

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 21 (4)
359-455 (1975)

1975

tom 21 nr 4



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych 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.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, 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), jego (ich) stanowisko(a) i miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

Dla przejrzystości tekstu korzystny jest często podział na rozdziały oznaczone liczbami rzymskimi. 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. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór 1 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 nie wprowadzanie do tekstu tworzonych do-raznie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Dr. Wojciech Rode

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1975 TOM 21 ZESZYT 4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 21(4)
359-455(1975)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),
B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa),
S. Lewak (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa),
I. Szumiel (Warszawa)

Adres Redakcji

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

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1975

Nakład 2.270 (2.159+111)

Ark. wyd. 7,5 ark. druk. 8,25

Pap. druk. sat. kl. V, 70 g 70×100

Zam. nr 900/75

B-34

Oddano do składania 9.VII.75.

Podpisano do druku w październiku 1975 r.

Druk ukończono w październiku 1975 r.

Cena zł 20.—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

KRZYSZTOF STAROŃ ^{*)}, ANDRZEJ JERZMANOWSKI ^{**)}

Physarum polycephalum jako model do badań biochemicznych cyklu komórkowego

Physarum polycephalum — the Model for Biochemical Investigations of the Cell Cycle

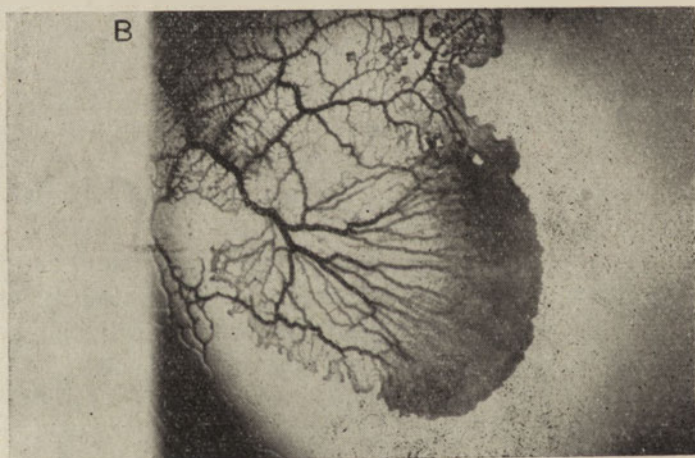
Spośród ogromnej ilości żyjących na Ziemi gatunków stosunkowo niewiele służy jako materiał badawczy w laboratoriach biochemicznych. Laboratoryjne organizmy „modelowe” zawdzięczają swój wybór zazwyczaj temu, że w rozwiązywaniu określonych problemów stanowią układ najwygodniejszy, co często oznacza — najprostszy. W ostatnich latach w grupie organizmów modelowych coraz większym zainteresowaniem cieszy się śluzowiec *Physarum polycephalum*. Dość niezwykle własności *P. polycephalum*, a zwłaszcza niektórych stadiów jego cyklu życiowego, stwarzają szczególne możliwości badań nad cyklem komórkowym, różnicowaniem, zjawiskiem ruchu i genetyką w organizmie eukariotycznym. Atrakcyjność tego organizmu jest tym większa, że może on rosnąć w pożywce płynnej, co pozwala na stosowanie w pełnym zakresie wygodnych technik mikrobiologicznych.

W artykule ograniczyliśmy się do dokładniejszego przedstawienia tylko tych możliwości, które stwarza wykorzystanie *P. polycephalum* w badaniach cyklu komórkowego. Zastosowanie tego organizmu eliminuje zasadniczą w tego typu badaniach trudność: niedostępność zjawisk mitotycznych dla metod biochemicznych, wynikającą z niewielkich rozmiarów komórek i braku synchroniczności zachodzących w nich procesów. W *P. polycephalum* podziały jąder są zsynchronizowane w naturalny i precyzyjny sposób w obrębie kilkucentymetrowego organizmu. Wielkość tego organizmu umożliwia swobodne stosowanie większości technik biochemicznych, zaś synchroniczność zachodzących w nim procesów pozwala na traktowanie go jako, w pewnym sensie, pojedynczej komórki.

^{*)}, ^{**)} Dr, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

I. Cykl życiowy i hodowla *P. polycephalum*

P. polycephalum należy do klasy śluzowców (*Myxomycetes*), grupującej organizmy charakteryzujące się występowaniem w fazie wegetatywnej w formie tak zwanego plazmodium, czyli bezkształtnego, wielojądrzastego skupiska protoplazmy (1).

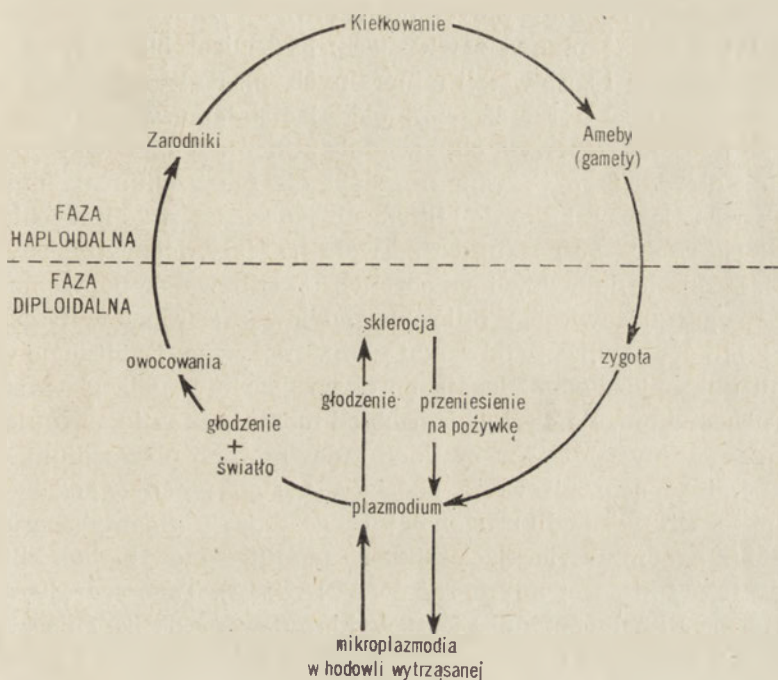


Ryc. 1. Plazmodium *Physarum polycephalum* na agarze:
A — odżywczym, (lub) B — nieodżywczym
Zdjęcia Z. Baranowski

Plazmodium *P. polycephalum* o charakterystycznej, intensywnie żółtej barwie, rozrasta się w obecności dostatecznej ilości pożywienia w regularny, kolisty twór o średnicy od kilku do kilkunastu centymetrów (2, 3) (Ryc. 1).

