji na zasadzie prawa działania mas (24).

II-2. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie

Badania aktywności i subkomórkowego rozmieszczenia acetylotransferazy cholinowej w różnych częściach mózgu, pozwoliły ustalić, że 15—25% całkowitej aktywności tego enzymu znajduje się w aksonach

i dendrytach, a około 70% w synaptosomach (1), natomiast w ciałach komórek nerwowych jedynie 5%. Takie rozmieszczenie aktywności może wynikać z faktu, że acetylotransferaza cholinowa syntetyzowana w perikarionach przemieszcza się dzięki transportowi aksonalnemu do zakończeń nerwowych (45, 46).

Rozmieszczenie acetylotransferazy cholinowej w obrębie synaptosomów było przedmiotem wielu kontrowersji. Zostały one wyjaśnione przez F o n n u m i w s p. (1, 3, 35, 47), którzy wykazali istnienie kilku form molekularnych acetylotransferazy o różnych punktach izoelektrycznych. W zależności od stopnia dysocjacji poszczególne formy enzymu wiążą się mocniej lub słabiej z błonami plazmatycznymi. Wiązanie to jest odwracalne i łatwo ulega dysocjacji w roztworach o wysokiej sile jonowej. Obecnie uważa się, że acetylotransferaza cholinowa występuje w cytoplazmie synaptosomów, gdzie zachodzi biosynteza acetylocholin (1). Wytworzona w cytoplazmie acetylocholina gromadzi się w pęcherzykach (1). Wydaje się, że proces akumulacji neurotransmitera w pęcherzykach jest istotnym czynnikiem regulującym szybkość syntezy acetylocholin poprzez usuwanie jednego z produktów reakcji z synaptoplazmy.

III. Transport choliny

III-1. Układy transportu choliny

Acetylocholina wydzielona do szczeliny synaptycznej rozkłada się przy udziale esterazy acetylocholinowej (EC 3.1.1.7). W wyniku reakcji powstaje cholina i octan (1, 11). Tkanka mózgowa ma ograniczoną zdolność syntezy choliny (48, 49). Również ilość wolnej choliny występującej w mózgu jest niewielka (28, 29). Synaptosomy cholinergiczne nie wychwytyją też acetylocholin z otoczenia (50, 51). Dlatego też istotne znaczenie dla syntezy acetylocholin ma transport do wnętrza synaptosomów wolnej choliny z krwi (52—55) lub ze szczeliny synaptycznej (zjawisko tzw. powtórnego wychwyty choliny) (2, 3).

Fakt, że wykres zależności szybkości gromadzenia się choliny od jej stężenia ma przebieg dwufazowy świadczy o istnieniu w synaptosomach dwóch układów transportu choliny, o wysokim (K_m 1—4 μ M) i o niskim powinowactwie do choliny (K_m 40—200 μ M) (56—59).

Aktywność układu o wysokim powinowactwie zależy od obecności jonów sodowych. Cyjanek, ouabaina oraz obniżenie temperatury hamują układ transportu o wysokim powinowactwie do choliny (56, 57, 59, 60). Wymienione czynniki nie wpływają natomiast na aktywność układu o niskim powinowactwie do choliny. Analog strukturalny choliny hemicho-

linium—3 hamuje aktywność układu o wysokim powinowactwie do choliny ($K_1 = 0,01 \mu\text{M}$) znacznie silniej niż aktywność układu o niskim powinowactwie ($K_1 = 50 \mu\text{M}$) (56, 61).

Tabela 1.

Parametry kinetyczne transportu choliny w układzie nerwowym zwierząt różnych gatunków

Preparat	Zwierzę	Układy transportu choliny				Piśmien- nictwo
		Wysokie powinowactwo		Niskie powinowactwo		
		K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	
1. Synaptosomy:						
Płat wzrokowy	Ośmiornica	2	280	38	330	59
	<i>Loligo pealii</i>					
Narząd elektryczny	<i>Torpedo mar-</i> <i>morata</i>	2	600	0	0	23
Przedomózgowie	Szczur	4—8	—	40	—	56
Prądkowie	„	4	3**	0	0	61
Hipokamp	„	0,3	6,5	—	—	
Prądkowie	„	—	17,0	—	—	62
Podwzgórze	„	—	2,4	—	—	
Kora	„	4,0	67	40	—	
Pień mózgu	Świnka	3,3	45	40	—	66
Mózdzek	morska	2,9	24	40	—	
2. Homogenaty:						
Prądkowie	„	1,4	50	93	190	
Kora	Szczur	3,1	30	33	80	57
Mózdzek	„	0	0	41	50	
3. Izolowane tkanki:						
Nerw źreniczo-rzęskowy	Kura	2	0,5	200	16*	58
Zwój rzęskowy	„	0	0	71	47*	63

Wartości K_m wyrażono w μM , a wartości V_{max} w pmolach/min/mg białka.

* V_{max} wyrażono w pmolach/min/preparat.

** V_{max} wyrażono w nmolach/min/jedn. międzynarodową acetylotransferazy cholinowej.

„—” nie badano, „0” nie wykryto.

III-2. Transport choliny w układzie cholinergicznym

Wiele danych wskazuje na to, że układ transportu o wysokim powinowactwie do choliny występuje wyłącznie w synaptosomach cholinergicznym.

Wymienione już poprzednio inhibitory transportu choliny, jak również atropina i leki o podobnym działaniu (55) oraz pentobarbital i wodzian chloralu (62) powodują spadek szybkości syntezy acetylocholíny proporcjonalny do stopnia zahamowania transportu o wysokim powinowactwie.

Synaptosomy z narządu elektrycznego *Torpedo*, stanowiące niemal

czystą populację zakończeń cholinergicznyc, mają tylko jeden układ transportu cholicy o wysokiej aktywności ($K_m = 2 \mu\text{M}$) (23) (Tabela 1). Z kolei, w ciałach neuronów cholinergicznyc zwoju rząskowego wykazano jedynie obecność układu o niskim powinowactwie do cholicy (63).

Zaobserwowano korelację między aktywnością acetylotransferazy cholinowej i stężeniem acetylocholicy w różnych obszarach mózgu, odmiennych gatunków zwierząt a aktywnością transportu o wysokim powinowactwie do cholicy (57, 64, 65).

Znaczna część cholicy wychwytywanej przez synaptosomy prązkowia ulega acetylacji do acetylocholicy. Synaptosomy mózdku, który zawiera tylko niewielką ilość zakończeń cholinergicznyc, nie syntetyzują acetylocholicy z wychwytywanej cholicy (66).

Uszkodzenie środkowej części przegrody mózgu powoduje wraz z degeneracją cholinergicznyc zakończeń nerwowych w hipokampie utratę aktywności układu transportowego o wysokim powinowactwie do cholicy, przy nieznacznych tylko zmianach w układzie o niskim powinowactwie (64).

Przy niskich stężeniach cholicy (1—3 μM) szybkości jej wychwytu i acetylacji przez synaptosomy są niemal równe (19, 57). Przy wzrastających stężeniach cholicy, które aktywują układ o niskim powinowactwie, zmniejsza się proporcja cholicy acetylowanej w synaptosomach, w stosunku do cholicy zużywanej do syntezy lipidów (57, 67, 69, 70).

Cholina zużywana do syntezy acetylocholicy dostaje się do zakończeń nerwowych wyłącznie przez układ o wysokim powinowactwie do cholicy (2). Transport może być zatem etapem ograniczającym szybkość jej syntezy. Układ transportu o niskim powinowactwie do cholicy występuje w różnych częściach mózgu, niezależnie od zawartości neuronów cholinergicznyc (64, 68).

III-3. Metabolizm energetyczny a transport cholicy

Niedotlenienie wywołane cyjankiem lub azotynem sodowym powoduje zablokowanie syntezy acetylocholicy oraz układu transportu o wysokim powinowactwie do cholicy (56, 57, 60). Z kolei jednak dwunitrofenol, który hamuje synteżę acetylocholicy, nieznacznie tylko obniża wychwytywanie cholicy przez synaptosomy (56, 60). Hamujący wpływ ouabainy na transport cholicy jest trudny do interpretacji gdyż jednocześnie obserwuje się wzmożenie wydzielania acetylocholicy (71, 72). Związek pomiędzy transportem cholicy a procesami energetycznymi nie jest jeszcze jasny. Wymienione inhibitory wpływają bowiem jednocześnie na wewnątrzmitochondrialną przemianę pirogronianu, a więc i na szybkość syntezy acetylo-CoA, drugiego substratu niezbędnego do syntezy acetylocholicy.

IV. Synteza reszty acetylowej acetylocholin

IV-1. Wewnątrzmitochondrialna synteza acetylo-CoA

Głównym substratem energetycznym mózgu dorosłych zwierząt jest glukoza (73), która za pośrednictwem pirogronianu, stanowi również podstawowy prekursor reszt acetylowych do syntezy acetylocholin.

Maksymalna szybkość syntezy acetylocholin w skrawkach kory mózgu oraz prążkowiu szczura wynosi odpowiednio 0,14 i 0,6 $\mu\text{mola/godz/g}$ tkanki, co stanowi 5% maksymalnej aktywności acetylotransferazy cholinowej w tych częściach mózgu (64, 74—76). Sugeruje to, że etap ograniczający syntezę acetylocholin może znajdować się między powstającym wewnątrz komórki pirogronianem a acetylo-CoA występującym w synaptoplazmie. Dotychczasowe badania wykazują bowiem, że szybkość biosyntezy acetylocholin jest 100—200 razy mniejsza od szybkości zużycia glukozy lub pirogronianu przez mózg (74). Pomimo tak znacznej różnicy w szybkościach tych procesów na korzyść układu wytwarzającego acetylo-CoA, istnieje ścisła zależność między szybkością utleniania pirogronianu a szybkością biosyntezy acetylocholin. Gibson i wsp. (77) wykazali, że inhibitory dehydrogenazy pirogronianowej (EC 1.2.4.1) takie jak 2-ketomaślan, 3-bromopirogronian, czy też barbiturany, w podobnym stopniu hamują utlenianie pirogronianu oraz biosyntezę acetylocholin w mózgu (75, 78).

Analogiczne zjawisko obserwuje się w hipoksji lub po podaniu trójperidolu (78), jak również w doświadczalnych stanach niedoboru tiaminy

Tabela 2.

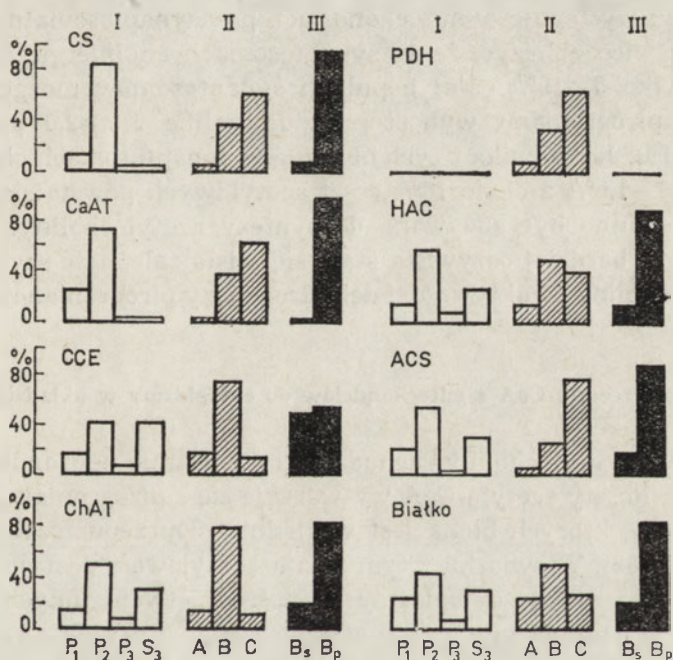
Wpływ inhibitorów dehydrogenazy pirogronianowej i dehydrogenazy oksoglutaranowej na szybkość syntezy ACh z pirogronianu (75—77).

Inhibitor	Stężenie	Aktywność dehydrogenazy pirogronianowej	Aktywność dehydrogenazy 2-oksoglutaranowej	Szybkość syntezy acetylocholin
	mM	%	%	%
3—bromopirogronian	0,5	16	—	16
amobarbital	1,0	26	—	19
2—oksomaślan	20,0	20	—	26
trójperidol ^{*)}	0,2	70	—	20
2—oksoizowalerianian	2,0	99	23	64
Mieszanina oksokwasów o rozgałęzionym łańcuchu	2,0	83	56	54

^{*)} 1-3-4-fluorobenzoiło propylo -4-3-trójfluorometylofenylo-piperydino-4-ol
Aktywność enzymów, lub szybkość syntezy ACh w nieobecności inhibitorów przyjęto za 100%.

u zwierząt, które prowadzą do spadku aktywności dehydrogenazy pirogronianowej (79, 80). Genetycznie uwarunkowanym stanom jej niedoboru u ludzi towarzyszą objawy neurologiczne, które mogą mieć związek z zaburzeniami syntezy acetylocholin (81). Z drugiej jednak strony ketoanalogi aminokwasów o rozgałęzionym łańcuchu węglowym, w stężeniach, które nie powodują inhibicji dehydrogenazy pirogronianowej, hamują syntezę acetylocholin w około 40% (76) (Tabela 2). Wspomniane związki są znanymi inhibitorami dehydrogenazy oksoglutaranowej (EC 1.2.4.2) (82). Świadczy to o tym, że do zapewnienia odpowiedniej szybkości dostarczania reszt acetylowych do syntezy acetylocholin w cytoplazmie potrzebne jest nie tylko prawidłowe wytwarzanie acetylo-CoA z pirogronianu w mitochondriach, ale również synteza jego akceptora.

Omówioną wyżej ścisłą zależność syntezy acetylocholin od przemiany



Ryc. 2. Subkomórkowe rozmieszczenie enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu szczura.

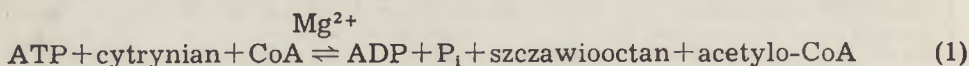
Zawartość enzymu w pojedynczej frakcji wyrażono jako procent sumy aktywności we frakcjach. Oznaczenia frakcji subkomórkowych wg Whitakera (11) z małymi modyfikacjami (109, 117):

- I — Frakcje pierwszorzędowe: P₁, frakcja jąder komórkowych i strzępów tkanki; P₂, frakcja surowych mitochondriów; P₃, frakcja mikrosomalna; S₃, frakcja cytoplazmatyczna (glejocyty i ciała neurocytów).
- II — Frakcje drugorzędowe (rozdziół frakcji P₂): A, frakcja mielinowa; B, frakcja synaptosomalna; C, frakcja mitochondriów całego mózgu.
- III — Frakcje trzeciorzędowe (rozdziół frakcji B): B_p, frakcja cytoplazmatyczna synaptosomów; B_p, frakcja elementów upostaciowanych synaptosomów.
- Pozostałe skróty: CS, syntaza cytrynianowa; CaAT, acetylotransferaza karnitynowa; HAC, hydrolaza acetylo-CoA CCE, liaza ATP-cytrynianowa; ACS, syntetaza acetylo-CoA; ChAT, acetylotransferaza cholinowa.

pirogronianu można wyjaśnić następująco. Dekarboksylacja oksydacyjna pirogromianu zachodzi we wszystkich typach komórek mózgu, a synteza acetylocholinoi głównie w obrębie synaptosomów cholinergicznyc. 1 g mózgu szczura zużywa w ciągu godziny około 30 μ moli glukozy (73, 83, 84). Z tej ilości około 10% metabolizuje się w cyklu pentozowym (73), a z pozostałej części wytwarza się około 50 μ moli pirogromianu. Większość pirogromianu ulega w mitochondriach dekarboksylacji do acetylo-CoA, a tylko niewielka część metabolizuje się do mleczanu, alaniny lub szczawiooctanu. Zużycie pirogromianu w różnych kompartmentach mózgu jest proporcjonalne do aktywności znajdującej się w nich dehydrogenazy pirogromianowej (10, 85) (Ryc. 2). Ponieważ w mitochondriach wewnątrzsynaptosomalnych znajduje się tylko 30% całkowitej aktywności dehydrogenazy pirogromianowej mózgu, dlatego to jedynie 15—20 μ moli pirogromianu może ulegać dekarboksylacji w synaptosomach (Ryc. 2). 70% aktywności enzymu w mózgu występuje w mitochondriach pozasynaptosomalnych (10, 12, 88). Można więc obliczyć, że w synaptosomach cholinergicznyc, które stanowią tylko 5—10% całej populacji synaptosomów mózgu, szybkość przemiany pirogromianu wynosi przypuszczalnie 1,5—2,0 μ moli/godz/g tkanki (14, 15). Jak wynika z tych obliczeń w synaptosomach cholinergicznyc nie 0,5—1,0% a około 10% reszt acetylowyc powstających z pirogromianu powinno być zużywane do syntezy acetylocholinoi. W świetle takiego ujęcia bardziej oczywista staje się ścisła zależność szybkości syntezy acetylocholinoi od aktywności dehydrogenazy pirogromianowej (78, 78).

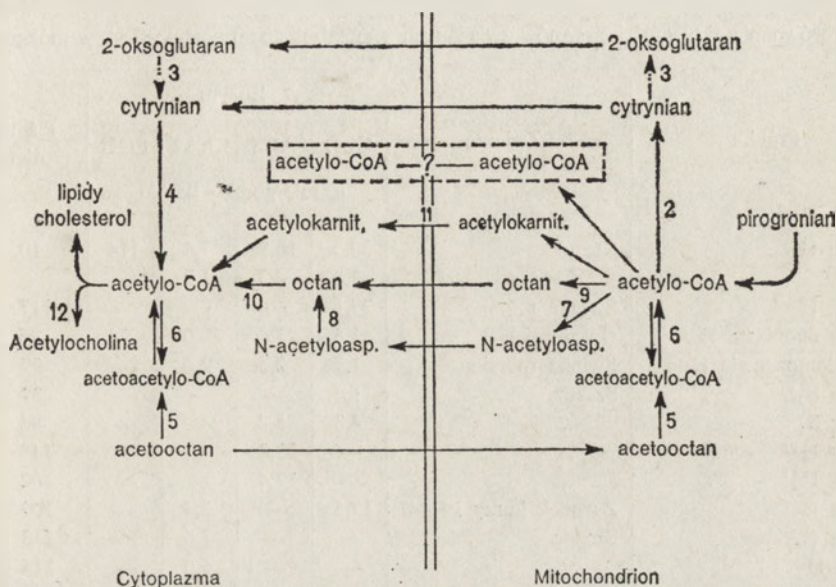
IV-2. Transport acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy w układzie nerwowym

Biosynteza acetylocholinoi zachodzi w cytoplazmie neuronów cholinergicznyc (1). Reszty acetylo-CoA wytwarzają się z pirogromianu wewnątrz mitochondriów, których błona jest względnie nieprzepuszczalna dla acetylo-CoA (87, 88). W związku z tym reszta acetylowa z acetylo-CoA musi być transportowana do cytoplazmy za pośrednictwem innych metabolitów, które w cytoplazmie mogą zregenerować acetylo-CoA. Rycina 3 przedstawia potencjalne możliwości transportu reszt acetylowyc przez błonę mitochondrialną. Jedną z możliwych dróg jest przemiana acetylo-CoA do cytrynianu w reakcji katalizowanej przez syntazę cytrynianową (EC 4.1.3.7), a następnie transport cytrynianu do cytoplazmy, gdzie dzięki działaniu liazy cytrynianowej (EC 4.1.3.8) odtwarza się acetylo-CoA:



Cytrynian w mitochondriach jest również metabolizowany do 2-oksoglutaranu i glutaminianu, które po przejściu do cytoplazmy mogą ponownie przechodzić w cytrynian (89). Inna możliwość to hydroliza acetylo-CoA

wewnątrz mitochondriów przy udziale hydrolazy acetylo-CoA (EC 3.1.2.1) i transport powstałego octanu do cytoplazmy. W cytoplazmie w reakcji katalizowanej przez syntetazę acetylo-CoA (EC 6.2.1.1) odtwarza się acetylo-CoA (87). Transport reszty acetylowej pochodzącej z acetylo-CoA może zachodzić również w postaci N-acetyloasparagianu (patrz reakcja 7, 8 Ryc. 3) (90). Trzecia możliwość wreszcie to transport za pośrednictwem acetylokarnityny poprzez reakcję katalizowaną przez znajdującą się w błonie mitochondriów, acetylotransferazę karnitynową (EC 2.3.1.7) (91, 92).