Niedostatek pożywienia powoduje fragmentację plazmodium na szereg połączonych ze sobą kanałów, wypełnionych poruszającą się rytmicznie protoplazmą i umożliwiających migrację plazmodium w kierunku pożywienia. Ruch protoplazmy, chociaż najłatwiejszy do zaobserwowania w czasie migracji, trwa przez cały okres życia plazmodium. Ruch ten jest najprawdopodobniej związany z obecnym w plazmodium białkiem, przypominającym własnościami aktomiozynę (2).

Całkowity brak pożywienia lub inne drastyczne zmiany środowiska (np. temperatury, wilgotności, ciśnienia osmotycznego, stężenia jonów metali) prowadzą do wytworzenia stwardniałych form przetrwalnikowych, tak zwanych sklerocjów (sclerotium) (4). Diploidalne sklerocja umieszczo-



Schemat 1. Uproszczony schemat cyklu życiowego *Physarum polycephalum* (1, 3, 7).

ne na powrót w korzystnych warunkach wytwarzają znowu diploidalne plazmodium. Cykl ten może powtarzać się wielokrotnie. Przejście w fazę haploidalną następuje dopiero w wyniku kilkudniowego głodzenia plazmodium z następującym kolejno dwu- czterogodzinnym okresem intensywnego naświetlania. Jądra przechodzą wówczas podział mejotyczny, a organizm wytwarza zarodniki. W korzystnym środowisku zarodniki *P. polycephalum* kiełkują, wydając jednojądrowe, haploidalne gamety. W tym stadium *P. polycephalum* może rozrastać się, dzielić i wytwarzać

swoiste formy przetrwalnikowe (cysty). Cykl życiowy zamyka połączenie się dwóch haploidalnych gamet w diploidalną zygotę. W wyniku kolejnych podziałów jądra zygota przekształca się w plazmodium.

Typowo heterotaliczne szczepy *P. polycephalum* Wisconsin i Indiana wytwarzają gamety dwóch przeciwstawnych typów płciowych: „+” i „-”. Diploidalna zygota powstaje w wyniku fuzji gamety „+” i gamety „-”, połączonej z kariogamią, to jest zlaniem się jąder obu gamet. Z zygoty tej rozwija się diploidalne plazmodium.

Znane są również homotaliczne szczepy Colonia. Produkują one gamety wyłącznie jednego rodzaju, które mogą łączyć się zarówno między sobą, jak i ze wszystkimi gametami wytwarzanymi przez szczepy heterotaliczne (5).

W warunkach laboratoryjnych do hodowli *P. polycephalum* stosuje się najczęściej pożywkę płynną zawierającą: hydrolizat białkowy, witaminy, glukozę, hematyną i zestaw soli mineralnych (6). Kultury umieszcza się w ciemności, w temperaturze 22—26°, poddając stałemu wytrząsaniu. Intensywne wytrząsanie zapewnia odpowiednie natlenienie pożywki i powoduje niezbędną dla dalszego wzrostu fragmentację plazmodium na mikroplazmodia, zawierające od kilku do kilkunastu jąder. Powstałe mikroplazmodia pasażuje się co 40—60 godzin, co pozwala na stały, logarytmiczny wzrost hodowli. Przejście do hodowli synchronicznej odbywa się poprzez naniesienie pipetą gęstej zawiesiny mikroplazmodiów z kultury wytrząsanej na krążek z bibuły, nawilżany od spodu płynną pożywką. Naniesione w postaci kropli mikroplazmodia ulegają po około godzinie fuzji, zlewając się w koliste plazmodium. Po 3—4 godzinach od momentu fuzji następuje pierwszy synchroniczny podział wszystkich jąder nowego plazmodium. Następne, w pełni zsynchronizowane podziały, następują co 8 godzin (7). Po trzech mitozach plazmodium stanowi swego rodzaju gigantyczną komórkę o średnicy 6—8 cm, zawierającą kilkanaście miligramów białka, kilka miligramów RNA i kilkaset mikrogramów DNA (2, 3). Tego rodzaju synchroniczna forma *P. polycephalum* jest zwykle używana do badania cyklu komórkowego.

II. Zmiany w chromatynie towarzyszące przejściu *P. polycephalum* ze stanu spoczynkowego do stadium podziałów

Regularne i synchroniczne mitozy zachodzą w plazmodium *P. polycephalum* przy zachowaniu optymalnej temperatury, wilgotności i w obecności wszystkich wymaganych składników pokarmowych. Zmiana tych warunków powoduje zahamowanie mitoz, a w dalszym etapie wytworzenie ścian komórkowych i przekształcenie plazmodium w sklerocja (Schemat 1). Zmianom morfologicznym towarzyszy wówczas szereg zmian metabolicznych (8). Zmiany te jednak można odwrócić przez przeniesienia *P. polyce-*

phalum z powrotem do korzystnego środowiska. *P. polycephalum* stanowi więc dogodny system modelowy, pozwalający na badanie procesów, które powodują, że w pozostającej dotychczas w stanie spoczynku komórce rozpoczyna się replikacja DNA, prowadząca w rezultacie do podziału mitotycznego.

Wśród przemian metabolicznych, towarzyszących przejściu komórki ze stanu spoczynkowego (sklerocja) w stan aktywnych podziałów (plazmodia), szczególnie interesujące są zmiany białkowych składników chromatyny. Zmiany te nie zachodzą wśród histonów, które są całkowicie stabilne w okresie różnicowania (9); występują natomiast wśród białek niehistonowych chromatyny. W czasie aktywacji chromatyny zmienia się profil elektroforetyczny białek niehistonowych (10, 11, 12). Zanikają niektóre z typowych pasm charakterystycznych dla chromatyny spoczynkowej; pojawiają się natomiast inne, odpowiadające pasmom znajduwanym w chromatynie aktywnej. Zmiany te zachodzą według określonego, powtarzalnego porządku, w ciągu kilku godzin.

P. polycephalum wytwarza dwie różne, nieaktywne mitotycznie formy: sklerocja oraz formę prowadzącą do powstawania zarodników (Schemat 1). Białka niehistonowe chromatyny izolowane z *P. polycephalum* w obu nieaktywnych mitotycznie stadiach różnią się między sobą znacznie mniej, aniżeli od białek niehistonowych chromatyny aktywnej (11). Wydaje się zatem, że swoisty skład białek niehistonowych chromatyny aktywnej ma związek ze zdolnością komórki do podlegania podziałowi mitotycznemu.

III. Replikacja, transkrypcja i synteza białka w czasie cyklu komórkowego *P. polycephalum*

Synchroniczność podziałów jąder w plazmodium *P. polycephalum* można obserwować za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym (7) lub, dokładniej, za pomocą mikroskopu elektronowego (13). Zdjęcia z mikroskopu elektronowego uwidaczniają zwłaszcza zachowanie się błony jądrowej w czasie podziału. Ulega ona co prawda częściowej dezintegracji w anafazie, lecz nie zanika całkowicie w czasie mitozy (13, 14). Zachowanie błony jądrowej w czasie mitozy jest ogólnie charakterystyczne dla diploidalnych form śluzowców, nie występuje natomiast u haploidalnych form tych samych gatunków (14).

Synchroniczności zjawisk dających się zaobserwować mikroskopowo towarzyszy w plazmodium *P. polycephalum* synchroniczność wielu procesów metabolicznych, a w szczególności tych, które związane są z replikacją, transkrypcją i biosyntezą białka.

Synteza DNA w *P. polycephalum* rozpoczyna się natychmiast po zakończeniu mitozy (nie obserwuje się wyraźnej fazy G₁) i trwa od 2,5 do

3 godzin. Poszczególne odcinki DNA genomu powstają w określonym porządku czasowym, identycznym w każdym cyklu komórkowym. Fakt ten można łatwo stwierdzić doświadczalnie stosując jednocześnie znakowanie DNA w tych samych momentach fazy S w kilku pokoleniach przy użyciu ^3H -tymidyny i bromodezoksyurydyny, co pozwala następnie na rozdzielanie nowo powstałych odcinków za pomocą ultrawirowania w gradiencie gęstości (15, 16). Ostatnie badania wykazują, że genom *P. polycephalum* jest zbudowany z co najmniej 10 jednostek (replikonów), z których każda może rozpocząć replikację dopiero po zakończeniu replikacji poprzedniej (17).

Po 2,5—3 godzinach od zakończenia podziału jądra szybkość syntezy DNA gwałtownie spada. Po zakończeniu tego okresu obserwuje się tylko minimalne włączanie znakowanych prekursorów do DNA, zachodzące z szybkością poniżej 1% szybkości syntezy bezpośrednio po podziale jądra (2).

Intensywność syntezy DNA jest zsynchronizowana z poziomem puli trójfosfodezoksyrybonukleozydów, który jest najwyższy na początku fazy S (18). Podobnej synchroniczności nie obserwuje się w przypadku puli trójfosforybonukleozydów i syntezy RNA. Poziom trójfosforybonukleozydów nie wykazuje praktycznie zmian w czasie cyklu komórkowego *P. polycephalum*, podczas gdy synteza RNA ma swój charakterystyczny rytm. Synteza RNA zachodzi jedynie w interfazie (faza S+G₂ u *P. polycephalum*) (19) i osiąga dwa wyraźne maksima: pierwsze w fazie S, około 2,5 godziny po zakończeniu mitozy i drugie, w fazie G₂, około 2 godziny przed kolejną metafazą (20). Zarówno w jednym, jak i w drugim okresie powstaje kilka rodzajów RNA. RNA syntetyzowany w fazie S powstaje jako wynik transkrypcji odcinków DNA bogatych w AT, podczas gdy RNA z fazy G₂ — odcinków zawierających przewagę GC (21). Synteza RNA w fazie S jest tylko częściowo hamowana przez aktynomycynę D w wysokim stężeniu (50—200 μg/ml), podczas gdy takie same stężenia aktynomycyny hamują całkowicie syntezę RNA w fazie G₂ (20). RNA zsyntezowane w obu fazach wykazują taką samą zdolność do hybrydyzacji z powtarzającymi się sekwencjami nukleotydu w DNA (22), lecz różnią się w zdolności do hybrydyzacji z sekwencjami unikalnymi (23).

Opisany rytm syntezy kwasów nukleinowych można obserwować zarówno w plazmodium *P. polycephalum*, jak i w jądrach wyizolowanych w poszczególnych odcinkach interfazy (faza S+G₂). Synteza DNA zachodzi wyłącznie w tych jądrach, które wyizolowano z plazmodiów znajdujących się w fazie S (24). Jądra wyizolowane w fazie S i G₂ syntetyzują również RNA o własnościach identycznych z RNA syntetyzowanym w odpowiadających fazach *in vivo* (21).

Ilość białka w plazmodium wzrasta w całym okresie faz S i G₂ w sposób jednostajny, choć włączanie znakowanej lizyny wykazuje pewien rytm, zbliżony do rytmu syntezy RNA (25). Rytm syntezy poszczególnych

białek wykazuje jednak bardziej złożony charakter. Szczególnie interesujące są zmiany w poziomie tych białek, które wydają się mieć bezpośredni związek z kontrolą replikacji DNA i podziału jądra.

Jak już wspomniano, aktywność polimerazy DNA w wyizolowanych jądrach zmienia się równolegle z rytmem syntezy DNA *in vivo*. Zjawisko to można zaobserwować tylko wówczas, jeżeli przeprowadza się reakcję w obecności egzogenego DNA i sperminy (24). Jednakże aktywność rozpuszczalnej polimerazy DNA wyekstrahowanej z jąder plazmodiów znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego jest podobna (26). Wydaje się zatem, że ilość polimerazy DNA w jądrze nie kontroluje aktywności procesu replikacji DNA. Ciągłość syntezy DNA uzależniona jest natomiast od syntezy określonych białek w fazie S. Doświadczenia z zastosowaniem inhibitora syntezy białka — cykloheksimidu — wykazują, że synteza kolejnych odcinków DNA jest kontrolowana przez białka powstające w ściśle określonych momentach fazy S (17).

Zakończenie replikacji DNA jest warunkiem koniecznym dla rozpoczęcia mitozy. Ostatni mRNA, niezbędny dla zainicjowania podziału, powstaje 35 min przed telofazą; ostatnie niezbędne białko — między piętnastą a siódmą minutą przed metafazą (2).

Badania cyklu komórkowego *P. polycephalum* wskazują wyraźnie, że czynnikiem bezpośrednio inicjującym mitozę jest białko. Proste doświadczenia *in vivo*, z użyciem całych plazmodiów, wskazują na charakterystyczne właściwości tego czynnika. Odznacza się on przede wszystkim termolabilnością. Przeniesienie na pół godziny plazmodiów znajdujących się w fazie G₂ z temperatury 26° do temperatury 37° powoduje bowiem opóźnienie mitozy. Podobne przeniesienie w fazie S nie wywiera wpływu na czas rozpoczęcia mitozy (27). Podział jąder w *P. polycephalum* można również opóźnić przez naświetlenie organizmu promieniami gamma. Opóźnienie jest największe, gdy plazmodia napromieniowuje się na kilkanaście minut przed mitozą. Napromieniowanie w okresie późniejszym nie ma już wpływu na moment rozpoczęcia podziału jąder (28).