Ryc. 3. Drogi transportu pośredniego reszt acetylowych z acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy w mózgu.

Poszczególne reakcje enzymatyczne oznaczono numerami: 1. dehydrogenaza pirogronianowa (EC 1.2.4.1., oksydoreduktaza pirogronian:liponian, acetylująca akceptor); 2. syntaza cytrynianowa (EC 4.1.3.7., szczawiooctano-liaza cytrynianu($\text{pro-3S-CH}_2\text{COO} \rightarrow \text{acetylo-CoA}$)); 3. hydrataza akonitanowa (EC 4.2.1.3., hydro-liaza cytrynianu); dehydrogenaza izocytrynianowa (EC 1.1.1.41., oksydoreduktaza treo- D_5 -izocytrynian:NAD(dekarboksylująca); dehydrogenaza izocytrynianowa (NADP) (EC 1.1.1.42., oksydoreduktaza treo- D_5 -izocytrynian:NADP(dekarboksylująca)); 4. liaza cytrynianowa (EC 4.1.3.8., szczawiooctano-liaza ATP:cytrynian($\text{pro-3S-CH}_2\text{COO} \rightarrow \text{acetylo-CoA}$, defosforylująca ATP)); 5. syntetaza acetoacetylo-CoA lub CoA-transferaza 3-ketokwasów (EC 2.8.3.5., CoA-transferaza sukcylo-CoA:3-oksokwas); 6. tiolaza acetoacetylo-CoA (EC 2.3.1.9., C-Acetylotransferaza acetylo-CoA:acetylo-CoA); 7. N-acetylotransferaza asparaginianowa (EC 2.3.1.a., N-acetylotransferaza acetylo-CoA:L-asparagianin); 8. aminohydrolaza N-acyloasparagianinu (EC 3.5.1.15.; 9. hydrolaza acetylo-CoA (EC 3.1.2.1.); 10. syntetaza acetylo-CoA (EC 6.2.1.1., ligaza octan:CoA(AMP)); 11. acetylotransferaza karnitynowa (EC 2.3.1.7., O-acetylotransferaza acetylo-CoA:karnityna); 12. acetylotransferaza cholinowa (EC 2.3.1.6., O-Acetylotransferaza acetylo-CoA:cholina).

W mózgu zwierząt młodych oprócz glukozy źródłem szkieletów węglowych są również ciała ketonowe (83, 93). Acetylo-CoA z acetoctanu może powstawać zarówno wewnątrz mitochondriów, jak i w cytoplazmie w reakcjach katalizowanych przez CoA-transferazę 3-ketokwasów (EC 2.8.3.5)

lub syntetazę acetoacetylo-CoA (patrz reakcja 5, Ryc. 3). Powstały acetoacetylo-CoA rozkłada się w reakcji katalizowanej przez tiolazę acetoacetylo-CoA (EC 2.3.1.9) (94, 95, 96).

Drogi transportu acetylo-CoA zużywanego do syntezy acetylocholin w mózgu są jednak nadal przedmiotem dyskusji. Według danych Tućka (86, 97) aktywności liazy cytrynianowej i syntetazy acetylo-CoA w mózгах zwierząt różnych gatunków są wielokrotnie niższe od aktywności acetylotransferazy cholinowej (Tabela 3).

Tabela 3

Porównanie aktywności enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu.

Próbka	Zwierzę	Enzym				Piśmien- nictwo
		CCE	ACS	ChAT	PDH	
		μmole/godz/g tkanki				
Mózg H	Szczur	30,5	18,9	7,4	114	10, 117
S ₃		9,8	4,3	1,9	—	
Mózg H	Świnka morska	27,1	—	—	—	117
Jądro ogoniaste H	Owca	1,8	1,4	24,0	28	86, 97
Przodomózgowie H	Świnka morska	1,7	2,5	9,6	—	97
Mózg S ₃ ^{*)}	Szczur	1,6	—	—	—	89
Mózg S ₃	„	4,8	5,2	—	—	94
Mózg H ^{*)}	„	—	27,2	—	—	148
Mózg H ^{*)}	„	—	17,4	—	—	102
Mózg H ^{*)}	Zarodek kurzy 19 dni	17,5	—	2,4	—	109
Mózg H	Szczur	—	—	7,5	—	113
Kora H	„	—	—	6,0	—	114
Kora H	„	—	—	—	150	80
Mózg H*	„	—	—	—	135	149

Użyte skróty: CCE, liaza ATP-cytrynianowa; ACS, syntetaza acetylo-CoA; ChAT, acetylotransferaza cholinowa; PDH dehydrogenaza pirogronianowa.

H, homogenat; S₃, frakcja cytoplazmatyczna 100 000xg (60 min).

*) Preparat uzyskany przez homogenizację całego mózgu (razem z mózdzkiem).

W takim jednak przypadku, szybkość syntezy acetylo-CoA w cytoplazmie byłaby mniejsza niż szybkość tworzenia się acetylocholin w mózgu. Wykazano również (92, 98), że wstrzyknięte do komór mózgu szczura, znakowane węglem ¹⁴C, glukoza, pirogronian lub mleczan bardzo łatwo wbudowują się do acetylocholin, co przedstawia się wysoką radioaktywnością specyficzną reszty acetylowej acetylocholin. Zużycie acetoctanu, octanu i cytrynianu do syntezy reszty acetylowej acetylocholin jest natomiast od kilku do kilkudziesięciu razy niższe (92, 98). Wymienione związki nie hamują również syntezy acetylocholin z radioaktywnego pirogronianu lub glukozy. Podobne wyniki uzyskano inkubując *in vitro* skrawki mózgu szczura (99). Dane te są zgodne ze stwierdzoną wcześniej niską aktyw-

nością liazy cytrynianowej i syntetazy acetylo-CoA w mózgu (86, 97). W świetle tych badań droga transportu reszt acetylo-CoA do syntezy acetylocholinyl pozostaje niewyjaśniona. Jak dotychczas, nie wykazano żadnej innej alternatywnej drogi transportu. Stwierdzono jednak, że pirogronian i glukoza stosunkowo łatwo wbudowują się do cytrynianu. Doświadczenia te nie pozwalają jednak wykluczyć udziału cytrynianu powstającego w komórce w transporcie reszt acetylowych do syntezy acetylocholinyl (92, 99). Różnice, między wbudowywaniem się jednostek dwuwęglowych, pochodzących z glukozy i cytrynianu do acetylocholinyl, mogą wynikać z odmiennej penetracji obu metabolitów przez błony różnych komórek mózgu (100). Błona plazmatyczna synaptosomów posiada układ transportu o wysokim powinowactwie do glukozy (100). Jak dotychczas nie wykazano transportu cytrynianu przez błonę synaptosomów (101). Słabe wbudowywanie się octanu do acetylocholinyl może wynikać z faktu, że syntetaza acetylo-CoA w mózgu szczura znajduje się poza synaptoplazmą (97, 102) (Ryc. 2), (Tabela 4).

Tabela 4

Względne aktywności specyficzne liazy cytrynianowej, syntetazy acetylo-CoA, acetylotransferazy cholinowej i dehydrogenazy mleczanowej we frakcjach rozpuszczalnych z mózgow zwierząt różnych gatunków (*97, 117, 150).

Enzym	Szczur		Świnka morska		Zarodek kurzy	
	S ₃	B ₃	S ₃	B ₃	S ₃	B ₃
Liaza ATP-cytrynianowa	1,50	2,43	2,72	4,21	0,97	1,97
Acetylotransferaza cholinowa	1,09	0,96	2,48	5,91	1,06	2,50
Syntetaza acetylo-CoA	0,89	0,25	1,05	1,20*	—	—
Dehydrogenaza mleczanowa	2,26	2,66	4,32	5,75	1,55	1,65

S₃ frakcja cytoplazmatyczna 100 000xg B₃, frakcja cytoplazmatyczna synaptosomów.

Octan nie wykazuje również zdolności wiązania się z synaptosomami (103). Sollenberg i Sörbo (104), z kolei, wykazali, że radioaktywny węgiel ⁶14C-glukozy znacznie łatwiej wbudowuje się do reszty acetylowej acetylocholinyl niż tryt z ⁶3H-glukozy. Wskazuje to na wewnątrzmitochondrialną przemianę acetylo-CoA do cytrynianu powodującą utratę ³H przed wbudowaniem do acetylocholinyl.

Wykazano, że w nerwach ruchowych odnoży homara i narządzie elektrycznym Torpedo reszty acetylowe acetylocholinyl pochodzą głównie z octanu, którego aktywacja zachodzi w cytoplazmie dzięki wysokiej aktywności cytoplazmatycznej syntetazy acetylo-CoA (105—108). Synteza acetylocholinyl z cytrynianu i pirogronianu jest w tych tkankach o rząd

wielkości niższa niż octanu. Mimo to synteza acetylocholin z cytrynianu jest tam dużo wydajniejsza niż w mózgu ssaków, co wskazuje na obecność liazy cytrynianowej.

IV-3. Aktywność enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu

Wykonane w ostatnich latach przez Szutowicza i wsp. (10, 109—111) i przez Reijnierse i wsp. (102) badania wskazują, że aktywności liazy cytrynianowej i syntetazy acetylo-CoA w mózгах zwierząt różnych gatunków są wielokrotnie wyższe niż to sądzono poprzednio (Tabela 3, 5). Można zatem przypuszczać, że aktywność omawianych enzymów nie ogranicza podaży acetylo-CoA do syntezy acetylocholin. Niskie wartości aktywności tych enzymów podawane we wcześniejszych pracach mogą wynikać ze stosowania metodyki oznaczania, która nie zapewniała całkowitego pomiaru powstających produktów reakcji (112).

Synaptosomy cholinergiczne zużywają znaczną część reszt acetylowych do syntezy acetylocholin (Rozdz. IV-1), powinny zatem posiadać wydajny mechanizm transportu acetylo-CoA do cytoplazmy. Mózdzek zawiera znikomą ilość elementów cholinergicznych (57, 64), dlatego też aktywność acetylotransferazy cholinowej oraz stężenie acetylocholin są w nim 5—10 razy niższe niż w innych częściach mózgu (2, 64, 75, 113—115), (Tabela 5). Podobnych różnic można by się spodziewać w aktywnościach enzymów syntetyzujących acetylo-CoA. Aktywności dehydrogenazy pirogronianowej,

Tabela 5.

Aktywności enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w różnych częściach mózgu szczura (117).

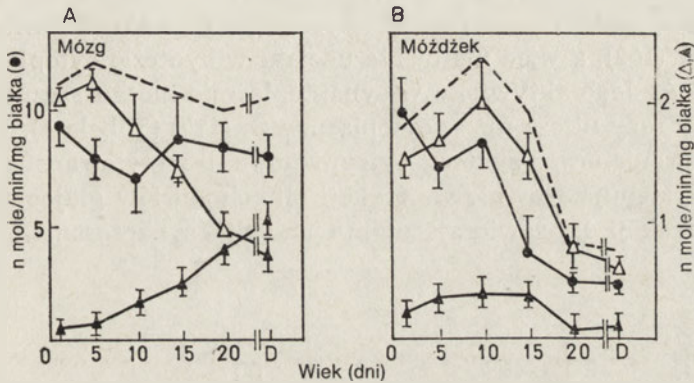
Enzym	Prądkowie	Półkule	Mózdzek
	nmole/min/mg białka		
Dehydrogenaza pirogronianowa	19,8 ± 1,1	18,0 ± 1,6	15,8 ± 2,5
Syntaza cytrynianowa	423 ± 47	500 ± 30	474 ± 49
Hydrolaza acetylo-CoA	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Acetylotransferaza karnitynowa	14,0 ± 1,8	16,9 ± 1,4	16,2 ± 1,2
Liaza cytrynianowa	6,1 ± 0,3*	5,6 ± 0,3*	1,6 ± 0,5
Syntetaza acetylo-CoA	3,8 ± 0,8	3,3 ± 0,2	3,5 ± 0,5
Acetylotransferaza cholinowa	2,7 ± 0,2*	1,1 ± 0,1*	0,2 ± 0,02

Liczby są wartościami średnimi z 3—15 doświadczeń ± błąd standardowy średniej. Podobne wartości dla dehydrogenazy pirogronianowej i acetylotransferazy cholinowej podano w pracach: 80, 113.

*Różnica istotna statystycznie pomiędzy aktywnościami enzymu acetylotransferazy cholinowej w prądkowie i półkulach mózgu a aktywnością enzymu w mózdku.

syntazy cytrynianowej, syntetazy acetylo-CoA i acetylotransferazy karnitynowej w mózdzku są jednak podobne jak w innych częściach mózgu (Tabela 5). Jedynie aktywność liazy cytrynianowej w mózdzku jest około 4 razy niższa niż w prądkowiu i półkulach mózgu (Tabela 5). Świadczy to o szczególnej roli tego enzymu w neuronach cholinergicznych.

Należy jednak pamiętać, że liaza cytrynianowa dostarcza reszty acetylowe z cytrynianu również do syntezy kwasów tłuszczowych (89). Szybkość syntezy kwasów tłuszczowych i aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych podczas dojrzewania mózgu maleją w znacznym stopniu w związku z zakończeniem procesu mielinizacji (89, 117—119) (Ryc. 4). W tym



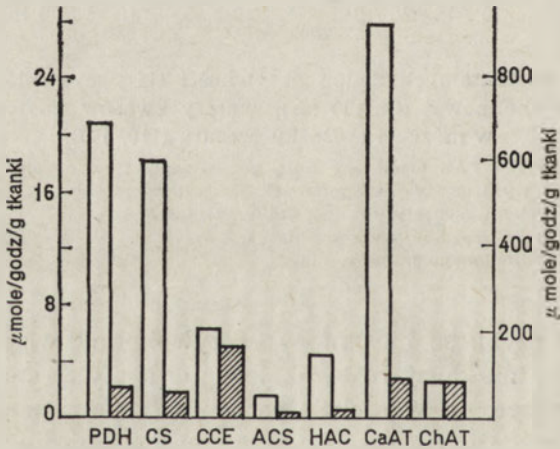
Ryc. 4. Przebieg postnatalnych zmian aktywności liazy cytrynianowej (CCE) (●), acetylotransferazy cholinowej (ChAT) (▲), syntezy kwasów tłuszczowych (FAS) (Δ) w mózgu i mózdzku szczura (110, 177).

Suma aktywności ChAT i FAS oznaczona linią przerywaną. Inne skróty: D, szczury dorosłe. Aktywności enzymów wyrażono w następujących jednostkach: CCE, nmole szczawiooctanu zsyntetyzowanego /min/mg białka, ChAT, nmole ACh zsyntetyzowanej /min/mg białka, FAS, nmole NADPH utlenionego /min/mg białka.

samym okresie szybkość biosyntezy acetylocholin wzrasta kilkanaście razy, proporcjonalnie do wzrostu aktywności acetylotransferazy cholinowej (120—123) (Ryc. 4). W efekcie całkowite zapotrzebowanie na reszty acetylowe w rozwijającym się mózgu zmienia się nieznacznie czemu odpowiada stała w tym okresie aktywność liazy cytrynianowej (Ryc. 4). W rozwijającym się mózdzku aktywność acetylotransferazy utrzymuje się na stałym, niskim poziomie (117, 124). Natomiast aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych spada podobnie jak w mózgu tj. o około 70%. Można więc przyjąć, że zapotrzebowanie tej części mózgowia na reszty acetylo-CoA zależy jedynie od zmian szybkości syntezy lipidów. Aktywność liazy cytrynianowej w mózdzku obniża się w tym czasie o około 70% równoległe ze zmianami aktywności syntetazy kwasów tłuszczowych (Ryc. 4). Stąd też różnice w przebiegu zmian aktywności liazy w dojrzewającym

mózdzku i mózgu można przypisywać różnicom w rozwoju neuronów cholinergicznycch w obu tych częściach mózgowia.

Występowanie liazy cytrynianowej i acetylotransferazy cholinowej we frakcjach subkomórkowych mózgu są podobne (97, 110, 117) (Ryc. 2), (Tabela 4). Po rozdziale frakcji surowych mitochondriów, przez wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy, ponad 70% aktywności obu enzymów stwierdzono we frakcji synaptosomalnej (B) (Ryc. 2). Względna aktywność specyficzna liazy w synaptoplazmie (B_s) jest około dwukrotnie wyższa niż w cytoplazmie pochodzącej z komórek glejowych i perikarionów neurocytów (S_s) (97, 109, 117) (Tabela 4). Fakt ten wskazuje na istotną rolę liazy cytrynianowej w biosyntezie acetylo-CoA potrzebnego do synaptosomalnej biosyntezy acetylocholin. Drugi enzym związany z biosyntezą acetylo-CoA, syntetaza acetylo-CoA występuje głównie w mitochondriach glejocytów (102), a więc nie bierze udziału w syntezie cytoplazmatycznej acetylo-CoA. Jego aktywność w synaptoplazmie mózgu szczura jest przy tym cztery razy niższa niż w cytoplazmie S_s (117) (Tabela 4). Dehydrogenaza pirogronianowa, synteza cytrynianowa i acetylotransferaza karnitynowa występują głównie we frakcji mitochondriów glejocytarnych (C) oraz we frakcji B_p zawierającej mitochondria synaptosomalne (Ryc. 2), (97, 117).



Ryc. 5. Porównanie aktywności enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA we frakcji synaptosomalnej (B) z aktywnościami obliczonymi dla synaptosomów cholinergicznycch.