Wykazanie, że czynnik kontrolujący rozpoczęcie mitozy jest pochodzenia cytoplazmatycznego zawdzięczamy prostym doświadczeniom Ruscha i wsp. (29), wykorzystującym zdolność zlewania się dwóch nałożonych na siebie plazmodiów w jeden organizm. W doświadczeniach tych posługiwano się dwoma plazmodiami o identycznej długości cyklu komórkowego, w których jednak mitozą rozpoczynała się w różnych momentach. W nowym plazmodium, powstałym ze zlania się dwóch identycznej wielkości plazmodiów wyjściowych mitozą zachodziła synchronicznie we wszystkich jądrach, po czasie będącym średnią z czasów brakujących do zajścia mitozy w każdym z plazmodiów wyjściowych. Jeżeli wielkość nałożonych na siebie plazmodiów miała się jak 2:1, mitozą była przyspieszona w stosunku do jednego i opóźniona w stosunku do drugiego, odpowiednio, w tej samej proporcji. Według Sachsenmaiera (30) o rozpoczęciu mitozy

w powstałym plazmodium decyduje stosunek ilości jąder do ilości syntetyzowanego od momentu zakończeniu poprzedniej mitozy białkowego czynnika inicjującego.

Interesujące prace Bradbury'ego i wsp. (31) wskazują, że białkowym czynnikiem bezpośrednio inicjującym mitozę prawdopodobnie jest enzym — kinaza histonu F1. Aktywność kinazy w wyizolowanych jądrach, mierzona w stosunku do egzogenego histonu F1, wzrasta w późnej fazie G₂, równolegle ze wzrostem ilości ufosforylowanego endogenego histonu F1. Jest charakterystyczne, że preinkubacja wyizolowanych jąder w temperaturze 37° powoduje wyraźny spadek aktywności fosforylacyjnej w stosunku do histonu F1. Fakt ten mógłby leżeć u podstaw opisanej poprzednio termolabilności czynnika inicjującego mitozę.

Według koncepcji Bradbury'ego i wsp. (31) kinaza histonu F1 odgrywa rolę bezpośredniego inicjatora mitozy. Histon F1 wiąże się z DNA słabiej niż pozostałe histony (F2a1, F2a2, F2b i F3). Fosforylacja reszt serynowych w histonie F1 powoduje, że znaczna część łańcucha polipeptydowego zostaje odsunięta od DNA dzięki wzajemnemu odpychaniu ujemnie naładowanych reszt fosforanowych DNA i fosfoseryny. Uwolniony w ten sposób fragment cząsteczki może oddziaływać z identycznym fragmentem F1, odłączonym od innego miejsca nici DNA. Tego rodzaju oddziaływania, tworząc wewnętrzne usieciowanie między włóknami nukleohistonowymi, prowadzą w efekcie do kondensacji całej rozproszonej chromatyny w zbite chromosomy. Koncepcja przypisująca taką funkcję fosforylacji histonu F1 potwierdza wcześniejsze obserwacje Mohberg i Ruscha (32), dotyczące korelacji między cyklem komórkowym *P. polycephalum* a modyfikacjami histonu F1.

IV. Uwagi końcowe

Naturalna synchroniczność podziałów jąder oraz szeregu przemian biochemicznych w plazmodiach *P. polycephalum* umożliwiła zbadanie rytmu zasadniczych procesów metabolicznych w czasie cyklu komórkowego. Badania w tym kierunku prowadzi się w dalszym ciągu. Stanowią one z jednej strony rozwinięcie przedstawionych w artykule badań przemian DNA (33, 34), RNA (35, 36, 37), niektórych enzymów (38, 39, 40) oraz całych pul metabolicznych (41); z drugiej zaś, dzięki opracowaniu nowych metod i technik, dotyczą zupełnie nowych zagadnień. W ostatnich latach ukazały się prace (42, 43) donoszące o próbach wyizolowania czystej chromatyny z *P. polycephalum*. Pozwala to przypuszczać, że wkrótce można będzie zastosować *P. polycephalum* jako model badań zachowania się chromatyny w czasie cyklu komórkowego, a w szczególności do badania biogenezy chromatyny i dziedziczenia białek chromatynowych w czasie podziału jądra. Nie mniej interesujące są perspektywy stwarzane przez postępy badań

genetycznych nad *P. polycephalum* (5). Zasadnicza trudność w izolowaniu mutacji indukowanych w haploidalnych amebach, a testowanych w diploidalnych plazmodiach, polegała dotychczas na uciążliwym łączeniu gamet „+” i „-” pochodzących ze szczepów heterotalicznych. Zastosowanie do izolowania mutantów homotalicznego szczepu *Colonia* pozwala na ominięcie tej trudności. Opracowuje się także metody hodowli haploidalnych ameb *Physarum* na zdefiniowanych pożywkach (44), co również ułatwia selekcję uzyskiwanych mutantów. Już obecnie wyizolowano szczepy *P. polycephalum* umożliwiające zupełnie nowe podejście do badań oddziaływań między jądrem a cytoplazmą (45). Najbardziej interesująca jednak, z punktu widzenia badań biochemii cyklu komórkowego, wydaje się możliwość uzyskania mutantów cyklu komórkowego.

Artykuł otrzymano 12.5.1975, po rewizji autorskiej przyjęto 16.6.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Z. Podbielkowski, I. Rejment-Grochowska, A. Skirgiełło. (1961), *Rośliny zarodnikowe*, str. 138—152, PWN, Warszawa.
2. H. P. Rusch, (1970), *Adv. Cell Biol.*, **1**, 297—327.
3. J. E. Cummins, H. P., Rusch, (1968), *Endeavour*, **27**, 124—129.
4. J. A. Jump, (1954), *Amer. J. Bot.*, **41**, 561—567.
5. J. Dee, (1973), w *Physarum polycephalum*, red. A. Hüttermann, str. 93—121, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
6. J. W. Daniel, M. H. Baldwin, (1964), w *Methods in Cell Physiology*, red. D. M. Prescott, t. 1, str. 9—41, Academic Press, New York.
7. E. Guttess, S. Guttess, (1964), w *Methods in Cell Physiology*, red. D. M. Prescott, t. 1, str. 43—54, Academic Press, New York.
8. A. Hüttermann, (1973), w *Physarum polycephalum*, red. A. Hüttermann, str. 55—76, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
9. J. Mohberg, H. P. Rusch, (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 418—432.
10. W. M. LeStrougeon, H. P. Rusch, (1971), *Science*, **174**, 1233—1236.
11. W. M. LeStrougeon, H. P., Rusch, (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 144—158.
12. W. M. LeStrougeon, C. Nations, H. P. Rusch, (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 861—872.
13. S. Guttess, E. Guttess, R. A. Ellis, (1968), *J. Ultrastructure Res.*, **22**, 508—529.
14. J. K. Ross, (1968), *Protoplasma*, **66**, 173—184.
15. R. Braun, C. Mittermayer, H. P. Rusch, (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 924—931.
16. R. Braun, H. Willi, (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 246—252.
17. J. J. Muldoon, T. E. Evans, O. F. Nygaard, H. H. Evans, (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **247**, 310—321.
18. D. Bersier, R. Braun, (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 463—471.
19. D. Kessler, (1967), *Exp. Cell Res.*, **45**, 676—680.
20. C. Mittermayer, R. Braun, H. P. Rusch, (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **91**, 399—405.

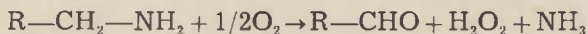
21. J. E. Cummins, H. P. Rusch, (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 124—132.
22. A. Zellweger, R. Braun, (1971), *Exp. Cell Res.*, **65**, 424—432.
23. H. Fouquet, R. Braun, (1974), *FEBS Letters*, **38**, 184—186.
24. E. N. Brewer, H. P. Rusch, (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 579—584.
25. C. Mittermayer, R. Braun, T. G. Chayka, H. P. Rusch, (1966), *Nature*, **210**, 1133—1137.
26. B. M. Jockusch, (1973), w *Physarum polycephalum*, red. A. Hüttermann, str. 39—54, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
27. E. N. Brewer, H. P. Rusch, (1968), *Exp. Cell Res.*, **49**, 79—86.
28. N. L. Oleinick, (1972), *Radiation Res.*, **51**, 638—653.
29. H. P. Rusch, W. Sachsenmaier, K. Behrens, V. Gruter, (1966), *J. Cell Biol.*, **31**, 204—209.
30. W. Sachsenmaier, V. Remy, R. Plattner-Schobel, (1972), *Exp. Cell Res.*, **73**, 41—48.
31. E. M. Bradbury, R. J. Inglis, M. R. Matthews, (1974), *Nature*, **247**, 257—261.
32. J. Mohberg, H. P. Rusch, (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 577—589.
33. A. Oppenheim, J. Wahrman, (1973), *Exp. Cell Res.*, **79**, 287—294.
34. E. Guttus, (1974), *J. Cell. Sci.*, **15**, 131—144.
35. P. W. Melera, H. P. Rusch, (1973), *Exp. Cell Res.*, **82**, 197—209.
36. P. W. Melera, H. P. Rusch, (1973), *Biochemistry*, **12**, 1307—1311.
37. P. W. Melera, C. Homeni, H. P. Rusch, (1974), *Biochemistry*, **13**, 4139—4142.
38. W. Sachsenmaier, D. v. Fournier, K. F. Gürtler, (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 655—660.
39. J. L. A. Mitchell, H. P. Rusch, (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 503—516.
40. J. L. A. Mitchell, M. J. Sedory, (1974), *FEBS Letters*, **49**, 120—124.
41. H. W. Sauer, E. M. Goodman, K. L. Babcock, H. P. Rusch, (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **195**, 401—409.
42. E. M. Bradbury, H. R. Matthews, J. McNaughton, H. V. Molgaard, (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **335**, 19—29.
43. B. M. Jockusch, I. O. Walker, (1974), *Eur. J. Biochem.*, **48**, 417—425.
44. H. R. Henney, M. Asgari, M. R. Henney, (1974), *Can. J. Microbiol.*, **20**, 967—970.
45. J. J. McCormick, (1974), *J. Cell. Biol.*, **62**, 227—231.

KAZIMIERZ KAMIŃSKI*), WOJCIECH MATUSZEWSKI**)

Różnorodne formy monoaminooksydazy

Multiple Forms of Monoamine Oxidase

Monoaminooksydaza (monoamina: O₂ oksydoreduktaza (dezaminująca) E.C.1.4.3.4.) — po raz pierwszy została opisana w 1928 r. (1) jako „tyramino-oksydaza”. W latach trzydziestych przypuszczano, że istnieje szereg enzymów wykazujących specyficzność substratową odpowiednią dla: tyraminy — „tyraminooksydaza”, adrenaliny — „adrenalinooksydaza” i amin alifatycznych — „oksydaza” amin alifatycznych (2—5). Dopiero później stwierdzono, że wszystkie te aminy utleniają się pod wpływem jednego enzymu w myśl reakcji:



Zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Unii Biochemicznej z 1964 roku, w celu odróżnienia od enzymów działających specyficznie na dwuaminy (np. oksydaza czy histaminaza — dwuaminooksydaza (DAO)), należy używać określenia oksydoreduktaza monoamina: tlen (dezaminująca) E.C.1.4.3.4.

Monoaminooksydaza (MAO) jest enzymem szeroko rozpowszechnionym, znaleziono ją w wielu tkankach i narządach oraz w płytkach krwi i w surowicy człowieka (6—13). W zależności od narządu przeważająca część MAO występuje bądź w mitochondriach bądź też w mikrosomach (np. w śliniankach i sercu występuje duża ilość mikrosomalnej MAO, natomiast w wątrobie i mózgu MAO znajduje się głównie w mitochondriach) (14—16). Stwierdzono, że MAO surowicy jest zdecydowanie różna od dwuaminooksydazy (DAO) i ceruloplazminy, a także nie jest identyczna z MAO mitochondrialną (10, 17—20). Ta ostatnia bowiem bierze udział w reakcji

*) Lek. med., Zakład Biochemii, Instytut Biologiczno-Fizjologiczny, Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Marksa 19, 41-808 Zabrze

**) Dr, I Klinika Położnictwa i Ginekologii, Instytut Położnictwa i Ginekologii, Śląskiej Akademii Medycznej, pl. Traugutta 6, 41-800 Zabrze.