Kolumny puste, całkowita aktywność enzymów we frakcji synaptosomalnej (B); kolumny zakreskowane, obliczona aktywność enzymów w synaptosomach cholinergicznycch (110, 117). Skróty jak dla rys. 4 i tab. 3. Aktywność syntazy cytrynianonowej oznaczono po stronie prawej wykresu. Aktywność pozostałych enzymów podano po lewej stronie wykresu. Aktywności enzymów wyrażono w następujących jednostkach: PDH, (μmole NAD zredukowanego /godz/g tkanki; CS, (μmole CoA powstającego /godz/g tkanki; CCE, (μmole szczawiooctanu zsyntetyzowanego /godz/g tkanki; HAC, (μmole CoA powstającego /godz/g tkanki; ACS, μmole acetylo-CoA zsyntetyzowanego /godz/g tkanki; CaAT, (μmole CoA powstającego /godz/g tkanki; ChAT, (μmole zsyntetyzowanej ACh /godz/g tkanki.

Całkowita aktywność liazy cytrynianowej we frakcji zakończeń nerwowych jest ponad dwukrotnie wyższa od aktywności acetylotransferazy cholinowej i ponad pięciokrotnie od aktywności syntetazy acetylo-CoA (Ryc. 5). Wysoka aktywność syntazy cytrynianowej pozwala przypuszczać, że przy prawidłowej podaży szczawiooctanu w mózgu *in vivo*, wewnątrzmitochondrialny acetylo-CoA ulega przemianie głównie do cytrynianu (10, 116, 117, 125, 126) (Ryc. 5).

Należy jednak pamiętać, że tylko 10% frakcji zakończeń nerwowych stanowią synaptosomy cholinergiczne (14, 15), które zawierają całą aktywność acetylotransferazy cholinowej a tylko część aktywności innych enzymów, związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu. Synteza acetylocholin zależy od aktywności enzymów występujących w synaptosomach cholinergicznych. W przypadku liazy cytrynianowej należy przyjąć, że 90% populacji synaptosomów mózgu, to synaptosomy niecholinergiczne, które mają aktywność liazy taką jak mózdzek (117) (Tabela 5). Można więc obliczyć, że tylko 20% aktywności liazy cytrynianowej występuje w synaptosomach niecholinergicznych, a pozostałe 80% w cholinergicznych (Ryc. 5) (117). Aktywności innych enzymów związanych z metabolizmem acetylo-CoA w mózgu i mózdzku są podobne (Tabela 5). Można więc przyjąć, że tylko 10% ich aktywności całkowitej we frakcji zakończeń nerwowych występuje w synaptosomach cholinergicznych (Ryc. 5).

IV-4. Rola liazy cytrynianowej w transporcie acetylo-CoA z mitochondriów do cytoplazmy

Z poprzedniego rozdziału wynika, że aktywność liazy cytrynianowej nie stanowi czynnika ograniczającego szybkość syntezy acetylocholin, tym bardziej, że mitochondria synaptosomalne mogą syntetyzować i transportować do synaptoplazmy odpowiednią ilość cytrynianu (10). W takim razie zahamowanie aktywności liazy cytrynianowej powinno zwiększać, a jej aktywacja zmniejszać szybkość akumulacji cytrynianu przez synaptosomy metabolizujące pirogronian. Wykazano, że aktywacja liazy po podaniu $MgATP^{2-}$ powoduje znaczny (80%) spadek szybkości gromadzenia cytrynianu. W tych warunkach dodanie (—)hydroksycytrynianu, który jest wysoce specyficznym inhibitorem liazy (10, 127), powoduje kilkakrotny wzrost akumulacji cytrynianu (Tabela 6).

Podobne zjawisko obserwuje się gdy substratem jest glukoza (117). Mitochondria całego mózgu, zawierającego śladowe ilości liazy cytrynianowej, nie reagują zmianą szybkości gromadzenia się cytrynianu na dodanie tych efektorów (10, 117) (Tabela 6). Wyniki tych doświadczeń wskazują, że liaza cytrynianowa spełnia istotną rolę w metabolizmie cytrynianu będącego produktem przemiany pirogronianu w mitochondriach synaptosomalnych.

Całkowita aktywność liazy cytrynianowej w synaptosomach cholinerg-

gicznych (5,1 $\mu\text{moli/godz/g}$ tkanki) (Ryc. 5) jest około 30 razy wyższa od maksymalnej szybkości syntezy acetylocholin z pirogronianu (19, 77). Różnica szybkości akumulacji cytrynianu między stanami inhibicji i aktywacji liazy wynosi 1,7 $\mu\text{mola/godz/g}$ tkanki (porównaj tabelę 6) i może być miarą wydajności przemiany pirogronianu do synaptoplazmatycznego

Tabela 6.

Wpływ (—)hydroksycytrynianu na syntezę cytrynianu przez synaptosomy i mitochondria mózgu szczura (10, 117).

Frakcja Substraty*	MgCl ₂ ATP	(—)Hydroksy- cytrynian	Zużycie tlenu	Synteza cytrynianu
	(5 mM)	(1 mM)	$\mu\text{gat/min/}$ mg białka	$\mu\text{mole/min/}$ mg białka
Synaptosomy Pirogronian + Jabłczan	—	—	36 ± 3	2,5 ± 0,3
	—	+	42 ± 2	3,0 ± 0,2
	+	—	38 ± 3	0,6 ± 0,06 ⁺
	+	+	43 ± 4	2,0 ± 0,3 ⁺⁺
Synaptosomy Glukoza + Jabłczan	—	—	21 ± 2	0,3 ± 0,05
	—	+	25 ± 3	0,9 ± 0,20 ⁺
	+	—	39 ± 7	0,1 ± 0,03
	+	+	43 ± 7	0,7 ± 0,05 ⁺⁺
Mitochondria Pirogronian + Jabłczan	—	—	35 ± 3	9,1 ± 1,1
	—	+	34 ± 9	9,1 ± 0,6
	+	—	173 ± 13	7,5 ± 0,5
	+	+	161 ± 22	8,7 ± 0,4

Wyniki są wartościami średnimi z 3—9 doświadczeń ± standardowy błąd średniej.

* Substraty dodawano w stężeniach 2,5 mM.

⁺ Różnica istotna statystycznie w porównaniu z wartością kontrolną.

⁺⁺ Różnica istotna statystycznie w porównaniu z wartością uzyskaną w obecności MgCl₂ i ATP.

acetylo-CoA za pośrednictwem tego metabolitu. Można więc obliczyć, że maksymalna wydajność tej drogi metabolicznej w synaptosomach cholinergicznych wynosi 0,17 $\mu\text{mola/godz/g}$ tkanki. Jest to wartość zbliżona do maksymalnej szybkości syntezy acetylocholin w synaptosomach lub rozdrobionym mózgu (19, 75, 77), dlatego też etapem ograniczającym szybkość syntezy acetylo-CoA w cytoplazmie przez liazę cytrynianową jest prawdopodobnie transport cytrynianu przez błonę mitochondriów synaptycznych. Nie wyklucza to udziału innych metabolitów w transporcie reszty acetylowej acetylocholin. Wykazano bowiem, że całkowite zahamowanie aktywności liazy przez (—)hydroksycytrynian (10, 127) powoduje tylko 40% spadek syntezy acetylocholin (dane nieopublikowane). Można

przypuszczać, że część reszt acetylowych może być transportowana za pośrednictwem acetylokarnityny (128) lub też niezidentyfikowanego metabolitu drobnocząsteczkowego, którego synteza i transport wymagają obecności synaptoplazmy i jonów wapniowych (112).

Transport jednego mola acetylo-CoA za pośrednictwem cytrynianu powoduje rozkład jednego mola ATP w reakcji katalizowanej przez liazę cytrynianową. Synaptosomy cholinergiczne zużywają około 10% tlenu zużywanego przez całą frakcję synaptosomalną (4 ngat/min/mg białka) i syntetyzują około 12 nmoli/min/mg białka wysokoenergetycznych wiązań ATP. Resynteza 0,14 nmoli/min/mg białka acetylo-CoA z cytrynianu (Tabela 6) zużywałaby więc zaledwie 1% ATP syntetyzowanego w synaptosomach cholinergicznych. Dlatego też wydaje się, że dostępność ATP nie jest czynnikiem regulującym szybkość syntezy reszty acetylowej acetylocholin. Potwierdzają to dane wykazujące, że umiarkowana hipoksja, która nie powoduje zmian ładunku energetycznego układu adenyłowego, wywołuje spadek biosyntezy acetylocholin (78). Istnieje natomiast korelacja między stopniem zahamowania syntezy acetylocholin, a wzrostem stężenia mleczanu i spadkiem stosunku NAD/NADH w cytoplazmie (78).

V. Bioenergetyczne aspekty magazynowania i wydzielania acetylocholin

Istotną rolę w procesie magazynowania acetylocholin w pęcherzykach spełnia, jak się wydaje, specyficzne białko o charakterze kwaśnym, wesi-kulina, a także ATP tworzące z acetylocholiną kompleksy umożliwiające jej koncentrację do stężeń rzędu 100—1000 mM (24, 129, 130, 131). Dodanie ATP do środowiska inkubacyjnego zwiększa amplitudę wyładowań narządu elektrycznego Torpedo (41, 65), dostarczając energii do akumulacji acetylocholin w pęcherzykach (132). Z kolei rozkojarzenie fosforylacji oksydacyjnej za pomocą dwunitrofenolu powoduje spadek ilości pęcherzyków i acetylocholin. Israëł (133) wykazał, że oscylacyjne zmiany stężenia acetylocholin w narządzie elektrycznym Torpedo wiążą się z jednoczesnymi i jednokierunkowymi zmianami stężenia ATP. Stosunek stężeń acetylocholin i ATP w pęcherzykach synaptycznych z niedrażnionego narządu elektrycznego wynosi 5:1, co w przybliżeniu równoważy przeciwstawne ładunki obu metabolitów (129, 134).

Enzymem katalizującym rozkład ATP, a co za tym idzie prawdopodobnie inicjującym proces wydzielania acetylocholin, może być specyficzna, aktywowana przez acetylocholinę ATP-aza pęcherzyków synaptycznych wymagająca obecności jonów Mg^{2+} (135, 136). Leki o działaniu przeciwdrgawkowym hamują aktywność tego enzymu nie wpływając na zależną od jonów Mg^{2+} ATP-azową aktywność mitochondriów i błon plazmatycznych (135). ATP jednak nie rozkłada się podczas wydzielania acetylocho-

liny z pęcherzyków (137). Sugeruje to, że ATP-aza dostarcza energii niezbędnej do magazynowania i utrzymania gradientu stężeń acetylocholin, a nie do jej wydzielania z pęcherzyków (136).

Inną rolę w wydzielaniu acetylocholin zdaje się spełniać $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP-aza występująca w błonie presynaptycznej synaptosomów (138). Zahamowanie jej aktywności przez zwiększenie stężenia jonów potasowych, lub ouabainę, N-etylomaleimid, p-chloromerkuobenzoesan itp. powoduje wzrost wydzielania acetylocholin (139, 140). Do stymulacji wydzielania acetylocholin przez te inhibitory nie jest konieczna obecność jonów wapnia w środowisku, będącego fizjologicznym inhibitorem $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP-azy (140). Wskazuje to, że czynnikiem istotnym w wydzielaniu acetylocholin jest spadek aktywności ATP-azy, a nie sposób w jaki został on wywołany (140). Stymulacja $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP-azy, czy to przez ATP, czy też aminy katecholowe powoduje, z kolei, zahamowanie wydzielania acetylocholin przez synaptosomy (139, 141). Sugeruje to, że energia uzyskiwana z rozkładu ATP jest niezbędna do utrzymania różnicy stężeń acetylocholin między wnętrzem synaptosomu a szczeliną synaptyczną. Niektóre z leków przeciwdrgawkowych hamują aktywność $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP-azy. Równocześnie jednak obserwuje się spadek wydzielania acetylocholin zamiast oczekiwanego wzrostu. Paradoks ten można wytłumaczyć jednoczesnym hamowaniem aktywności zależnej od jonów Mg^{2+} ATP-azy pęcherzykowej przez te związki (135).

Intensywne drażnienie bodźcami elektrycznymi powoduje spadek ilości pęcherzyków, zawartości acetylocholin i ATP w narządzie elektrycznym Torpedo (142). Z drugiej jednak strony w okresie powrotu do równowagi wzrost ilości pęcherzyków i zawartości acetylocholin zachodzi znacznie szybciej niż wzrost stężenia ATP (143). Stosunek acetylocholin do ATP w pęcherzykach izolowanych w tym okresie wynosi 9:1. Ten względny niedobór ATP w nowo utworzonych pęcherzykach próbuje się tłumaczyć jego zużyciem w procesie akumulacji acetylocholin. Nie wiadomo jednak, czy do akumulacji acetylocholin potrzebne jest ATP wewnątrzpęcherzykowe czy też cytoplazmatyczne (65). Niska zawartość ATP w „młodych” pęcherzykach może tłumaczyć ich zwiększoną labilność i wrażliwość na bodźce. Wykazano bowiem, że wydzielona pod wpływem różnych bodźców acetylocholin ma radioaktywność specyficzną niemal równą radioaktywności specyficznej prekursora użytego do jej syntezy (19) i dużo wyższą od radioaktywności acetylocholin pozostającej w pęcherzykach synaptycznych (23, 144, 145). Z i m m e r m a n (146) wyizolował, z uprzednio drażnionego bodźcami elektrycznymi, narządu elektrycznego Torpedo, który inkubował w obecności metylo- ^3H -cholin, dwie pule pęcherzyków synaptycznych różniące się ciężarem właściwym, zdolnością do akumulacji dekstranu, oraz radioaktywnością specyficzną znajdującą się w nich acetylocholin. Badania w mikroskopie elektronowym zdają się wskazywać,

że w zakończeniach obwodowego układu nerwowego ssaków można również rozróżnić kilka klas pęcherzyków znajdujących się prawdopodobnie w różnych stanach czynnościowych (147).

VI. Podsumowanie

W metabolizmie acetylocholin w obrębie zakończeń neuronów cholinergicznych można wyróżnić szereg etapów takich jak: transport i synteza prekursorów acetylocholin, biosynteza, magazynowanie i wydzielanie acetylocholin. Bezspornym faktem jest ścisła zależność syntezy acetylocholin, a raczej niektórych jego etapów, od metabolizmu energetycznego tkanki mózgowej i synaptosomów.

Stosunkowo dobrze poznano układ transportu o wysokim powinowactwie do cholin, który występuje wyłącznie w synaptosomach cholinergicznych. Jednakże duża ostrożność jest wskazana przy interpretacji wyników badań nad pochodzeniem reszty acetylowej acetylocholin w mózgu ssaków, gdzie synaptosomy cholinergiczne stanowią niewielki procent zakończeń nerwowych. Metabolizm reszt acetylowych w różnych typach komórek mózgu przebiega bowiem identycznymi drogami jak w neuronach cholinergicznych. Ilościowa ocena jest więc możliwa jedynie na podstawie pośrednich podejść eksperymentalnych. Dobrym modelem doświadczalnym pomocnym w wyjaśnianiu tego zagadnienia mogą okazać się synaptosomy cholinergiczne narządu elektrycznego Torpedo mimo różnic jakościowych w porównaniu z synaptosomami mózgu zwierząt wyższych.

Autor serdecznie dziękuje Panu Prof. Stefanowi Angielskiemu, który swoim zainteresowaniem i zachętą przyczynił się do opracowania niniejszego referatu. Autor dziękuje również Panu Dr Andrzejowi Roszkiewiczowi za wykonanie zdjęć frakcji synaptosomalnej.

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Polskiej Akademii Nauk Nr 10.4.2.

Artykuł zaakceptowano do druku 29.9.1978.

PIŚMIENNICTWO

1. Fonnum F., (1975) w *Cholinergic Mechanisms* red. Waser P. G., str. 145—159, Raven Press, New York.
2. Dowdall M. J., (1976) w *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission*. red. Berl S., Clarke D. D., Schneider D., str. 585—607, Plenum Publishing Corporation, New York.
3. Wieraszkowski A., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 57—74.
4. Gray S. G., Whittaker V. P., (1962) *J. Physiol.*, **96**, 79—88.

5. De Robertis E., Pelegrino de Iraldi A., Rodriguez de Lores Arnaiz G., Salganicoff L., (1962), *J. Neurochem.*, **9**, 23—35.
6. Verity M. A., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 1305—1317.
7. Abdel-Latif A. A., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **121**, 403—406.
8. Tamir H., Rapport M. M., Rozin L., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 943—949.
9. Gurd J. W., Jones L. R., Mahler H. R., Moore W. J., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 281—290.
10. Szutowicz A., Łysiak W., Angielski S., (1977), *J. Neurochem.* **29**, 375—378.
11. Whittaker V. P., (1969) w *Handbook of Neurochemistry*, red. Lajtha A., t. 2, str. 327—364, Plenum Press, New York.
12. Clark J. B., Nicklas W. J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4724—4731.
13. Bradford H. P., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 675—684.
14. Snyder S. H., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1371—1374.
15. Kuhar M. J., Rommelspähler H., (1974), *Brain. Res.*, **77**, 85—96.
16. Fonnum F., (1968), *Biochem. J.*, **106**, 401—412.
17. Rodriguez de Lores Arnaiz G., De Robertis E., (1962), *J. Neurochem.*, **9**, 503—508.
18. Mc Govern S., Meguire M. E., Gurd R. S., Mahler H. R., Moore W. J., (1973), *FEBS Letters*, **31**, 193—198.
19. Guyenet P. G., Lefresne P., Beaujouan J. C., Glowinski J., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 137—144, Raven Press, New York.
20. Iversen L. L., Schon F. C., (1973) w *New Concepts in Neurotransmitter Regulation*, red. Mandell A. J., str. 153—193, Plenum Press, New York.
21. Whittaker V. P., Essman U. D., Dowe C. H. C., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 833—845.
22. Israël M., Manaranche R., Mastour-Frachon P., Morel N., (1976), *Biochem. J.*, **100**, 113—115.
23. Dowdall M. J., (1976), *Abstr. First Meet. Europ. Soc. Neurochem.*, Bath (England), str. 26.
24. Potter L. T., (1970) w *Handbook of Neurochemistry*, red. Lajtha A., t. 4, str. 263—284, Plenum Press, New York.
25. Hebb C., (1972), *Physiol. Rev.*, **52**, 918—956.
26. White H. I., Chen Wu J., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 297—307.
27. Kuczenski R., Segal B. S., Mandell A. J., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 39—45.
28. Stavinoha W. S., Weitraub S. T., (1974), *Science*, **183**, 964—965.
29. Reynolds S. F., Blass J. P., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 185—186.
30. Heinrich C. P., Stadler H., Weiser H., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 1273—1281.
31. Schuberth J., Sollenberg J., Sundwall A., Sörbo S., (1965), *J. Neurochem.*, **12**, 452—454.
32. Wurtman R., Fernstrom J. D., (1975), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1691—1696.
33. Sethy V. R., Roth H. H., Kuhar M. J., van Woert M. H., (1973), *Neuropharmacology*, **12**, 819—823.
34. Morris D., Maneckjee A., Hebb C., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 857—863.
35. Malthe-Sørensen D., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 861—865.
36. Stavinoha W. S., Weitraub S. T., Modak A. T., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 361—371.
37. Weitraub S. T., Modak A. T., Stavinoha W. S., (1976), *Brain Res.*, **105**, 179—183.

38. Richter J. A., Scheta P. A., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 1225—1230.
39. Molenaar P. C., Polak R. L., (1973), *Brain Res.*, **62**, 537—542.
40. Molenaar P. C., Polak R. L., Nickolson V. J., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 667—678.
41. Schmidt D. E., Speth R. C., Welsch F., Schmidt M. J., (1972), *Brain Res.*, **38**, 377—389.
42. White H. C., Cavallito C. J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 343—358.
43. Glover V. A. S., Potter L. T., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 571—580.
44. Pieklik J. R., Guynn R. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4445—4450.
45. Fonnum F., Frizell M., Sjøstrand J., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 1109—1120.
46. Oesch F., Thoenen H., (1973), *Nature*, **242**, 536—537.
47. Fonnum F., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1095—1100.
48. Kewitz H., Pleul O., Dross K., Schwartzkopff T., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 131—135, Raven Press, New York.
49. Kewitz H., Pleul O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1281—1285.
50. Katz H. S., Salehmoghaddam S., Collier B., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 569—579.
51. Kuhar M. J., Simon J. R., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 1135—1137.
52. Schuberth J., Jenden D. J., (1975), *Brain Res.*, **84**, 245—256.
53. Dross K., Kewitz H., (1972), *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 91—106.
54. Hanin I., Schuberth J., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 819—824.
55. Guyenet P. G., Lefresne P., Rossier J., Beaujouan J. C., Glowinski J., (1973), *Brain Res.*, **62**, 523—529.
56. Haga T., Noda H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 564—575.
57. Yamamura H. I., Snyder S. H., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 1355—1374.
58. Suszkiw J. B., Pilar G., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 1133—1138.
59. Dowdall M. J., Simon E. J., (1973), *J. Neurochem.*, **21**, 969—982.
60. Simon J. R., Kuhar M. J., (1976), *J. Neurochem.*, **27**, 93—99.
61. Guyenet P., Lefresne P., Rossier J., Beaujouan J. C., Glowinski J., (1973), *Molec. Pharmacol.*, **9**, 630—639.
62. Simon R. J., Atwen S., Kuhar M. J., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 909—922.
63. Suszkiw J. B., Beach R. L., Pilar G. R., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 1123—1131.
64. Kuhar M. J., Sethy V. H., Roth B. H., Agajanian G. K., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 581—593.
65. Whittaker V. P., Dowdall M. J., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 23—42, Raven Press, New York.
66. Carrol P. T., Buterbaugh G. G., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 229—232.
67. Haga T., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 781—798.
68. Diamond I., Milfay D., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 1899—1909.
69. Abdel-Latif A. A., Schmith J. P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 134—140.
70. Ansell G. B., Spanner S., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 117—129, Raven Press, New York.
71. Vizi E. S., (1972), *J. Physiol. (London)*, **226**, 95—117.
72. Vizi E. S., (1973), *Brit. J. Pharmacol.*, **48**, 346—347.
73. Sacks W., (1969) w *Handbook of Neurochemistry*, red. Lajtha A., t. 1, str. 301—324, Plenum Press, New York.
74. Lefresne P., Guyenet P., Glowinski J., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1083—1097.

75. Michalek H., Antal J., Gatti G. L., Pocchiari F., (1971), *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1265—1270.
76. Gibson G. E., Blass J. P., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 1073—1078.
77. Gibson G. E., Jope R., Blass J. P., (1975), *Biochem. J.*, **48**, 17—23.
78. Gibson G. E., Blass J. P., (1976), *J. Neurochem.*, **27**, 37—42.
79. Cheney D. L., Gubler C. J., Jaussi A. W., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1283—1291.
80. Mc Candless D. W., Schenker S., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 2268—2280
81. Blass J. P., Cederbaum S. D., Gibson G. E., (1975) w *Normal and Pathological Development of Energy Metabolism*, red. Hommes F. A., van den Dreyfus P. M., str. 321—334, John Wiley and Sons, New York.
82. Łysiak W., Stępiński J., Angielski S., (1970), *Acta Biochim. Polon.*, **17**, 131—141.
83. Cremer J. E., Heath D. F., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 527—544.
84. Miller A. L., Hawkins R. A., Veech P. L., (1975), *J. Neurochem.*, **25**, 553—558.
85. Blass J. M., Gibson G. E., (1975) w *Thiamine*, red. Gubler G. J., Fujiwara M., Dreyfus P. M., str. 321—334, John Wiley and Sons, New York.
86. Tuček S., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 749—756.
87. Srere P. A., (1965), *Nature*, **205**, 766—770.
88. Lowenstein M. J., (1968) w *Metabolic Roles of Citrate*, red. Goodwin T. W., str. 61—86, Academic Press, New York.
89. D'Adamo A. F., D'Adamo A. P., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 315—323.
90. D'Adamo A. P., Gidez L. I., Yatsu F. M., (1968), *Exptl. Brain Res.*, **5**, 267—273.
91. Bressler R., Katz R. I., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 622—627.
92. Tuček S., Cheng S. C., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 893—914.
93. Itoh T., Quastel J. H., (1970), *Biochem. J.*, **116**, 641—655.
94. Buckley B. M., Williamson D. H., (1973), *Biochem. J.*, **132**, 653—656.
95. Patel M. S., Owen O. E., (1976), *Biochem. J.*, **156**, 663—667.
96. Patel M. S., Owen O. E., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 109—114.
97. Tuček S., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 531—545.
98. Tuček S., Cheng S. C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 538—540.
99. Nakamura R., Cheng S. C., Naruse H., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 443—450.
100. Diamond I., Fishman R. A., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 1533—1544.
101. Koeppe A. M., Barron K. D., Mitzen E. J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 276—281.
102. Reijnierse G. L. A., Veldstra H., van den Berg C. J., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 477—484.
103. Kuriyama K., Roberts E., (1971), *Brain Res.*, **26**, 105—119.
104. Sollenberg J., Sörbo B., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 201—207.
105. Israël M., Tuček S., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 487—491.
106. Cheng S. C., Nakamura R., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 451—455.
107. Cheng S. C., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 461—471.
108. Diebler M. F., Morot-Gaudry Y., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 447—453.
109. Szutowicz A., Frazier W. A., Bradshaw R. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1524—1528.
110. Szutowicz A., (1977), *Neuropat. Pol.*, **15**, 453—460.
111. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 331—338.
112. Polak R. L., Molenaar P. C., Braggaar-Schapp P., (1978) w *Cholinergic Mechanisms*, (La Jolla), w druku.
113. Fonnum F., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 465—472.

114. Wenthold R. J., Mahler H. R., (1975), *J. Neurochem.*, **24**, 963—967.
115. Norberg A., Sundwall A., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 229—239, Raven Press, New York.
116. Mc Caman R. E., Mc Caman M. W., Stafford M. L., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 930—934.
117. Szutowicz A. (1978) *Proc. Acad. Sci. G.D.R.* (w druku).
118. Volpe J. J., Kishimoto Y., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 737—753.
119. Patel M. S., Tonkonow B. L., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 309—313.
120. Gonatas N. K., Autillo-Gambetti L., Gambetti P., Shafer B., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 484—498.
121. Ladinsky H., Consolo S., Peri G., Garattini S., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 1947—1952.
122. Coyle J. T., Yamamura H. I., (1976), *Brain Res.*, **118**, 429—440.
123. Singh V. K., McGeer E. G., (1977), *Brain Res.*, **127**, 159—163.
124. Valiane T., Liao C., Timiras P. S., (1974), *Brain Res.*, **73**, 105—120.
125. Lai J. C. K., Clark J. B., (1976), *Biochem. J.*, **154**, 423—432.
126. Łysiak W., Szutowicz A., Angielski S., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 325—333.
127. Szutowicz A., Stępień M., Łysiak W., Angielski S., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 227—234.
128. Gibson G. E., Shimada M., (1977), *Trans. Amer. Soc. Neurochem.*, **8**, 127.
129. Dowdall M. J., Boyne A. F., Whittaker V. P., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 1—12.
130. Whittaker V. P., Dowdall M. J., Dowe G. H. C., Faccino R. M., Scotto J., (1974), *Brain Res.*, **75**, 115—131.
131. Richards E. P., Sharp R. R., (1975), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **64**, 851—855.
132. Israël M., Lesbants B., Manaranche R., Mastour-Frachon D., (1973), *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **277**, 2069—2072.
133. Israël M., (1976), *Abstr. First Meet. Europ. Soc. Neurochem.*, str. 61, Bath, England.
134. Dowdall M. J., Zimmerman H., (1974), *Brain Res.*, **71**, 160—166.
135. Gilbert J. C., Wyllie M. G., (1976), *Brit. J. Pharmacol.*, **56**, 49—57.
136. Breer H., Morris S. J., Whittaker V. P., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 313—318.
137. Boyne A. F., (1976), *Brain Res.*, **114**, 481—491.
138. Morgan I. G., Wolfe L. S., Mandel P., Gombos G., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 737—751.
139. Liang C. C., Quastel J. H., (1969), *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1187—1194.
140. Vizi E. S., (1975) w *Cholinergic Mechanisms*, red. Waser P. G., str. 199—211, Raven Press, New York.
141. Daves P. M., Vizi E. S., (1973), *Brit. J. Pharmacol.*, **48**, 225—232.
142. Zimmerman H., Whittaker V. P., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 435—450.
143. Zimmerman H., Whittaker V. P., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 1109—1114.
144. Barker L. A., Dowdall M. J., Whittaker V. P., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 1063—1080.
145. Molenaar P. C., Nickol'son V. J., Polak R. L., (1973), *Brit. J. Pharmacol.*, **47**, 97—108.
146. Zimmerman H., (1976), *Abstr. First. Meet. Europ. Soc. Neurochem.*, Bath (England) str. 6.
147. Heuser J. E., Reese T. S., (1973), *J. Cell Biol.*, **57**, 315—344.

148. Knowles S. E., Jarret I. G., Filsell O. H., Ballard J., (1974), *Biochem. J.*, **142**, 401—411.
149. Cremer J. E., Teal H. M., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 17—20.
150. Szutowicz A., Frazier W. A., Bradshaw R. A., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1516—1523.

MIROSLAW SZULCZYŃSKI *) FLORIAN DOMKA **)

Dysymilacyjna redukcja siarczanów

Dissimilatory Sulphate Reduction

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Aktywacja siarczanów
 - II-1. Aspekt termodynamiczny
 - II-2. Synteza adenzyno-5'-fosfosiarczanu
- III. Metabolizm adenzyno-5'-fosfosiarczanu
 - III-1. Redukcja adenzyno-5'-fosfosiarczanu do HSO_3^-
 - III-2. Rola reduktazy adenzyno-5'-fosfosiarczanu u bakterii autotroficznych
- IV. Redukcja HSO_3^- do HS^-
 - IV-1. Reduktaza wodorosiarczynowa
 - IV-2. Reduktaza trójtlenowa
 - IV-3. Reduktaza tiosiarczynowa
- V. Hydrogenaza
- VI. Fosforylacja oksydacyjna. Przenośniki elektronowe łańcucha oddechowego
 - VI-1. Flawodoksyna
 - VI-2. Ferredoksyna
 - VI-3. Inne przenośniki elektronów

Contents

- I. Introduction
- II. Sulphate activation
 - II-1. Thermodynamic aspect
 - II-2. Adenosine 5'-phosphosulphate synthesis
- III. Adenosine 5'-phosphosulphate metabolism
 - III-1. Adenosine 5'-phosphosulphate reduction to bisulphite
 - III-2. Role of adenosine 5'-phosphosulphate reductase in autotrophic bacteria

*) Mgr, **) Prof. dr hab., Zakład Kinetyki i Katalizy, Instytut Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: AMP — adenzyno-5'-monofosforan, ADP — adenzyno-5'-dwufosforan, ATP — adenzyno-5'-trójfosforan, APS — adenzyno-5'-fosfosiarczan, PAPS — 3'-fosforanadenzyno-5'-fosfosiarczanu, FMN — mononukleotyd flawinowy, FAD — dwunukleotyd flawinowoadeninowy, HS-CoA — koenzym A, P-582 — białko o maksym. absorpcji przy 582 nm (60), P_i — fosforan nieorganiczny. $\text{P} \sim \text{P}_i$ — pirofosforan nieorganiczny.

IV. Bisulphite reduction to sulphide

IV-1. Bisulphite reductase

IV-2. Trithionate reductase

IV-3. Thiosulphate reductase

V. Hydrogenase

VI. Oxidative phosphorylation. Electron carriers of respiratory chain

VI-1. Flavodoxin

VI-2. Ferredoxin

VI-3. Other electron carriers

I. Wstęp

Związki siarki występujące w przyrodzie w postaci siarczanów, siarczynów lub substancji organicznych zawierających siarkę podlegają w warunkach naturalnych wielu przemianom, głównie dzięki mikroorganizmom. Zależnie od rodzaju mikroorganizmu i warunków zewnętrznych, związki siarki mogą być utleniane (siarczki) lub redukowane (siarczany). Biologiczna redukcja, w szczególności siarczanów, jest procesem bardzo rozpowszechnionym (1—4) i może przebiegać dwoma odrębnymi szlakami metabolicznymi, z których pierwszy nosi nazwę drogi asymilacyjnej (5—9), a drugi dysymilacyjnej (10—12). Asymilacyjna redukcja siarczanów ma na celu dostarczenie komórce zredukowanych związków siarki potrzebnych do biosyntezy aminokwasów siarkowych i zachodzi u większości mikroorganizmów, grzybów i roślin. Obecność aminokwasów siarkowych w podłożu, metioniny czy cysteiny powoduje represję tej przemiany (13).

Dysymilacyjna redukcja siarczanów natomiast ograniczona jest do niewielkiej liczby bakterii, w których mineralne związki siarki pełnią rolę akceptora elektronów w procesach oksydoredukcyjnych (14—16). W przypadku redukcji typu dysymilacyjnego następuje wydzielanie siarkowodoru do środowiska zewnętrznego, przy czym ilość wydzielonego siarkowodoru jest proporcjonalna do ilości zużytego substratu organicznego (17—19). Ponadto intensywność dysymilacyjnej redukcji nie ulega zmniejszeniu po wprowadzeniu do podłoża aminokwasów siarkowych. Mechanizm dysymilacyjnej redukcji nie został dotychczas w pełni wyjaśniony.

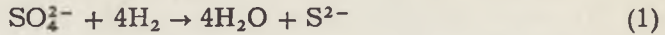
Artykuł dotyczy jedynie procesu dysymilacyjnej redukcji siarczanów. Proces asymilacji mineralnych związków siarki jest przedmiotem innych prac (20, 21).

II. Aktywacja siarczanów

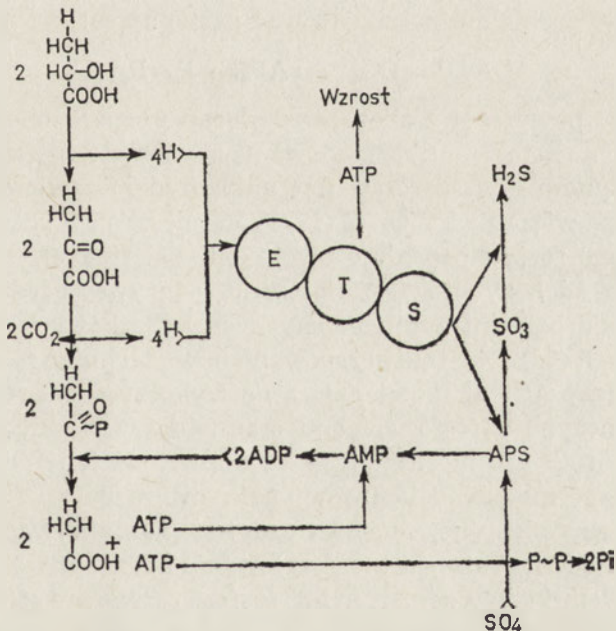
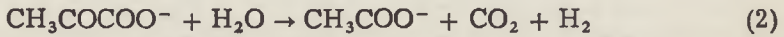
II-1. Aspekt termodynamiczny

Z obliczeń termodynamicznych wynika, że redukcja siarki 6-cio dodatniej do 2-wu ujemnej jest reakcją wysoce endoergiczną. Przeprowadzona przez mikroorganizmy redukcja siarczanów w siarczki, uwarunko-

wana beztlenowym środowiskiem i obecnością silnego reduktora, jakim może być np. wodór molekularny, powstający w wyniku metabolizmu substratów organicznych może zachodzić według egzoergicznego reakcji:

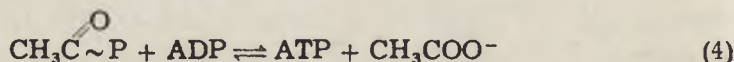
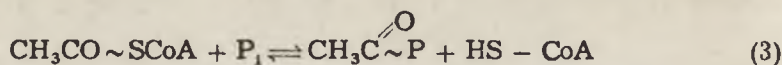


Zmiana entalpii ($\Delta G'_0$) reakcji, oszacowana według dostępnych danych termodynamicznych, posiada wartość ujemną i wynosi $\Delta G'_0 < -31$ [kcal·mol⁻¹] (22). Należy zatem przyjąć, że niektóre organizmy dostosowały się do wykorzystania powstającej energii chemicznej przekształcając ją w energię zużywaną w procesach biologicznych. Z badań izotopowych wynika (23), że w redukcji siarczanów, która rozpoczęła się przed 800 milionami lat, czynnikiem redukującym jest wodór wytwarzany w wyniku utlenienia substratów organicznych (24). Zaobserwowano ponadto, że bakterie *Desulfovibrio desulfuricans* posiadają zdolność wzrostu na podłożach nie zawierających siarczanów (25), chociaż wówczas wzrost jest na ogół słabszy w porównaniu z ich wzrostem w pożywkach zawierających SO_4^{2-} (24). Szybszy wzrost bakterii w pożywkach zawierających siarczanowy jest oczywiście uwarunkowany termodynamicznym uprzywilejowaniem redukcji (reakcja 1). Wzrost w nieobecności jonów siarczanowych zachodzi na podłożu zawierającym pirogronian, którego częściowe utlenienie związane jest z wydzielaniem wodoru molekularnego:



Ryc. 1. Model dysymilacyjnej przemiany siarczanów (27).