Wykaz stosowanych skrótów: MAO — monoaminooksydaza, DAO — dwuaminooksydaza, 5HT — 5-hydroksytryptamina, FAD — dwunukleotyd flawino-adeninowy, SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu.

utleniania serotoniny, adrenaliny i noradrenaliny jak również amin alifatycznych, zaś MAO surowicy jedynie prostych amin alifatycznych (np. tyraminy, dopaminy, tryptaminy, kynuraminy) (17). Istnieją dane wskazujące, że MAO katalizuje przemianę aminoacetonu do metyloglioksalu w tzw. cyklu aminoacetonowym (21). Aminoaceton byłby więc jeszcze jednym naturalnym substratem tego enzymu.

Przez szereg lat badania właściwości MAO utrudniał fakt, iż enzym zawarty w mitochondriach jest nierozpuszczalnym fragmentem zewnętrznej powierzchni błony mitochondrialnej (22). W ostatnich jednak latach otrzymano z różnych źródeł rozpuszczalny preparat tego enzymu (23—29). Przyjmuje się obecnie, że kofaktorem enzymu jest FAD, przy czym na 120 000 g białka enzymatycznego przypada 1 mol FAD (28, 30—32). Istnieją dane wskazujące, że MAO jest białkiem zawierającym miedź (27), nadal niejasne jednak jest działanie miedzi na aktywność tego enzymu (33—35). Bardzo mała zawartość tego metalu lub jego brak nie wpływały bowiem na aktywność enzymu (28, 31, 36, 37). Dzięki badaniom *in vivo* przy użyciu ^{14}C -pentylaminy jako substratu stwierdzono, że na aktywność MAO wątroby szczura wpływa żelazo zawarte w pożywieniu (38). Metal ten wykryto w oczyszczonym preparacie enzymu z wątroby szczura i świni (28, 39).

Właściwości i metody oczyszczania MAO zostały omówione w wielu pracach (9, 29, 40—45). W niniejszym artykule zostaną przedstawione aktualne poglądy na heterogenność tego enzymu oraz przyczyny powstawania różnorodnych form MAO.

I. Wykrywanie izoenzymów MAO

Szereg pośrednich dowodów występowania w tkankach różnych form MAO dostarczyły badania nad wpływem różnych inhibitorów tego enzymu oraz stosowanie różnych substratów (33, 46—50). Monoaminooksydaza pochodząca z wątroby różnych gatunków zwierząt wykazuje istotne różnice dotyczące stopnia oksydacji, zależnie od użytego substratu (51). Charakterystyczne optimum pH (52) i optimum temperatury (53) MAO różnią się zależnie od stosowanego substratu (33, 48). Na podstawie obserwacji odmiennego stopnia hamowania aktywności MAO po podawaniu *in vivo* inhibitorów, stwierdzono występowanie izoenzymów MAO w mitochondriach mózgu ludzkiego i wątroby szczura (54—56).

Zastosowanie elektroforezy na żelu poliakryloamidowym pozwoliło rozdzielić różne formy MAO pochodzące z wątroby szczura i łożyska ludzkiego (37). Przy interpretacji wyników należy jednak brać pod uwagę możliwość hamowania aktywności MAO przez sole tetrazolowe użyte do wykrywania obecności enzymu. Pasma aktywności różnych form MAO

wykrywane na żelu poliakryloamidowym, metodą radioizotopową nie zawsze pokrywają się z pasmami aktywności zlokalizowanymi przy użyciu soli tetrazolowych (57—59). Rozdzielono także różne formy tego enzymu z wątroby i mózgu szczura metodą elektroforezy na octanie celulozy (60). Te obserwacje potwierdzają występowanie odmiennych form MAO w tkankach zwierząt różnych gatunków. Elektroforetyczny rozdział mitochondrialnej MAO w tkankach różnych gatunków zwierząt ilustruje tabela 1.

Tabela 1

Elektroforetyczny rozdział mitochondrialnej rozpuszczalnej MAO różnych gatunków i tkanek

Lp	Źródło enzymu	Formy anodowe*	Formy katodowe	Piśmiennictwo	
1	Szczur	wątroba	2, 3, 4, 7	1	60, 70, 71, 74
2		mózg	3, 4	1	67, 71
3		serce	3, 4	0	57, 71
4		macica	1	2	57, 65
5	Człowiek	mózg	2, 3	1	56, 73
6		wątroba	3, 4	1	70, 74
7		łożysko	2	1	37
8		płytki krwi	1	0	64
9	Świnia	mózg	1	0	66
10		wątroba	3	0	28
11	Wół	mózg	2	0	24
12		wątroba	1	2	63
13		rdzeń nadnerczy	4	1	57
14	Małpa	jelito	1	0	26
15	Kurczę	mózg	5, 6	1	36, 71
16	Larwa drapieżnej ropuchy szponiastej (<i>Xenopus laevis</i>)		1—4 (w zależności od stadium)	0	72

* Cyfry w rubrykach oznaczają liczbę pasm o aktywności MAO wędrujących ku anodzie lub katodzie.

Częściowo oczyszczone preparaty enzymu z wątroby szczura, wołu, królika przy użyciu Sephadex G-200 mają różne powinowactwo wobec stosowanych substratów (61). Fakt ten wskazywałby na specyficzność gatunkową MAO. Nieco później wykazano, że izoenzymy MAO wątroby szczura (62) i nadnerczy wołu (57) rozdzielone elektroforetycznie mają podobne masy cząsteczkowe. Natomiast izoenzymy wątroby wołu mają wyraźnie różne masy cząsteczkowe (63). Masę cząsteczkową rodzimego enzymu MAO i masy poszczególnych izoenzymów próbowało określić wielu badaczy (24, 28, 29, 35, 62—67). Dane dotyczące wartości mas cząsteczkowych różnych form MAO zostały zestawione w tabeli 2.

Tabela 2

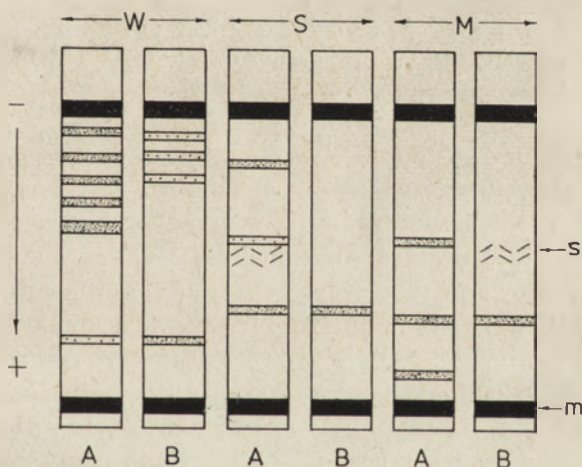
Porównanie mas cząsteczkowych różnych form MAO
(m. cz. $\times 10^5$)

Źródło enzymu	Rodzimy enzym	Formy anodowe				Formy katodowe		Pismienictwo
		1	2	3	4	1	2	
Szczer	1,5 lub 3,0	3,0	3,1	2,9				35, 62
	2,3	1,75						67,
		2,6			3,7	6,8		65,
Człowiek		4,0	4,0					64
		4,0						
Wół	4,0							24
	2,8							
	3,0				4,23	12,5		63
Świnia	1,2 lub 4,2	1,2						57
	1,1 lub 2,9							29, 66
								28

Jak widać z zestawienia uzyskane wyniki różnią się wyraźnie w zakresie od $1,2 \times 10^5$ do $12,5 \times 10^5$ (patrz tabela 2). Odmienne postaci enzymu występujące w wątrobie wołu (63) i świni (28) oraz macicy szczura (65), różnią się bardzo znacznie swoimi masami cząsteczkowymi. Tak więc, mimo że formy te pochodzą z tej samej tkanki, tego samego gatunku ich masy cząsteczkowe są różne. Obecnie przyjmuje się, że 1 mol flawiny (8α -cysteinyl) FAD) łączy się z $1,2 - 1,5 \times 10^5$ g białka MAO (68,69).

II. Właściwości różnych form MAO i ich specyficzność substratowa

W preparatach MAO wątroby ludzkiej oraz wątroby szczura stwierdzono obecność dwóch form enzymu, które oznaczono jako MAO₁ i MAO₂ (67, 70). Izoenzym o największej ruchliwości elektroforetycznej wędrujący ku katodzie oznaczono jako MAO₁. W obu tych tkankach formy te nie różnią się specyficznością substratową, podobne właściwości posiadają izoenzymy występujące w rdzeniu nadnerczy (57). Stwierdzono natomiast, że dwie formy MAO występujące w mózgu wołu zachowują się podobnie



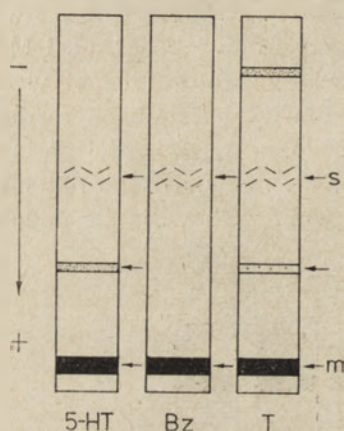
Ryc. 1. Porównanie obrazów elektroforetycznych MAO z różnych tkanek dorosłych (A) i młodych (B) szczurów.

Jako substratu używano tryptaminy (71).

m — czoło substancji wskaźnikowej,
s — niewybarwiona przestrzeń żelu,
W — wątroba, S — serce, M — mózg.

jeśli chodzi o oksydację kynuraminy, jednakże forma MAO₁ ma wyższe powinowactwo do tyraminy i tryptaminy a forma MAO₂ do benzylaminy i normetanefryny (24). Zaobserwowano badając właściwości MAO mózgu szczura, iż większą aktywność wykazuje enzym wobec benzylaminy niż wobec tyraminy (57, 67).

Dla wykrycia i określenia aktywności różnych form MAO mózgu szczura rozdzielonych elektroforetycznie użyto soli tetrazolowych (67, 71). W zarodkach kurzych oraz u piskląt wykazano obecność mniejszej liczby pasm enzymu niż u zwierząt dorosłych (36). Zauważono także, że liczba wykrywanych aktywnych form enzymu zależy od zastosowanego substratu. I tak przy użyciu tyraminy i kynuraminy jako substratów zaobserwowano 5 pasm aktywności, natomiast gdy zastosowano tryptaminę pojawiły się pasma aktywności o innej ruchliwości elektroforetycznej niż poprzednio (36). Analogiczną zależność zaobserwowano również w niektórych tkankach dorosłych i młodych (1, 2-dniowych) szczurów (71). (Ryc. 1, 2).



Ryc. 2. Diagram rozdziłu elektroforetycznego różnych form MAO otrzymanych z mózgu młodego szczura (71)

Użyto trzech substratów — 5-hydroksytryptaminy (5-HT), benzylaminy (Bz) i tryptaminy (T). Pozostałe oznaczenia jak na rycinie 1

Podobne zjawisko stwierdzono dla enzymu pochodzącego z kijanki południowoafrykańskiej drapieżnej ropuchy (*Xenopus laevis*) (72). Zmiany powyższe są traktowane jako wyraz specyficzności substratowej poszczególnych form. Wydaje się, iż pojawienie się większej liczby pasm aktywności enzymu i odmiennej ruchliwości elektroforetycznej w tkankach zwierząt dojrzałych wskazuje na występowanie pewnej zależności pomiędzy liczbą pojawiających się pasm aktywności a wiekiem zwierząt. MAO wątroby wołu została rozdzielona elektroforetycznie na trzy składniki, które określono jako formę A (nie zawsze występującą, wędrującą w kierunku anody) oraz stale występujące, wędrujące do katody — MAO₁ i MAO₂ (63). Formy występujące w wątrobie wołu nie są odpowiednikami form enzymu człowieka i szczura (67, 73, 74), które wędrują ku anodzie. Forma MAO₂ jest znacznie bardziej aktywna wobec tryptaminy i tyraminy niż MAO₁ i MAO_A. Forma A katalizuje reakcję utleniania noradrenaliny i adrenaliny znacznie wolniej niż pozostałe formy. Pomimo tych odmiennych cech własności antygenowe wszystkich trzech form okazały się identyczne (75—77). Około 80% mitochondrialnej MAO mózgu wołu ma własności antygenowe podobne do MAO wątroby. Pozostałe 20% nie reaguje z przeciwciałami MAO wątroby (77).

Y o u d i m i wsp. (74) rozdzielili MAO mózgu człowieka i szczura przy użyciu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym na cztery formy — 3 anodowe i pojedynczą katodową określaną jako MAO_R (57, 74). Formę tę wykryto także w innych tkankach np. w endometrium (57, 78). MAO_R występująca w mózgu posiada unikalną specyficzność wobec dopaminy — dlatego też określono ją jako „MAO dopaminy”. Najwyższą aktywność tej formy obserwowano w zwojach podstawnych mózgu człowieka (73). Obecne dane są jednak niewystarczające dla uznania tej formy jako „specyficznej MAO mózgu”.