Warto przypomnieć, że podczas utleniania jednego mola pirogronianu powstaje tylko jeden mol ATP, a proces można zilustrować następująco:

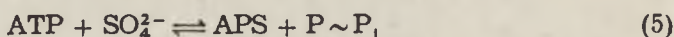


Odpowiedni schemat powstania wysokoenergetycznego ATP przedstawiono na rycinie 1.

Na podłożach zawierających jony siarczanowe pełniące rolę akceptora elektronów masa mikroorganizmów przyrasta z większą wydajnością. W przypadku tym mamy do czynienia z funkcjonowaniem nietypowego łańcucha oddechowego, w którym do syntezy ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej (26—28), wykorzystana jest energia pochodząca z utleniania wodoru.

II-2. Synteza adenozyno-5'-fosfosiarczanu

Siarczan pobrany przez mikroorganizmy przechodzi w formę aktywną zanim ulegnie redukcji. W poznanych dotychczas przypadkach aktywacja polega na utworzeniu adenozyno-5'-fosfosiarczanu (od *ang.* *adenosine-5'-phosphosulphate*, czyli APS). Syntezę aktywnego siarczanu katalizuje enzym sulfurylaza ATP (adenylotransferaza ATP; siarczan, E.C. 2.7.7.4). Schematycznie proces można zilustrować następująco:



Wydzielany w powyższej reakcji pirofosforan ulega w obecności pirofosfatazy natychmiastowemu rozkładowi na dwa mole fosforanu. Wytworzony adenozyno-5'-fosfosiarczan jest nukleotydem zawierającym wysokoenergetyczne wiązanie P—O—S (17) typu mieszanego bezwodnika kwasowego, którego rozpad powoduje uwolnienie ok. 18 kcal.

Biosynteza adenozyno-5'-fosfosiarczanu odgrywa bardzo dużą rolę w metabolizmie bakterii autotroficznych oraz siarkowych bakterii fotosyntetyzujących (32). Ostatnio opracowano nową technikę pomiaru aktywności sulfurylasy ATP (33), polegającą na wykorzystaniu różnic rozpuszczalności adenozyno-5'-fosfosiarczanu oraz SO_4^{2-} w wodnych roztworach etanolu. W ten sposób można obydwie związki oddzielić od siebie a następnie oznaczyć metodami konwencjonalnymi.

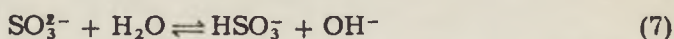
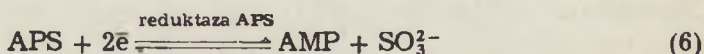
W drodze asymilacyjnej zachodzi drugi stopień aktywacji siarczanów (29, 30) polegający na dalszym ufosforylowaniu adenozyno-5'-fosfosiarczanu pod wpływem kinazy adenozyno-5'-fosfosiarczanowej (5'-fosfotransferaza ATP: adenylosiarczan, E.C. 2.7.1.25). Adenozyno-5'-fosfosiarczan pełni rolę prekursora 3'-fosforanu adenozyno-5'-fosfosiarczanu, z którego

dopiero grupa siarczanowa może zostać przeniesiona na fenole, węglowodany i lipidy w obecności enzymów określanых potocznie jako sulfokinazy, czyli transferazy reszt siarczanowych (31).

III. Metabolizm adenozy-5'-fosfosiarczanu

III-1. Redukcja adenozy-5'-fosfosiarczanu do HSO_3^- :

Proces redukcji adenozy-5'-fosfosiarczanu do HSO_3^- u bakterii *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum* katalizuje enzym (11) określaný potocznie jako reduktaza APS (E.C. 1.8.99.2). Przebieg reakcji można przedstawić równaniami:



Enzym został wyodrębniony z bakterii *Desulfovibrio vulgaris* i *D. desulfuricans*. Oczyszczony preparat enzymatyczny charakteryzuje się wysoką specyficznością wyłącznie wobec adenozy-5'-fosfosiarczanu. Masa cząsteczkowa enzymu otrzymanego z *Desulfovibrio vulgaris* (34) wynosi około 220 000 daltonów. Grupę prostetyczną stanowi FAD, który z wodorosiarczynem tworzy złożony związek pośredni.

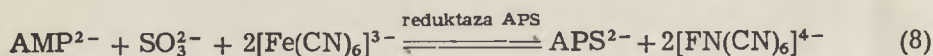
Opierając się na wynikach badań absorpcji promieniowania elektromagnetycznego stwierdzono (34), że jedna gramocząsteczka reduktazy APS zawiera od 6 do 8 gramoatomów żelaza nie związanego z hemem. Na tej podstawie przyjęto (35), że enzym ten należy zaliczyć do klasy złożonych białek określaných jako metaloflawoproteiny.

III-2. Rola reduktazy adenozy-5'-fosfosiarczanu u bakterii autotroficznych

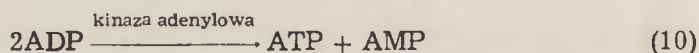
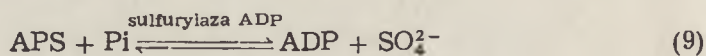
Jak wynika z badań (36, 37) reakcja przedstawiona na schemacie 6, katalizowana przez reduktazę APS jest procesem odwracalnym. Chociaż w przypadku bakterii *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum* znaczenie fizjologiczne odwracalnej reakcji 6 jest niewielkie, to jednak wzbudza ona zainteresowanie w związku z wyodrębnieniem enzymu z komórek bakterii chemiautotroficznych i fotosyntezujących, takich jak *Thiobacillus*, *Chromatium* oraz *Chlorobium* (38—41).

Reduktaza APS wyizolowana zarówno z bakterii *Desulfovibrio desulfuricans* jak i *Thiobacillus thioparus* katalizować może syntezę adenozy-5'-fosfosiarczanu z AMP oraz HSO_3^- , np. w obecności sześciocyjanożel-

lazianu (żelazicyjanku), który okazał się w badaniach *in vitro* odpowiednim akceptorem elektronów. Proces można zilustrować równaniem:



Synteza adenozy-5'-fosfosiarczanu podana w uproszczonym równaniu 8, w rzeczywistości zachodzi w sposób bardzo skomplikowany, z utworzeniem wielu związków pośrednich, pomimo, że redukcję adenozy-5'-fosfosiarczanu jak i jego powstawanie katalizuje to samo białko enzymatyczne (15). Proces tworzenia adenozy-5'-fosfosiarczanu przedstawiony w schemacie 8 ma w wielu organizmach podstawowe znaczenie fizjologiczne (32, 39—41), ponieważ umożliwia syntezę związków wysokoenergetycznych (głównie ADP i ATP). W ich syntezie organizm wykorzystuje energię chemiczną powstającą podczas utleniania związków siarki takich jak siarczki, tiosiarczany, siarczyny lub siarka elementarna. Wytworzony w organizmach adenozy-5'-fosfosiarczan ulega przemianom, które prowadzą do powstawania ATP, co ilustrują równania:



Oznacza to, że w wymienionych mikroorganizmach występuje szczególnego typu fosforylacja, w której energia potrzebna do syntezy wiązań wysokoenergetycznych pochodzi z utleniania np. siarczków, co można przedstawić następująco:



IV. Redukcja HSO_3^- do HS^-

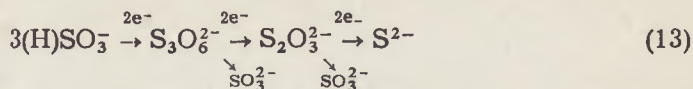
IV-1. Reduktaza wodorosiarczynowa

W organizmach, gdzie zachodzi jedynie proces asymilacyjny, przemiana siarczyny do siarczku przebiega jednoetapowo (42, 43). Kompleks reduktazy siarczynowej może także katalizować proces redukcji azotynów, hydroksylaminy, sześciocyjanożelazianu (żelazicyjanku), cytochromu c oraz niektórych chinonów (44, 45). Dysymilacyjna redukcja zilustrowana ogólnym opisem:

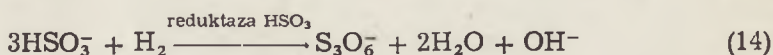


jest procesem złożonym. Wykazano (46), że zachodzi ona w obecności układu enzymatycznego składającego się przynajmniej z trzech odrębnych enzymów. Po rozfrakcjonowaniu układu ustalono, że poszczególny enzym katalizuje tworzenie innego związku siarki, przy czym zbadano, że

podczas dysymilacyjnej redukcji (schemat 12) pośrednio powstają trójtionian i tiosiarczany. Przebieg procesu można zatem zapisać następująco:



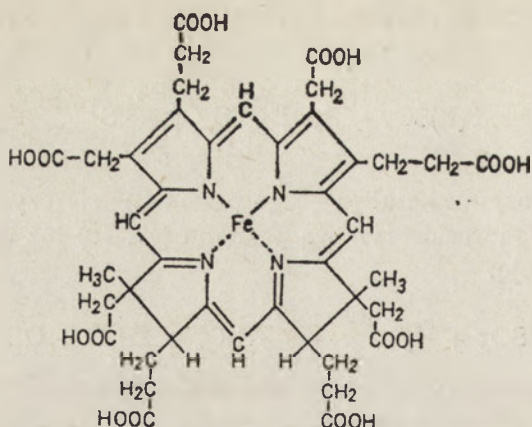
Właściwości enzymu katalizującego przemianę siarczynu w trójtionian tzw. reduktazę wodorosiarczynową poznano (47, 48) już dość dobrze. Katalizuje ona reakcję:



Warto jeszcze zaznaczyć, że reduktaza wodorosiarczynowa jest najczęściej identyczna z zielonym pigmentem białkowym określanym popularnie jako desulfowirydyna (49—51) i występującym w znacznych ilościach u bakterii *Desulfovibrio* (52). Wiadomo (53—55), że jest ona zawsze specyficzna wobec jonu HSO_3^- , przy czym nie katalizuje przemiany trójtionianu czy tiosiarczynu (35). Bardziej szczegółowe badania pozwoliły ustalić (56), że enzym wyodrębniony z bakterii *Desulfovibrio* składa się z dwu różnych łańcuchów polipeptydowych o masach cząsteczkowych 45000 i 55000 daltonów. Warto także odnotować, że żyjący w warunkach naturalnych mutant *D. desulfuricans* posiadający cytochrom c_3 , a nie mający desulfowirydyny (57), zwany szczepem norweskim, prowadzi dysymilacyjną redukcję siarczanów, ponieważ zawiera enzym, który jest identyczny z desulforubidyną, czyli czerwonym pigmentem białkowym występującym wyłącznie w mutancie. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano (58, 59), że desulforubidyna katalizuje redukcję HSO_3^- do $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$.

W bakteriach *Desulfotomaculum* nie mających ani cytochromu c_3 , ani desulfowirydyny (czy ewentualnie desulforubidyny) stwierdzono (54) występowanie brązowego pigmentu białkowego posiadającego również zdolność katalizowania redukcji HSO_3^- (60, 61). Tę reduktazę wodorosiarczynową nazwano białkiem P-582 (60, 61).

Z przedstawionych powyżej danych wynika, że niezależnie od różnic poszczególnych pigmentów białkowych ich rola fizjologiczna jest zawsze taka sama i polega na katalizowaniu procesu redukcji HSO_3^- do $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ (62, 63). Sądzi się, że różnice w własnościach fizykochemicznych tych pigmentów mające obraz w odmiennej zdolności do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, nie są wywołane obecnością różnych grup prostetycznych, ale odmiennością apoenzymów. W grupach prostetycznych, zarówno asymilacyjnej reduktazy siarczynowej (E.C. 1.8.1.2) wyizolowanej z *Escherichia coli*, jak i desulfowirydyny otrzymanej z *Desulfovibrio gigas* czy białka P-582 wyizolowanego z *Desulfotomaculum nigrificans*, występuje szczególny typ ugrupowania hemowego (64, 65) nazwany żelazotetrahydroporfiryną. Struktura tej grupy prostetycznej przedstawia się następującym wzorem:



Ryc. 2. Wzór chemiczny żelazotetrahydroporfiryny.

Dlatego różne produkty redukcji wywołane reduktazą typu asymilacyjnego lub reduktazą wodorosiarczynową typu dysymilacyjnego spowodowane są wyłącznie odmiennością apoenzymów.

IV-2. Reduktaza trójtionianowa

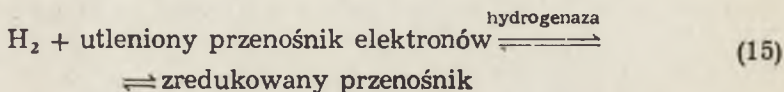
Produktem redukcji HSO_3^- katalizowanej najczęściej przez desulfowirydynę jest trójtionian, który w obecności reduktazy trójtionianowej może być dalej redukowany do tiosiarczanu. Enzym nie jest dotychczas bliżej scharakteryzowany, a o jego obecności świadczy aktywność ekstraktów otrzymanych po rozbiciu komórek *Desulfovibrio* (66). Okazuje się, że niektóre frakcje (zawierające tylko desulfowirydynę) katalizują wyłącznie proces powstawania trójtionianu, a inne prowadzą bezpośrednio do powstania tiosiarczanu. Oznacza to, że w układzie tworzącym tiosiarczan, oprócz reduktazy wodorosiarczynowej (najczęściej desulfowirydyna) musi znajdować się aktywna reduktaza trójtionianowa.

IV-3. Reduktaza tiosiarczanowa

Przemiana tiosiarczanu do wodorosiarczku jest katalizowana (67—70) przez reduktazę tiosiarczanową. Enzym wyizolowano z bakterii *Desulfovibrio vulgaris* (71) i *Desulfovibrio gigas* (72). Stwierdzono, że jego masa cząsteczkowa wynosi około 220000 daltonów i że jest on niestabilny podczas przechowywania. Enzym jest bardzo wrażliwy na utleniacze oraz związki reagujące z grupami tiolowymi. Inhibitorem tego enzymu jest również siarczyn.

V. Hydrogenaza

Hydrogenaza jest enzymem wyodrębnionym z komórek rozmaitych gatunków bakterii (73, 74). Enzym katalizuje (75, 76) w szeregu biologicznych układach oksydoredukcyjnych redukcję naturalnych akceptorów elektronów albo utlenienie naturalnych donorów elektronów. Efektem utlenienia naturalnych donorów elektronów jest powstawanie wodoru molekularnego. Przemiany te można przedstawić w następujący sposób:



Stwierdzono (77), że hydrogenaza występuje w komórkach wszystkich bakterii *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum*, przy czym w zależności od rodzaju bakterii (78) różni się ona specyficznością wobec określonego substratu (przenośnika elektronowego). Tak np. hydrogenaza wyodrębniona z bakterii *Desulfovibrio* jest specyficzna wobec cytochromu c_3 (oksydoreduktaza H_2 : ferricytochrom c_3 , E.C. 1.12.2.1), który nie występuje w bakteriach *Desulfotomaculum* (79). Czystą hydrogenazę wyodrębniono z *Desulfovibrio desulfuricans* (80), *Desulfovibrio vulgaris* (81) i *Desulfovibrio gigas* (82). Stwierdzono, że ciężar cząsteczkowy enzymu wyizolowanego z *Desulfovibrio vulgaris* wynosi 89000 i, że jest on dimerem składającym się z dwu różnych podjednostek o masach cząsteczkowych wynoszących odpowiednio 59000 i 28000 (78). Na uwagę zasługuje także wysoka stabilność tego enzymu, który w niewielkim stopniu stracił swoją aktywność w obecności takich środków koagulujących jak np. mocznik zastosowany w wysokich stężeniach (78). W 9 M roztworze mocznika jego aktywność nie spadła poniżej 20%, a po rozcieńczeniu wodą następowało przywrócenie pierwotnej (100%) aktywności.

Badania morfologiczne wykazały (82), że enzym występuje w obszarze periplazmatycznym komórki (to znaczy w obszarze położonym między ścianą komórkową a membraną cytoplazmatyczną).

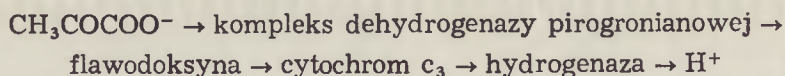
VI. Fosforylacja oksydacyjna. Przenośniki elektronowe łańcucha oddechowego

Przez długi okres czasu, opierając się głównie na uproszczonych modelach przemian enzymatycznych i na analogiach z innymi układami sądzono (77), że u bakterii *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum* występuje bardzo prosty system przenoszenia elektronów (*electron transport system* — ETS). Obecnie wiadomo (35), że w bakteriach *Desulfovibrio* i *Desulfotomaculum* funkcjonuje bardzo złożony łańcuch przenośników elektronowych. Łańcuch ten jest swoisty dla wymienionych bakterii z uwagi

na fakt, że funkcjonuje przy bardzo niskich potencjałach oksydoredukcyjnych. Nie znamy jednak dotąd ani mechanizmu szczegółowego oraz typu wszystkich przenośników elektronów. Wiadomo tylko (27, 35, 77), że bakterie rosną w obecności SO_4^{2-} właśnie w wyniku działania powyższego łańcucha przenośników (ETS) i dlatego synteza ATP zachodzi w nich nie tylko w rezultacie fosforylacji substratowej (83), ale także na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Stwierdzono (35, 77), że w łańcuchu przenośników uczestniczy wiele związków, a szczególnie specjalnego typu białka, których funkcja fizjologiczna polega wyłącznie na przenoszeniu elektronów.

VI-1. Flawodoksyna

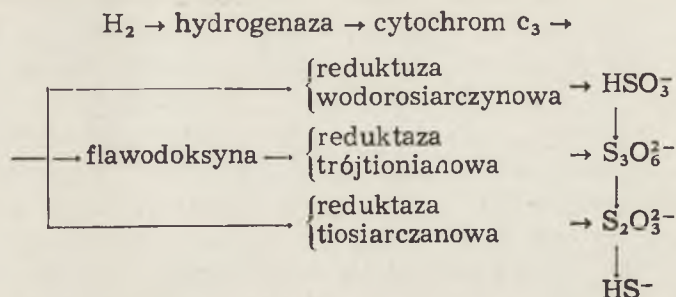
Flawodoksyny są białkami należącymi do klasy flawoprotein, które spełniają rolę przenośników elektronowych. Wykazano (84, 85), że w ich skład nie wchodzi metale i że nie są one aktywowane jonami metali. Centrum aktywnym flawoprotein jest FMN związany z łańcuchem polipeptydowym za pomocą oddziaływań wodorowych (86—88). Sugeruje się (89), że jedna cząsteczka białka wiąże tylko jeden mol FMN. Flawodoksyna wyizolowana z *Desulfovibrio vulgaris* jest pierwszą flawoproteina z oznaczoną (90) strukturą pierwszo- i trzecio-rzędową. Identyfikacji strukturalnej dokonano na podstawie badań rentgenostrukturalnych przy zdolności rozdzielczej równej 2,5 Å (91) oraz 2 Å (86). Stwierdzono (92), że pod wpływem związków rtęcioorganicznych następuje łatwo oddysocjowanie grupy aktywnej jaką jest FMN. Osobliwością flawodoksyny wyizolowanej z *Desulfovibrio vulgaris* jest stosunkowo wysoka zawartość reszt cysteinowych w łańcuchu w porównaniu z flawodoksynami wyodrębnionymi z bakterii innych rodzajów. Z badań wynika (93), że flawodoksyna uczestniczy w przemianie pirogronianu do acetylofosforanu u bakterii *Desulfovibrio vulgaris*. W tej przemianie niezbędny jest również udział cytochromu c_3 , który przenosi elektrony na układ hydrogenazy. Schemat przepływu elektronów obrazowo można przedstawić następująco:



Jony wodorowe zostają następnie związane przez układ reduktazy. Podczas niedoboru jonów siarczanowych w podłożu system przenośników elektronowych przestaje funkcjonować i wówczas reakcja zatrzymuje się na wydzielaniu do środowiska wodoru molekularnego (klasyczna fermentacja).

Drugą funkcją flawodoksyny jest przenoszenie elektronów na układ reduktazy trójtionianowej. Donorem elektronów w tym przypadku jest zredukowany cytochrom c_3 , którego redukcja następuje pod wpływem

hydrogenazy. Przenoszenie elektronów w takim przypadku można zapisać następująco (92):



Wiadomo również (94), że flawodoksyna może w pewnych reakcjach enzymatycznych zastąpić inny typ białka przenoszącego elektrony, a mianowicie ferredoksynę.

Stężenie flawodoksyny w komórce wielu organizmów zależy od stężenia jonów żelaza w pożywce, przy czym niskie ich stężenie sprzyja jej intensywnej biosyntezie, ale nagromadzenie się jej w komórce prowadzi do zaprzestania dalszej biosyntezy na drodze zahamowania zwrotnego. Takie zjawisko zaobserwowano na przykładzie bakterii *Desulfovibrio vulgaris* (92).

VI-2. Ferredoksyna

Ferredoksyny są białkami o niewielkiej masie cząsteczkowej, których rola fizjologiczna związana jest wyłącznie z przeniesieniem elektronów. Występują one (94, 95) u wszystkich organizmów fotosyntetyzujących i tylko w nielicznych heterotroficznych beztlenowcach. Oprócz łańcucha polipeptydowego w cząsteczce ferredoksyny występuje w ekwimolarnych ilościach żelazo i siarka, które są składnikami specjalnego typu układu strukturalnego. W skład powyższego układu w ferredoksynach wyizolowanych z bakterii *Desulfovibrio* wchodzi 4 atomy Fe i 4 atomy S. Przyjmuje się, że układ strukturalny powyższych atomów pełni funkcję centrum aktywnego.

Podobnie jak flawodoksyny tak i ferredoksyny otrzymane z bakterii *Desulfovibrio* były przedmiotem licznych badań (96—101). Stwierdzono, że ich centrum aktywne jest bardzo niestabilne i że pod wpływem zakwaszenia (lub zalkalizowania) następuje ich rozkład z wydzielaniem siarkowodoru. Ogólnie przyjmuje się, że fizjologiczna rola ferredoksyn sprowadza się do funkcji analogicznych do tych, jakie pełni flawodoksyna. Pogląd ten wymaga jednak pewnej weryfikacji, która będzie możliwa wówczas, gdy zostaną wyizolowane i całkowicie oczyszczone preparaty enzymatyczne oraz białka przenoszące elektrony (35).

VI-3. Inne przenośniki elektronów

Znaczenie cytochromu c_3 w łańcuchu przenośników omówiono krótko podczas charakteryzowania flawodoksyny. Ze względu na powszechne występowanie cytochromu c_3 i dość dobrą znajomość jego właściwości fizykochemicznych, nie będziemy omawiać go szczegółowo. Należy jedynie dodać, że występują znaczne różnice sekwencji aminokwasów w łańcuchu w zależności od badanego szczepu bakterii (77, 102—104). Natomiast rola fizjologiczna rubredoksyny czyli żelazoproteiny filogenetycznie związanej zarówno z flawodoksyną i ferredoksyną, obecnie nie jest wyjaśniona (105—108). Podobnie niewiele wiemy o fizjologicznej roli witaminy K_2 , która w znacznych ilościach ($1,7 \mu\text{M/g}$ biomasy bakteryjnej) występuje w bakteriach *Desulfovibrio vulgaris* i *Desulfovibrio gigas* (109—110). Znaczenie fizjologiczne oraz własności fizykochemiczne przenośników szczegółowo omówił Le Gall i wsp. (77). Wykorzystując coraz lepsze metody badawcze wyodrębniono w ostatnim czasie (98—100) z bakterii *Desulfovibrio gigas* trzy formy ferredoksyny i stwierdzono, że składają się one z identycznych łańcuchów polipeptydowych różniących się tylko stopniem agregacji. Fakt ten, rzecz zrozumiała, pociąga za sobą zmianę własności fizykochemicznych i w konsekwencji zróżnicowanie fizjologiczne tych form (98).

Nad wyjaśnieniem działania przenośników elektronowych prowadzone są dalsze intensywne badania i mamy nadzieję, że wysiłki badaczy doprowadzają do poznania molekularnych i elektronowych mechanizmów, leżących u podstaw procesów dysymilacyjnej redukcji siarczanów.

Zaakceptowano do druku 25.7.1978

PIŚMIENNICTWO

1. Schiff J. A., Hodson R. G., (1973), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 381—414.
2. Tsang M. L. S., Schiff J. A., (1976), *J. Bacteriol.*, **125**, 923—933.
3. Hutner S. H., (1972), *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 313—346.
4. Eschenbruch R., Bonisch P., (1976), *Arch. Microbiol.*, **107**, 299—302.
5. Eschenbruch R., Bonisch P., (1976), *Arch. Microbiol.*, **107**, 229—231.
6. Utkilen H. Ch., Heldal M., Gjert K., (1976), *Physiol. Plant.*, **38**, 217—220.
7. Schmidt A., (1975), *Planta* (Berl.), **124**, 267—275.
8. Eschenbruch R., (1974), *Amer. J. Enol. Viticult.*, **25**, 157—161.
9. Dott W., Heinzl M., Trüper H. G., (1976), *Arch. Microbiol.*, **107**, 289—292.
10. Postgate J., (1959), *Ann. Rev. Microbiol.*, **13**, 505—520.
11. Peck H. D., Jr, (1961), *J. Bacteriol.*, **82**, 933—939.
12. Peck H. D., Jr, (1959), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **45**, 701—708.
13. Ishimoto M., (1959), *J. Biochem.* (Tokyo), **46**, 105—106.
14. Peck H. D., Jr, (1960), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **46**, 1053—1057.
15. Peck H. D., Jr, (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 621—624.

16. Biebl H., Pfennig N., (1977), *Arch. Microbiol.*, **112**, 115—117.
17. Domka F., Stawicki S., Szulczyński M., *Acta Microbiol. Polon.* (in press).
18. Peck H. D., Deacon T. E., Davidson J. T., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 429—446.
19. Drake H. L., Akagi J. M., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 132—138.
20. Tuovinen O. H., Kelley B. C., Nicholas D. J. D., (1975), *Arch. Microbiol.*, **105**, 123—127.
21. Kelley B. C., Touvinen O. H., Nicholas D. J. D., (1976), *Arch. Microbiol.*, **109**, 205—208.
22. Wake L. V., Christopher R. K., Rickard P. A. D., Andersen J. E., Ralph B. J., (1977), *Aust. J. Biol. Sci.*, **30**, 155—172.
23. Ault M. W., Kulp J. L., (1959), *Geochim. Cosmochim. Acta*, **16**, 201—235.
24. Vosjan H. J., (1975), *Plant Soil*, **43**, 141—152.
25. Postgate J. R., (1965), *Bacteriol. Rev.*, **29**, 425—441.
26. Peck H. D., Jr, (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 112—118.
27. Vosjan J. H., (1970), *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **36**, 585—587.
28. Akagi J. M., Adams V., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2478—2483.
29. Tsang M. L. S., Schiff J. A., (1975), *Plant Science Lett.*, **4**, 301—307.
30. Jones-Mortimer M. C., (1963), *Biochem. J.*, **110**, 589—595.
31. Shoyab M., Marx W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 125—132.
32. Aleem M. I. H., (1975), *Plant Soil*, **43**, 587—607.
33. Reuveny Z., Filner P., (1976), *Anal. Biochem.*, **75**, 410—428.
34. Michaels G. B., Davidson J. T., Peck H. D., Jr, (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 321—328.
35. Le Gall J., (1975), *Plant Soil*, **43**, 115—124.
36. Peck H. D., Jr, Fisher E., Jr, (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 190—197.
37. Peck H. D., Jr, (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 198—203.
38. Trudinger P. A., (1961), *Biochem. J.*, **78**, 680—686.
39. Pfennig N., (1975), *Plant Soil*, **43**, 1—16.
40. Hansen T. A., Serpers A. B. J., Van Gemerden H., (1975), *Plant Soil*, **43**, 17—27.
41. Trüper H. G., (1975), *Plant Soil*, **43**, 29—39.
42. Heinzl M., Trüper H. G., (1976), *Arch. Microbiol.*, **107**, 293—297.
43. Dott W., Trüper H. G., (1976), *Arch. Microbiol.*, **108**, 99—104.
44. Prabhakararao K., Nicholas D. J. D., (1969), *Biochim. Biophys. Acta.*, **180**, 253—263.
45. Yoshimoto A., Sato R., (1968), *Biochim. Biophys. Acta.*, **153**, 576—588.
46. Kobayashi K., Tachibana S., Ishimoto M., (1969), *J. Biochem. (Tokyo)*, **65**, 155—157.
47. Akagi J. M., Chan M., Adams V., (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 240—244.
48. Drake H. L., Akagi J. M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1214—1219.
49. Lee J. P., Peck H. D., Jr, (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 583—589.
50. Jones H. E., Skyring G. W., (1974), *Aust. J. Biol. Sci.*, **27**, 7—14.
51. Jones H. E., Skyring G. W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 52—60.
52. Suh B., Akagi J. M., (1969), *J. Bacteriol.*, **99**, 210—215.
53. Lee J. P., Le Gall J., Peck H. D., Jr, (1973), *J. Bacteriol.* **115**, 529—542.
54. Skyring G. W., (1975), *Proc. Aust. Biochem. Soc.*, **7**, 21.
55. Skyring G. W., Jones H. E., (1976), *Aust. J. Biol. Sci.*, **29**, 291—299.

56. Kobayashi K., Takahashi E., Ishimoto M., (1972), *J. Biochem.* (Tokyo), **72**, 879—887.
57. Miller J. D. A., Saleh A. M., (1964), *J. Gen. Microbiol.*, **37**, 419—423.
58. Le Gall J., Postgate J. R., (1973), *Adv. Microb. Physiol.*, **10**, 81—133.
59. Lee J. P., Yi Ch. S., Le Gall J., Peck H. D., Jr, (1973), *J. Bacteriol.*, **115**, 453—455.
60. Trudinger P. A., (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 158—170.
61. Akagi J. M., Adams V., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 392—393.
62. Kobayashi K., Seki Y., Ishimoto M., (1974), *J. Biochem.*, (Tokyo), **75**, 519—529.
63. Bruschi M., Hatchikian C. E., Golovleva L. A., Le Gall J., (1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 30—38.
64. Murphy M. J., Siegel L. M., Kamin H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 82—88.
65. Murphy M. J., Siegel L. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6911—6919.
66. Findley J. E., Akagi J. M., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 266—271.
67. Nakatsukasa W., Akagi J. M., (1969), *J. Bacteriol.*, **98**, 429—433.
68. Drake H. L., Akagi J. M., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 139—143.
69. Drake H. L., Akagi J. M., (1976), *J. Bacteriol.*, **126**, 733—738.
70. Skyring G. W., Jones H. E., (1977), *Aust. J. Biol. Sci.*, **30**, 21—31.
71. Haschke R. H., Campbell L. L., (1971), *J. Bacteriol.*, **106**, 603—607.
72. Hatchikian E. C., (1975), *Arch. Microbiol.*, **105**, 249—256.
73. Ackrell B. A. C., Asato R. N., Mower H. F., (1966), *J. Bacteriol.*, **92**, 828—838.
74. Tamiya N., Yamaguchi Y., Honya M., Yagi T., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 43—47.
75. Yagi T., Goto M., Nakano K., Kimura K., Inokuchi H., (1975), *J. Biochem.* (Tokyo), **78**, 443—454.
76. Yagi T., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, **73**, 2947—2949.
77. Le Gall J., Bruschi M., Hatchikian C. E., (1975), *Proc. Tenth FEBS Meet.*, 277—285.
78. Yagi T., Kimura K., Daidoji H., Sakai F., Tamura S., Inokuchi H., (1976), *J. Biochem.*, **79**, 661—671.
79. Akagi J. M., Campell L. L., (1961), *J. Bacteriol.*, **82**, 927—932.
80. Yagi T., Honya M., Tamiya N., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 699—705.
81. Yagi T., Tsuda M., Inokuchi H., (1973), *J. Biochem.* (Tokyo), **73**, 1069—1081.
82. Bell G. R., Le Gall J., Peck H. D., Jr, (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 994—997.
83. Brown M. S., Akagi J. M., (1966), *J. Bacteriol.*, **92**, 1273—1274.
84. Dubourdieu M., Le Gall J., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 965—972.
85. Dubourdieu M., Fox J. L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1453—1463.
86. Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 3857—3860.
87. Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H., (1976), *Flavins and Flavoproteins*, red. Singer T. P., str. 405—410; Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
88. Favaudon V., Le Gall J., Lhoste J. M., (1976), *Flavins and Flavoproteins*, red. Singer T. P., str. 434—438; Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.

89. Dubourdiou M., McKnight M. L., Tollin G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 649—655.
90. Dubourdiou M., Le Gall J., Fox J. L., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1418—1425.
91. Watenpaugh K. D., Sieker L. C., Jensen L. H., Le Gall J., Dubourdiou M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3185—3188.
92. Irie K., Kobayashi K., Kobayashi M., Ishimoto M., (1973), *J. Biochem.*, (Tokyo), **73**, 353—366.
93. Dubourdiou M., Le Gall J., Favaudon V., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 519—532.
94. Yoch D. C., Valentine R. C., (1972), *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**, 139—162.
95. Tagawa K., Arnon D. I., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 602—613.
96. Le Gall J., Dragoni N., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 145—149.
97. Travis J., Newman D. J., Le Gall J., Peck H. D., Jr, (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 452—458.
98. Bruschi M., Hatchikian E. C., Le Gall J., Moura J. J., Xavier A. V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 275—284.
99. Moura J. J., Xavier A. V., Bruschi M., Le Gall J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **459**, 278—289.
100. Cammack R., Rao K. K., Hall D. O., Moura J. J. G., Xavier A. V., Bruschi M., Le Gall J., Deville A., Gayda J. P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **490**, 311—321.
101. Bianco P., Haladjian J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 323—327.
102. McDonald C. C., Phillips W. D., Le Gall J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1952—1959.
103. Le Gall J., (1974), *Recherche*, **5**, 987—989.
104. Trousil E. B., Campbell L. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 386—393.
105. Vogel H., Bruschi M., Le Gall J., (1977), *J. Mol. Evol.*, **9**, 111—119.
106. Bruschi M., Bonicel J., Lapierre-Bovier G., Couchod P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 615—621.
107. Bruschi M., Bonicel J., Bovier-Lapierre G., Couchod P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 4—17.
108. Adman E. T., Sieker L. C., Jensen L. H., Bruschi M., Le Gall J., (1977), *J. Mol. Biol.*, **112**, 113—120.
109. Hatchikian E. C., (1974), *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 261—266.
110. Wagner G. C., Kassner R. J., Kamen M. D., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 253—256.

SPRAWOZDANIE

Zjazd Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkankowej

2—5 lipiec 1978, Glasgow, Wielka Brytania

W dniach 2—5 lipca 1978 roku odbywał się w Glasgow Zjazd Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkankowej. Towarzystwo to istnieje już lat trzydzieści ale, według opinii przewodniczącego dr Johna Paula (*Beatson Institute of Cancer Research*, Glasgow), rozwój i aktywność Towarzystwa nie są współmierne z rozwojem tej dziedziny biologii — szczególnie w porównaniu z analogicznym Towarzystwem amerykańskim. W tej chwili Europejskie Towarzystwo liczy 202 członków (w tym troje z Polski). Zjazd w Glasgow miał być okazją nie tylko do wymiany doświadczeń naukowych ale także do ożywienia działalności Towarzystwa m.in. przez zmianę statutu, nawiązanie współpracy z Towarzystwem amerykańskim itp. Planuje się organizowanie corocznych zjazdów naukowych.

W bieżącym roku udział w Zjeździe wzięło 188 osób; najliczniejszą grupę — prócz Brytyjczyków (84 osoby) stanowili Francuzi (23 osoby), Niemcy (RFN — 14 osób) i Włosi (13 osób); z krajów socjalistycznych były tylko trzy osoby (Czechosłowacja, Jugosławia i Polska); gośćmi Zjazdu było sześcioro Amerykanów.

W ramach Zjazdu odbyły się trzy sympozja i osiem „warsztatów”, były to sympozja pt.:

I Różnicowanie komórek erytroleukemii Frienda i teratocarcinoma (5 referatów),

II Genetyka komórek somatycznych (4 referaty)

III Charakterystyka komórek rakowych *in vitro* (5 referatów)

oraz „warsztaty” pt.:

- 1) Hodowla na dużą skalę oraz techniki perfuzyjne,
- 2) Interakcja komórkowa,
- 3) Transfer genów,
- 4) Pomiary cytotoksyczności,
- 5) Rozdział komórek i klonowanie,
- 6) Transformacja,
- 7) Pierwotne kolonie komórek rakowych i nabłonkowych,
- 8) Kontrola cyklu komórkowego,

jedna sesja doniesień laboratoryjnych oraz doniesienia plakatowe. (72 doniesienia)

W ramach II-go sympozjum szczególnie interesujący był referat C. T. Caskey'a i wsp. (Houston, USA) na temat charakterystyki biochemicznej mutantów indukowanych, S. J. Gossa (Oxford, W. Brytania) o zastosowaniu do mapowania chromosomów hybryd otrzymanych przez fuzję komórek ludzkich, w których w wyniku napromienienia wywołano pęknięcie chromosomów, z normalnymi fibroblastami niektórych gryzoni oraz K. Willecka i wsp. (Kolonja, RFN) na temat międzykomórkowego przekazywania materiału genetycznego bez fuzji komórkowej. Spośród referatów wygłoszonych w czasie III sympozjum na uwagę zasługuje praca J. Pontena (Uppsala, Szwecja) nad kontrolą wzrostu komórek glejowych normalnych oraz komórek glejowym; autor uważa, że czynnikiem powodującym tzw. „contact inhibition” jest czynnik

wewnątrzkomórkowy (nie powierzchniowy) „wyłączający” wrażliwość komórki na czynnik wzrostu (*grow factor*) — wynikiem jego uszkodzenia jest proliferacja nowotworowa.

Spośród prac przedstawionych w formie plakatowej najwięcej dotyczyło warunków hodowli oraz wpływu składu pożywki i dodania np. hormonów (Priestley, Edynburg), leków (Dosida i wsp., Mediolan, Włochy), metali ciężkich (Skreb, Zagrzeb, Jugosławia) itp. na wzrost i morfologię różnego typu komórek normalnych (pochodzących z rozmaitych narządów — gleju, wątroby, nerki, mięśni, soczewki oka), transformowanych *in vitro* lub pochodzących z guzów nowotworowych (glejoma, teratocarcinoma, rak nerki itp.). Kilkanaście prac dotyczyło zachowania przez komórki hodowane *in vitro* swoistych właściwości komórek rodzicielskich ip. wydzielanie albuminy i alfafetoproteiny przez hodowane komórki hepatoma (Poliard, Bruksela, Belgia), synteza hemu i globiny przez komórki Frienda (Rutheford, Oxford, W. Brytania), wydalanie swoistego lipoproteidu przez komórki HeLa, HEP-2 i in. (Wieczorek, Monachium, RFN). Kilka pracowni przedstawiło dane nt. zmian powierzchni komórek transformowanych (Perry i Hawkes, Berkeley, USA) lub innych nieprawidłowych np. hodowanych komórek trzustki pochodzącej od chorych na wrodzoną, oporną na leki hypoglikemię (Aubery i Holand, Paryż, Francja). Szeroki wachlarz prac przedstawili genetycy — od badań kwasów nukleinowych np. mRNA poszczególnych komórek metodą hybrydyzacji ze znakowaną cząsteczką komplementarną (Godard i Jones, Edynburg, W. Brytania) po badania biochemicznych różnic w cząsteczce enzymu (HGPRT) mutantów opornych na 8-azaguaninę (Fox, Manchester, W. Brytania) oraz zastosowania fuzji komórkowej do mapowania chromosomów (Cianfriglia i wsp., Calabria, Włochy). „Warsztaty” były forum ożywionej dyskusji na tematy metodyczne.

Dyskusje — jak to zwykle bywa na tego rodzaju spotkaniach — toczyły się dalej w kularach, w stołówce uniwersyteckiej, czy wspólnych śniadań w hotelu akademickim, gdzie większość uczestników mieszkała.

Okazją do wymiany doświadczeń i poglądów nie tylko na tematy związane z hodowlą komórkową było uroczyste otwarcie Zjazdu, przyjęcie, na które zaprosił do wspaniałego ratusza wszystkich uczestników Zjazdu Lord Prevost Glasgow (prześliczne, pełne temperamentu i gracji tańce szkockie, obfity bufet, orkiestra, zwiedzanie ratusza) oraz bankiet szkocki w stylu średniowiecznym, na który wybrała się do Cambusnethan Priory (część bogatyszych) uczestników Zjazdu.

Myślę, że Zjazd zostanie w dobrej pamięci jego uczestników zarówno ze względu na ciekawy i obfity program naukowy jak i na wyjątkowo serdeczną i gościnną atmosferę, jaką potrafili nam stworzyć nasi szkoccy gospodarze.

B. Czartoryska

RECENZJE

Bioenergetics at Mitochondrial and Cellular Levels

Red. L. Wojtczak, E. Lenartowicz, J. Zborowski, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa 1978, stron 198.

W dniach 4—7 września 1977 roku odbyło się w Gdańsku VII Kolokwium na temat „Bioenergetyki i mitochondriów”, zorganizowane przez Zakład Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Gdańsku i Zakład Biochemii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN. Siedem spośród siedemnastu referatów wygłoszonych przez zaproszonych prelegentów z Polski (5), krajów socjalistycznych (6) i zachodnich (6) zostało opublikowanych nakładem instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Tematyka referatów zamieszczonych w recenzowanej książce dotyczy następujących zagadnień:

- Mitochondrialne układy transportu fosforanu i pośredników cyklu Krebsa (F. Palmieri i E. Quagliariello, Włochy),
- Mitochondrialny nośnik transportujący pirogronian: kinetyka, specyficzność, wrażliwość na inhibitory i regulacja (G. Paradies i S. Papa, Włochy),
- Rola transportu anionów w regulacji oksydacyjnej fosforylacji (G. Böhme, K. J. Hartung i W. Kunz, N.R.D.),
- Miejsca wiązania nukleotydów adeninowych kompleksu mitochondrialnej ATP-azy (A. Kemp, Holandia),
- Transport kationów dwuwartościowych przez błonę mitochondriów wątroby i jego znaczenie fizjologiczne (R. Dargel, N.R.D.),
- Zależność między wytwarzaniem energii a regulacją metabolizmu w izolowanych komórkach płuc szczura (R. Parrilla i wsp., Hiszpania),
- Znaczenie utleniania kwasów tłuszczowych w regulacji syntezy białka w wątrobie (M. S. Ayuso-Parrilla i wsp., Hiszpania).

Znaczna część książki, bo aż 4 artykuły, jest poświęcona zagadnieniu transportu przez błonę mitochondrialną. Część ta dobrze odzwierciedla obecny stan wiedzy dotyczący tego złożonego problemu. Na uwagę zasługuje omówienie aspektów regulacyjnych transportu anionów i dwuwartościowych kationów w metabolizmie komórkowym, a w szczególności hipoteza dotycząca roli kationów dwuwartościowych w kontroli metabolizmu komórek wątroby przez insulinę i glukagon. Interesujący jest postęp badań nad strukturą składnika F_1 kompleksu ATP-azy oraz wiązaniem ATP i ADP, opisany przez A. Kempa z laboratorium E. C. Slatera, jednego z przodujących ośrodków zajmujących się zagadnieniem mechanizmu wytwarzania energii w procesie oksydacyjnej fosforylacji. Charakterystyka izolowanych komórek płuc zwraca uwagę na wysoką aktywność metaboliczną tej tkanki, niewiele jeszcze zbadanej pod względem regulacji przemian w niej zachodzących. Ciekawe wydaje się również stwierdzenie zależności między szybkością katabolizmu kwasów tłuszczowych a procesem biosyntezy białka, obserwowane po raz pierwszy w komórkach wątroby szczura.

Publikowanie referatów wygłaszanych podczas spotkań naukowych jest obecnie powszechnie praktykowane. Dobrze się stało, że materiały VII Kolokwium na temat „Bioenergetyki i mitochondriów” zostały opublikowane. Należy jednak żałować, że w materiałach nie znalazły się teksty wszystkich referatów wygłoszonych w czasie Kolokwium, co umożliwiłoby zainteresowanym czytelnikom poznanie całości omawianych zagadnień.

J. Bryła

Ergebnisse der experimentellen Medizin, tom 28 Effects and Metabolism of Insulin and Cyclic Nucleotides

Red. H. Frunder, Wyd. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1978, stron 232, rycin 128, tabel 46, cena 26 M.

Recenzowana książka stanowi zbiór wybranych referatów przeglądowych i prac doświadczalnych przedstawionych w 1975 roku na trzecim wspólnym Sympozjum Wszechzwiązkowego Towarzystwa Biochemicznego ZSRR i Towarzystwa Biochemicznego NRD. Tematyka artykułów obejmuje 3 zagadnienia: 1) niektóre mechanizmy regulacji metabolizmu, 2) metabolizm i działanie insuliny oraz 3) syntezę, działanie i oznaczanie cyklicznych nukleotydów.

Pośród artykułów dotyczących regulacji metabolizmu na uwagę zasługuje artykuł S. Rapoporty poświęcony wykorzystaniu różnych dróg metabolicznych w retikulocytach. Bardzo interesujący jest również artykuł V. N. Smirnova i współautorów na temat transportu energii z mitochondriów do cytoplazmy w komórkach serca w postaci fosfokreatyny. Pozostałe artykuły tej grupy omawiają rolę jonów magnezu i wapnia w procesie glikolizy w erytrocytach oraz wielostronnie ujętą regulację aktywności kinazy kreatynowej w różnych komórkach zwierzęcych.

W zakresie metabolizmu insuliny poruszono następujące problemy: 1) regulację syntezy i wydzielania insuliny, 2) mechanizm konwersji proinsuliny w insulinę, 3) różnice w wytwarzaniu insuliny przy różnych warunkach pokarmowych, 4) mechanizm degradacji insuliny w wysepkach trzustkowych, 5) działanie enzymów wątrobowych inaktywujących insulinę.

Działanie insuliny przedstawiono w czterech aspektach: 1) wiązanie insuliny do adipocytów i jej wpływ na utlenianie glukozy i konwersję glukozy w trójglicerydy, 2) działanie insuliny na utlenianie glukozy w mięśniach na drodze zmian w aktywności fosfofruktokinazy, 3) korelacja między poziomem insuliny we krwi a szybkością odbudowy glikogenu w różnych tkankach, 4) wpływ insuliny na konformację oczyszczonych enzymów (heksokinazy i dehydrogenazy glutaminianowej).

Ostatnią część książki poświęconą cyklicznym nukleotydów rozpoczyna bardzo dobry artykuł A. Wollenbergera wprowadzający we współczesną problematykę w zakresie syntezy, rozpadu i działania tych związków. Część ta obok wielu krótkich doniesień zawiera trzy obszerniejsze prace: 1) o dwojakim mechanizmie działania katecholamin: za pośrednictwem cyklicznego AMP oraz jonów wapnia (M. N. Pertsewa i współautorzy), 2) o izolacji i własnościach zależnej od cyklicznego AMP kinazy histonowej z mózgu świni (E. S. Sewerin i współautorzy), 3) o wpływie cyklicznego AMP na aktywność enzymów katalizujących syntezę prkursorów DNA oraz na aktywność fosforylasy polirybonukleotydowej w wątrobie szczura (S. S. Debov i współautorzy). W części metodycznej na uwagę zasługuje opis metody oznaczania cyklicznego GMP, przy zastosowaniu szczególnie aktywnej, zależnej od cyklicznego GMP kinazy proteinowej z ciała tłuszczowego jedwabników.

Książka ta niewątpliwie stanowi interesującą pozycję dla biochemików zajmujących się regulacją metabolizmu i cyklicznymi nukleotydami, jak również, w pewnej mierze, dla endokrynologów.

E. Lenartowicz

Phosphate Metabolism

Red. Massry, S. H., Ritz E. 1977, wyd. Plenum Press, New York, London, str. XIII+636, tabel 71, rycin 210, cena \$ 49,50

Książka „Metabolizm fosforanów” stanowi kolejny, 81 tom serii „Postępy w Medycynie Doświadczalnej i Biologii”. Obejmuje ona materiały zjazdowe drugiego sympozjum poświęconego zagadnieniom metabolizmu fosforanów i wapnia, które odbyło się w Heidelbergu w roku 1976.

Idea organizacji sympozjum tego typu zrodziła się w roku 1974 jako próba integracji wielodyscyplinarnych badań i wymiany doświadczeń w tematyce metabolizmu fosforanów i innych minerałów. Do chwili obecnej odbyły się trzy sympozja: w Paryżu w 1975 roku, w Heidelbergu w 1976 (na podstawie którego powstała omawiana książka) oraz w Madrycie w 1977, następne odbędzie się w Strasbourgu w roku 1979. Materiały zjazdowe obejmują 59 prelekcji o charakterze wykładów instruktywnych i referatów, w których autorzy prezentują i dyskutują wyniki prac własnych.

W tematyce zjazdu znalazły się doniesienia referujące postępy i najnowsze ustalenia dotyczące patofizjologii homeostazy fosforanowej oraz w mniejszym stopniu wapniowej. Zagadnienia te podzielono na cztery grupy tematyczne:

- Gospodarka fosforanów i innych jonów w nerce
- Znaczenie fosforanów w regulacji metabolizmu witaminy D
- Transport fosforanów i ich udział w patofizjologii jednostek chorobowych
- Znaczenie fosforanów w osteodystrofii nerkowej

Ranga sympozjum i jego poziom cieszy się ustaloną wysoką opinią wśród specjalistów. Nie zaskakuje też fakt, że większość zagadnień prezentowanych w recenzowanej książce dotyczy problemów stanowiących przedmiot potencjalnego zainteresowania lekarzy, endokrynologów i fizjologów. Do najciekawszych pozycji należy zaliczyć badania z pracowni Knoxa nad mechanizmem działania parathormonu w kanaliku nerkowym, oraz prace z pracowni Fleischa i Steela odnośnie mechanizmów adaptacyjnych w reabsorpcji fosforanów w nerce funkcjonujące bez udziału parathormonu.

W badaniach metabolizmu witaminy D zgodnie z wieloletnią już tradycją wiodącą rolę spełniają prace pochodzące z pracowni De Luci i Normana. Wiele w nich miejsca poświęcono regulacji metabolizmu witaminy D przez estrogeny oraz mechanizm działania 1-hydroksylazy-25-hydroksycholekalcyferolu i 24-hydroksylazy-25-hydroksycholekalcyferolu.

W referacie Kurokawy, który stanowił podsumowanie badań własnych i „aktualnego stanu wiedzy” odnośnie mechanizmu działania parathormonu na poziomie komórkowym szeroko omówiono rolę wapnia, cyklicznego AMP oraz równowagi kwasowo-zasadowej w mechanizmie działania parathormonu.

Dla pełniejszego obrazu należy również wspomnieć, że w książce znalazły miejsce prace kliniczne dotyczące udziału fosforanów w etiopatogenezie krzywic opornych na witaminę D, krzywic hypofosfatemicznych oraz osteodystrofii nerkowej.

Omawiana książka stanowi cenne podsumowanie osiągnięć w tematyce metabolizmu wapniowo-fosforanowego.

R. Lorenc

Biological Reactive Intermediates, Formation, Toxicity and Inactivation

Red. Jollow D. J., Kocsis J. J., Snyder R. and Valnio H. 1977, Wyd. Plenum Press, New York i London, str. 514, cena \$ 59,50

W recenzowanym tomie opublikowane są materiały z międzynarodowej konferencji, która odbyła się w 1975 r. w Turku, Finlandia, na temat powstawania, toksyczności oraz mechanizmów inaktywacji tzw. aktywnych intermediatów, to jest związków chemicznych powstających na drodze aktywacji *in vivo*.

Badania tych zagadnień rozpoczęte na początku obecnego wieku a zintensyfikowane począwszy od lat trzydziestych, doprowadziły do powszechnie uznanego poglądu, że oddziaływanie reaktywnych intermediatów z podstawowymi składnikami komórki stanowi bezpośrednią przyczynę toksycznego działania wielu związków chemicznych. Na tom składa się sześć rozdziałów:

- Reaktywne intermediaty w toksykologii i karcinogenezie; rola wiązań kowalencyjnych
- Powstawanie reaktywnych intermediatów
- Inaktywacja reaktywnych intermediatów
- Specyficzne reaktywne intermediaty
- Reaktywne intermediaty a peroksydacja lipidów
- Rola reaktywnych intermediatów w karcinogenezie.

Zakres omawianych zagadnień w recenzowanej monografii jest bardzo szeroki; oto niektóre z nich:

— Biochemiczne aspekty działania reaktywnych intermediatów, a w szczególności mechanizm i kinetyka ich wiązania w komórce z DNA, RNA i białkami. Problem ten omawiano w kilku referatach, autorstwa między innymi Jamesa i Elizabeth Millerów, którzy jako jedni z pierwszych wskazali na udział oksydaz mikrosomalnych w przemianach związków chemicznych w reaktywne intermediaty oraz udowodnili, że wiele karcinogenów i czynników mutagennych ulega przemianie w elektrofilne metabolity.

— Mechanizmy działania enzymów odpowiedzialnych za przemiany związków chemicznych w reaktywne intermediaty, w szczególności zaś mikrosomalnych monooksydaz oraz hydroksylazy węglowodorów aromatycznych:

- Inaktywacja reaktywnych intermediatów w wyniku działania takich enzymów jak UDP-glukuronylotransferaza, S-transferazy glutanonu i hydratasa epoksydowa
- Aktywacja *in vivo* hydrazyn, benzenu, benzopirenu, p-ksylenu itp. prowadząca do powstania reaktywnych metabolitów oraz przypuszczalne mechanizmy ich działania
- Interakcja niektórych karcinogenów z DNA ludzkich komórek
- Znaczenie wiązań kowalencyjnych w karcinogenezie
- Udział enzymów mikrosomalnych w chemicznej onkogenezie.

Książka wydana jest bardzo starannie. Każdy rozdział posiada obszerny przegląd aktualnego piśmiennictwa oraz syntetycznie opracowaną dyskusję. Tom zamyka krótkie podsumowanie całego Sympozjum, lista jego uczestników oraz wyczerpujący indeks rzeczowy. Książka stanowi cenną pozycję dla farmakologów, biologów i biochemików oraz wszystkich zainteresowanych problemami biotransformacji związków chemicznych.

B. Grzelakowska-Sztabert

Methods in Immunology

Red. J. S. Garvey, N. E. Cremer, D. H. Sussdorf

1977, Wyd. W. A. Benjamin, Inc., Advanced Book Program, Reading, Massachusetts, str. 23+545, 70 rycin, 50 tabel, cena \$ 27.50

Immunologia jako nauka o zjawiskach odpornościowych korzysta z wielu nauk podstawowych. Rozwój tej dziedziny z jej rozgałęzieniami (immunochemia, immunobiologia, immunogenetyka, immunofarmakologia, immunopatologia) jest szybki co zmusza do opracowywania nowych metod, względnie udoskonalania już istniejących. Zrozumiałe jest także, że są pewne podstawowe metody, które wytrzymują próbę czasu i nadal są stosowane.

Recenzowana książka stanowi trzecie wydanie, poszerzone i uzupełnione nowymi osiągnięciami. Książka składa się z sześciu części omawiających bardzo szczegółowo następujące zagadnienia:

- I — podstawowe metody
- II — przygotowywanie antygenów
- III — przygotowywanie surowic odpornościowych
- IV — izolowanie immunoglobulin, przeciwciał i ich podjednostek
- V — reakcje immunologiczne
- VI — przygotowywanie podstawowych odczynników

Obecne wydanie, w porównaniu z poprzednim z roku 1970, nie zawiera opisu metod rzadko używanych, natomiast inne metody zostały podane w formie zmodyfikowanej, są łatwiejsze do wykonania, bardziej precyzyjne, wymagają mniejszych ilości materiału potrzebnego do badań.

W okresie siedmiu lat, dzielących wydanie omawianej książki od poprzedniego wydania, zaszły poważne zmiany w różnych dziedzinach immunologii, a mianowicie powstało szereg nowych metod w badaniach immunochemicznych, w izolowaniu czynników odpornościowych, w biologicznych metodach służących do oznaczania funkcji komórki. Opracowano również takie metody jak ogniskowanie izoelektryczne (*isoelectric focusing*) i chromatografię powinowactwa (*affinity chromatography*) służące do izolowania makrocząstek. Dla oceny ilościowej antygenów i przeciwciał opisano elektroforezę w żelu zawierającym przeciwciała (*rocket electrophoresis*) i immunodyfuzję radialną (*radial immunodiffusion*).

W obecnym wydaniu uwzględniono badania podjednostek przeciwciała, izolowanie łańcuchów ciężkich (H) oraz lekkich (L). Opracowano nowy rozdział dotyczący badań komórek B, łącznie z takimi metodami jak test hemolizy w żelu (*hemolysis in gel*) — próba Jerne'ego, z jego modyfikacją w pojedynczej warstwie (*hemolysis in monolayer*) — próba Kennedy'ego, czy techniki pracy z przeciwciałami oznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi (*fluorescent antibody technique*). Ważnym zagadnieniem jest badanie wiązania antygeny przez pojedyncze komórki metodą rozetkową pośrednią, czy wykazywanie obecności antygenów błon komórkowych w teście cytotoksycznym, w obecności przeciwciał i komplementu. Przedstawiono również metody badania nadwrażliwości typu komórkowego (późnego) *in vivo* i *in vitro*, a mianowicie uczulenia kontaktowego, biernego przenoszenia reakcji tuberkulinowej, zahamowania migracji makrofagów, odporności transplantacyjnej, mieszanych hodowli limfocytów.

Reasumując recenzowana książka wprowadza biologów, biochemików i lekarzy w podstawowe pojęcia immunologii, podstawy i mechanizmy reakcji immunologicznych oraz ich przebieg w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Każdy rozdział poprzedzony został wprowadzeniem, po którym podany jest szczegółowy sposób wykonania metody i odnośniki literaturowe (do 1977 roku włącznie). Tekst jest dobrą prezentacją myśli i metodyki w immunologii ostatnich lat.

Książka ta powinna zainteresować pracowników placówek naukowych, klinicystów, jak również studentów wyższych lat biologii, medycyny i weterynarii.

B. Kędzierska

XVI Supplement Acta Histochemica

Red. Christoph Pilgrim; wyd. Gustav Fischer, Jena

Suplement XVI czasopisma „Acta Histochemica” zawierający materiały XVII Sympozjum organizowanego przez Towarzystwo Histochemiczne w zamku Korb, koło Bolzano, Italia, w październiku 1974 r. Temat Sympozjum: Standaryzacja i Obiektywizacja Wyników Badań Histochemicznych”.

Choć minęło parę lat od czasu, gdy odbyło się Sympozjum, materiały z tego Sympozjum nie straciły nic na ważności i pozostają nadal aktualne. Obejmują one referaty wygłoszone na czterech sesjach programowych poświęconych następującym zagadnieniom: autoradiografia ilościowa, cytofotometria impulsowa, morfometria tkanek, rytmika dobowa procesów biologicznych. Ostatnią, piątą grupę stanowią referaty na tematy dowolne, w znacznym stopniu związane jednak również z zasadniczą myślą przewodnią Sympozjum. Każdą sesję programową rozpoczynały referaty wygłoszone przez wybitnych specjalistów z danej dziedziny, które zaznaczały słuchaczy zarówno z osiągnięciami technicznymi, jak i z możliwościami zastosowania danej metody. Dla przykładu, zastosowanie odpowiednich standardów, odczytanie (metodą fotometryczną) i przetworzenie wyników uzyskanych przy użyciu autoradiografii pozwala nie tylko na wgląd w ogólną dynamikę syntezy różnych związków w komórce, lecz także na określenie liczby wyznakowanych cząstek w danej strukturze. Przy pomocy cytofotometrii impulsowej rejestruje się sygnały wysyłane pod wpływem promieniowania UV przez przepływającą zawiesinę komórek, których DNA został naznaczony związkami fluoryzującymi (najczęściej w wyniku reakcji typu r. Feulgena). Ponieważ sygnały te (impulsy) podlegają jednocześnie klasyfikacji, zależnie od stopnia intensywności światła, otrzymuje się gotowe histogramy. Pozwalają one na szybkie zorientowanie się, jaka jest w danej populacji częstość występowania komórek o zwiększonej zawartości DNA jądrowego, czyli o pobudzonej syntezie tego związku. Badania takie mają podstawowe znaczenie przy rozpoznawaniu bardzo wczesnych stadiów zmian nowotworowych.

Omawiana na trzeciej sesji morfometria jest metodą zapożyczoną do badań morfologicznych z geologii. Opiera się ona na zasadzie stereologicznej, sformułowanej w 1847 r. przez Delesse'a, wg której w danej formacji geologicznej procent powierzchni zajętej przez widoczne na jej przekroju inkluzje w przybliżeniu odpowiada procentowi objętości przez te inkluzje zajmowanej. Przeniesienie powyższej zasady do analizy zdjęć przekrojów komórki uzyskanych w mikroskopie elektronowym pozwala na ilościową ocenę różnicowania strukturalnego komórki.

Uzyskanie obiektywnych wyników — w przypadku wymienionych trzech różnych technik — zależy przede wszystkim od zastosowanego aparatu badawczego. Referaty sesji poświęconej rytmice dobowej zwróciły uwagę na cechę właściwą samemu obiektowi badań, której istnienie należy uwzględnić, jeżeli wyniki badań mają odpowiadać prawu „standaryzacji i obiektywizacji”. Z pośród wielu przykładów świadczących o zmianach natężenia różnych procesów metabolicznych w organizmie, związanych z rytmiką dobową, interesującą ilustrację stanowi stwierdzona w komórkach różnych narządów szczura rytmika procesów autofagicznych. Wyniki te uzyskano przy pomocy

oceny morfometrycznej powierzchni i objętości wakuolek autofagicznych widocznych na elektronogramach z danych narządów. Rezultaty tych badań dobitnie świadczą o tym, jak duże znaczenie ma rytmika pracy biologa (pobieranie prób, czas wykonania eksperymentu) dostosowana odpowiednio do rytmiki badanego przez niego obiektu! Natomiast zamieszczenie tych rezultatów w grupie referatów na tzw. tematy do wolne świadczy o tym, jak bardzo organizatorzy Sympozjum zadbali o zachowanie jego głównej linii tematycznej.

Całość materiałów wydana jest bardzo starannie, bogato ilustrowana schematami, wykresami i zdjęciami na wysokim poziomie technicznym. W zestawie bibliografii histochemicznej recenzowany tom stanowi wartościową pozycję.

A. Przetęcka

F. Pliquet, M. K. Solncev Thermolumineszentz biologischer Objekte

Seria Fortschritte der experimentalen und theoretischen Biophysik. Red. W. Beier; 1978, VEB Georg Thieme. Leipzig, stron 92, rycin 40, tabel 3, cena 29 M.

Tom 22 Postępów Eksperymentalnej i Teoretycznej Biofizyki poświęcony jest podstawom teoretycznym i technice doświadczalnej termoluminescencji oraz przykładom zastosowania termoluminescencji do badania obiektów biologicznych. Powstał on w wyniku współpracy specjalistów z dwóch renomowanych ośrodków biofizycznych — Instytutu Biofizyki Uniwersytetu im. Karola Marksa w Lipsku i Katedry Biofizyki Wydziału Fizyki MGU w Moskwie.

Zjawisko termoluminescencji wiąże się z transformacją, magazynowaniem i przekazywaniem energii, posiada więc kapitalne znaczenie w biofizyce. Zasada pomiarów termoluminescencji jest prosta: badaną próbkę oziębioną do niskiej temperatury np. ciekłego azotu wzbudza się promieniowaniem UV, X lub γ . Następnie po przerwanu wzbudzenia, rejestruje się świecenie wtórne (*nachstrahlung*) w tej samej temperaturze. Z kolei podwyższa się temperaturę próbki T ze stałą prędkością, przy czym w określonych zakresach temperatury, charakterystycznych dla danej próbki, obserwuje się maksima termoluminescencji. Położenie maksimów krzywych termoluminescencji $I = f(T)$ na skali T dostarcza informacji o energii aktywnej, szerokości pasma przewodzenia, a skład widmowy i kinetyka zaniku luminescencji oraz parametry maksimum jak np. amplituda i suma świetlna charakteryzują szybkość, wydajność i energetykę procesów wzbudzenia elektronowego i emisji promieniowania. Termoluminescencja posiada więc duże walory poznawcze, jednak w praktyce jej pomiary wymagają raczej skomplikowanej aparatury i precyzyjnej kontroli parametrów doświadczenia.

Całość książki została podzielona na 6 rozdziałów. Zgodnie z założeniami autorów i ograniczoną objętością książki, w sposób krótki lecz przystępny przedstawiono obecny stan wiedzy z danego zakresu, bez zbyt drobiazgowego wnikania w szczegóły, które mogłyby zaciemniać ogólny obraz omawianego zagadnienia. Równania, rysunki i tabele podane są z umiarem i dotyczą bardziej istotnych faktów. Na pierwszych 13 stronach pracy treściwie i przejrzysto podano wprowadzenie i teoretyczne podstawy termoluminescencji. Opis bazuje na schemacie poziomów elektronowych Jabłońskiego i modelu pasmowym kryształu. Zarówno stan wzbudzony jak i podstawowy zawarte są w obszarze energii wzbudzonych. Autorzy podają tok rozumowania, prowadzącego do wyprowadzenia podstawowych równań opisujących natężenie, kine-

tykę i energetykę termoluminescencji. Zgodność teorii z doświadczeniem zilustrowana jest krzywą termoluminescencji siarczanu adeniny. Na uwagę zasługuje przystępny opis metody frakcjonowanej termoluminescencji, w której próbkę poddaje się periodycznym cyklom ogrzewania i oziębiania, naniesionym na liniowo wzrastającą temperaturę próbki. Metoda ta, chociaż posiada wybitne walory poznawcze, nie znalazła szerszego zastosowania w biofizyce, głównie ze względu na wysoki stopień komplikacji technicznych. Część teoretyczną zamykają krótkie podrozdziały na temat gaszenia luminescencji, efektów tunelowych oraz czułości, dyspersji i zdolności rozdzielczej pomiarów termoluminescencji.

Technika eksperymentalna zajmuje 17 stron trzeciego rozdziału książki. Podano dokładne opisy i przejrzyste rysunki i fotografie elementów aparatury, szczególnie kryostatu i pojemnika na próbki. Dalej omówiono wymagania stawiane poszczególnym układom: próżniowemu, chłodząco-ogrzewającemu, wzbudzenia optycznego oraz układom rejestracji krzywych $T = f(t)$, $I = f(T)$ i $I = f(t)$. Rozdział ten zamyka obszerny opis techniki przygotowywania próbek, przeprowadzania pomiarów oraz wpływu warunków doświadczenia na parametry kinetyczne krzywych termoluminescencji. Należy zdać sobie sprawę, że aparatura do pomiarów termoluminescencji, składająca się z 28 zasadniczych podzespołów, nie należy do prostych. Jej zestawienie i eksploatacja wymaga dobrego przygotowania z zakresu elektroniki, optyki, techniki niskich temperatur i wysokiej próżni. Należy do tego dodać wysokie wymagania stawiane materiałom, pracującym w ekstremalnych warunkach i dużych gradientach.

Rozdział 4 omawia charakterystyczne właściwości termoluminescencji, takie jak widma wzbudzenia i luminescencji, „zużywanie” się próbki (*erschöpfung*) podczas wielokrotnych cykli pomiarów w wyniku reakcji fotochemicznych, efekty nasycania sygnału, obserwowane dla większych natężeń promieniowania wzbudzającego oraz efekty gaszenia. Te ostatnie wynikają z tworzenia asocjatów w stężonych roztworach np. powyżej 10^{-8} M ADP i ATP lub z kompleksowania organicznych ligandów np. cząsteczek ATP jonami metali np. Mn^{2+} . Gaszenie stężeniowe i gaszenie jonami o zmiennej wartościowości interpretowane jest jako migracja energii w obrębie asocjatów lub kompleksów, analogicznie do gaszenia fosforescencji. W ostatnich dwóch paragrafach tego rozdziału omówiono krótko zależność między promieniowaniem wtórnym (*nachstrahlung*) a termoluminescencją oraz szerokość połówkową maksimów termoluminescencji. Rozdział ten reprezentuje dużą wartość metodyczną i dydaktyczną. Parametry krzywych termoluminescencji zależą bowiem nie tylko od właściwości badanej substancji, lecz także od warunków pomiaru, sposobu przygotowania i historii próbki. Stanowi to równocześnie zaletę i wadę termoluminescencji jako metody badawczej. Możliwość zmiany wielu parametrów zwiększa pojemność informacyjną metody; wymaga jednak precyzyjnej kontroli tych parametrów, co komplikuje metodę pod względem technicznym.

Najobszerniejszy jest rozdział piąty, omawiający wyniki badania termoluminescencji układów biologicznych. Zajmuje on 19 stron druku i obejmuje termoluminescencję białek i kwasów nukleinowych oraz ich składników, tkanek zwierzęcych i roślinnych. Zestawiono to ponad 40 pozycji tabelarycznych, charakteryzujących termoluminescencję zasad azotowych, nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych. Niestety brak hipotez czy uogólnień syntetycznie ujmujących materiał doświadczalny i literaturowy. Znacznie lepiej ujęte są dane dotyczące termoluminescencji aminokwasów i białek zwłaszcza aromatycznych. Spektroskopowe, kinetyczne i termodynamiczne właściwości termoluminescencji tych związków autorzy interpretują w oparciu o schemat energii potencjalnej Jabłońskiego w ramach teorii Halperina i Branera, opisującej mono- i bi-molekularne procesy termoluminescencji zgodnie z modelem pasmowym fizyki ciała stałego. Podano tu również schemat poziomów energetycznych wyjaśniający termoluminescencję tyrozyny, ekscytonową in-

interpretację zjawiska oraz zwrócono uwagę na możliwość zachodzenia procesów fotochemicznych, prowadzących do chemiluminescencji.

Kolejne dwa podrozdziały charakteryzują termoluminescencję tkanek zwierzęcych, roślinnych oraz kultur erytrocytów, limfocytów, drożdży i komórek nowotworowych. Dość obszernie omówiono termoluminescencję tkanek organizmów fotosyntetyzujących, w szczególności chloroplastów, która okazała się pomocną w interpretacji procesów zachodzących w I i II układzie fotosyntetycznym.

Ostatni, szósty rozdział (3 strony) wskazuje na możliwości aplikacyjne metody termoluminescencji. Znajduje ona zastosowanie w fizyce ciała stałego, archeologii dla określenia wieku wykopalisk, dozymetrii promieniowania jonizującego i w badaniach biofizycznych. W tym ostatnim przypadku stanowić może metodę pomocniczą, uzupełniającą badania spektralne, ERP, CD i inne. W szczególności termoluminescencja jest predysponowana do badania energetyki i kinetyki pierwotnych procesów fizykochemicznych w oddziaływaniu promieniowania jonizującego z obiektami biologicznymi, w procesie fotosyntezy, właściwości energetycznych błon biologicznych i bioluminescencji, a więc wszędzie tam, gdzie istotną rolę odgrywają procesy transformacji i migracji energii. Przeszkodę w szerszym zastosowaniu metody termoluminescencji stanowi niewątpliwie brak wysokiej klasy aparatury dostępnej w handlu (pomijając proste dawkomierze termoluminescencyjne).

Książka jest napisana z dobrą znajomością przedmiotu i podaje obszerną literaturę, liczącą 117 pozycji (w tym także cytowane są prace polskich autorów). Powinna wzbudzić zainteresowanie wśród biofizyków i biologów różnych specjalności.

J. Stawiński

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1979

ARTICLES IN POLISH

Volume 25

Number 1

Władysław Więckowski — (1921—1978)—Obituary note (<i>M. Gniazdowski</i>)	3
R. Skórko—Enzymatic Binding of ADP-ribosyl Moiety to Proteins (Dept. Biochem., Inst. Biol., University of Gdańsk, Gdańsk)	5
L. Sadzińska — The Structure and Transcription of SV40 Virus (Dept. Tumor Biol., Inst. Oncology, Gliwice)	23
R. Farbiszewski, H. Gabryel—Role of Arginine in Regulation of Cellular Metabolism (Dept. Inorganic Chem., Inst. Chem. Biophys., Medical School, Białystok)	45
A. Szutowicz—Acetylcholine Synthesis in Synaptosomes (Dept. Clinical Biochem., Inst. Pathology, Medical School, Gdańsk)	59
M. Szulczyński, F. Domka — Dissimilatory Sulphate Reduction (Lab. Kinetics and Catalysis, Inst. Chem., University of Poznań, Poznań)	85
Meeting Report	101
Book reviews	103
Announcements	358

SPIS TREŚCI

Władysław Więckowski — (1921—1978) (<i>M. Gniazdowski</i>)	3
R. Skórko — Eenzymatyczne przyłączanie reszt ADP-rybozylowych do białek	5
L. Sadzińska — Struktura i transkrypcja wirusa SV40	23
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Rola argininy w regulacji metabolizmu komórkowego	45
A. Szutowicz — Synteza acetylocholino w synaptosomach	59
M. Szulczyński, F. Domka — Dysymilacyjna redukcja siarczanów. Sprawozdanie — Zjazd Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkankowej, Glasgow (<i>B. Czartoryska</i>)	85
Recenzje książek:	
Bioenergetics at Mitochondrial and Cellular Levels	103
Ergebnisse der experimentellen Medizin, t. 28	104
Phosphate Metabolism	105
Biological Reactive Intermediates, Formation, Toxicity and Inactivation	106
Methods in Immunology	107
XVI Supplement Acta Histochemica	108
Thermolumineszenz biologischer Objekte	109
Komunikaty:	
Redakcji	3
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	58

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

Piśmiennictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje 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.

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

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, 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 egz. 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 powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, 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 na 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: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny 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.

Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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

SPIS TREŚCI

Władysław Więckowski — (1921—1927) (<i>M. Gniazdowski</i>)	3
R. Skórko — Enzymatyczne przyłączanie reszt ADP-rybozylowych do białek	5
L. Sadzińska — Struktura i transkrypcja wirusa SV40	23
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Rola argininy w regulacji metabolizmu komórkowego	45
A. Szutowicz — Synteza acetylocholino w synaptosomach	59
M. Szulczyński, F. Domka — Dysymilacyjna redukcja siarczanów	85
Sprawozdanie — Zjazd Europejskiego Towarzystwa Hodowli Tkankowej, Glasgow (<i>B. Czartoryska</i>)	101
Recenzje książek:	
Bioenergetics at Mitochondrial and Cellular Levels	103
Ergebnisse der experimentellen Medizin, t. 28	104
Phosphate Metabolism	105
Biological Reactive Intermediates, Formation, Toxicity and Inactivation	106
Methods in Immunology	107
XVI Supplement Acta Histochemica	108
Thermolumineszenz biologischer Objekte	109
Komunikaty:	
Redakcji	3
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	58