Podawanie szczurom inhibitora MAO — klorgyliny pozwoliło stwierdzić w mózgu tych zwierząt obecność dwóch izoenzymów o odmiennej wrażliwości na ten związek (79). Forma A jest wrażliwa na klorgylinę, z łatwością dezaminuje oksydatywnie tyraminę i 5-hydroksytryptaminę, zaś forma B wykazuje stosunkowo małą wrażliwość na działanie klorgyliny i katalizuje jedynie reakcję utleniania tyraminy (forma A występuje w 90%). W górnym zwoju szyjnym forma A stanowi aż 90%, natomiast w szyszynce szczura występuje tylko 15% formy A i 85% formy B. Obecność tych dwóch form MAO została potwierdzona również przez innych autorów (80, 81).

Oczyszczona MAO z mitochondriów serca szczura była ostatnio przedmiotem badań przy użyciu elektroforezy na żelu poliakryloamidowym (57). Stwierdzono obecność trzech pasm anodowych, natomiast nie obserwowano pasma katodowego. Specyficzności substratowej tych form dotychczas nie zbadano.

III. Różnorodne formy MAO — przyczyny ich powstawania

W związku z wykryciem szeregu form MAO, pojawił się problem w jakim stopniu istnienie tych form zależy od stosowanych czynności preparatywnych. W wyniku działania ultradźwięków otrzymano fragmenty błony mitochondrialnej o wielkości od 50Å do 200Å (82). Fragmenty te można rozdzielić przy użyciu elektroforezy na żelu poliakryloamidowym na frakcje, które różnią się swoistością wobec takich substratów jak — tyramina, tryptamina, benzylamina czy serotonina. Zastosowanie detergentów (23, 57) pozwala także otrzymać fragmenty błon mitochondrialnych o wymiarze około 70Å, które rozdzielone elektroforetycznie dają różne pasma wykazujące aktywność MAO. Na podstawie tych wyników sugerowano, że różne formy MAO mogą reprezentować pojedynczy enzym połączony z różnym fragmentem błony mitochondrialnej (82, 83). Wydaje się jednak, że izoenzymy MAO wątroby szczura lub mózgu kurczęcia występują stale bez względu na to, czy stosowano detergenty niejonowe, czy też ultradźwięki (36, 57, 60). Istotny również jest fakt, że uzyskiwane dotychczas wyniki są powtarzalne.

Preparaty MAO wątroby świni wykazują szereg cech charakterystycznych dla fosfolipidów i kardiolipidów (84, 85). Wnioskowano zatem, że źródłem powstawania różnych form molekularnych MAO jest powiązanie białka enzymu z odmiennymi rodzajami lipidów. Przedstawiono ostatnio dane sugerujące, że różne formy MAO z nadnerczy wołu powstają w wyniku połączenia cząsteczek białka enzymatycznego z różnymi fosfolipidami (57). W każdej z pięciu form MAO wątroby szczura zawartość fosfolipidów jest stosunkowo niska. Najmniejszą ilość stwierdzono w najszybciej wędrującym pasmie „anodowym” (MAO₄) oraz w pasmie „katodowym” MAO_R. Najwyższą zawartość fosfolipidów wykazywało powstające na starcie pasmo MAO₁. Wydaje się zatem, że można wiązać fakty występowania izoenzymów MAO z obecnością różnych ilości fosfolipidów (57), pomimo, że pomiędzy zawartością fosfolipidów a ruchliwością elektroforetyczną jest niewielka zależność. Składnik lipidowy wydaje się być niezbędny nie tylko do stabilizacji enzymu, ale także dla jego pełnej aktywności. Potwierdzają to badania, w których przedłużenie dializy preparatu enzymu z 1,25% Tritonem X-100 spowodowało częściową inaktywację enzymu. Obserwowano także redukcję ilości aktywnych form MAO (62). Podobne zjawisko zachodziło przy stosowaniu 1% SDS. Natomiast inkubacja oczyszczonego preparatu MAO nerki wołu z fosfolipazą A nie wpływała wcale na aktywność enzymu, podczas gdy zastosowanie fosfolipazy B obniżało aktywność enzymu i redukowało liczbę pasm do jednego (23, 57). Możliwe, że badania zawartości lipidów w preparatach MAO, które wydają się być jednorodne podczas elektroforezy na żelu poliakryloamidowym np. MAO jelita mały (26), mózgu świni (66), płytek krwi człowieka (64), mogą wyjaśnić problem udziału składnika lipidowego w tworzeniu różnorodnych form MAO. Heterogenność MAO może być związane również z istnieniem różnych typów mitochondriów (42, 88, 89).

Niejednorodność MAO może wynikać także z różnego stopnia polimeryzacji pojedynczej aktywnej jednostki enzymu (28, 57, 63). Wiadomo, że zjawisko to jest przyczyną heterogenności innych enzymów np. dehydrogenazy glutaminianowej (90). Wydaje się, że różne formy MAO występujące w macicy szczura są polimerami. Wskazuje na to rozdział częściowo oczyszczonego enzymu tej tkanki na żelu Sephadex G-200, który wykazał obecność trzech szczytów aktywności. Masy cząsteczkowe tych form określono odpowiednio jako 175 800, 371 500 i 675 000 (57, 65).

Innym dowodem tworzenia się odmiennych form enzymu może być połączenie różnych typów podjednostek enzymu, MAO z wątroby szczura w obecności 8M mocznika lub 1% SDS dysocjuje na podjednostki o podobnej masie (78 000) (57). Podjednostki uzyskane w ten sposób różnią się ruchliwością elektroforetyczną na żelu poliakryloamidowym. Może okazać się, że analogicznie jak w przypadku izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (91) MAO posiada więcej niż jeden typ podjednostek.

W przypadku izoenzymów LDH mleczanowej również sądzono, że po-

wstają one w wyniku zmian konformacyjnych w cząsteczce białka składającego się z identycznych podjednostek (92). Nie można wykluczyć, że zmiany konformacyjne są odpowiedzialne za wielopostaciowość MAO. Istnieją bowiem sugestie (93), że niejednorodność elektroforetyczna może być spowodowana utlenianiem grup sulfhydrylowych enzymu (23, 31, 93), ale obecność jednak 0,1 molowego 2-merkptoetanolu nie wpływała na ruchliwość elektroforetyczną preparatu (62).

IV. Wpływ hormonów na aktywność MAO

Aktywność MAO regulują gruczoły wydzielania wewnętrznego — przysadka, podwzgórze, gruczoły płciowe. Potwierdzają ten fakt liczne prace (78, 94—100). Interpretację zmian w specyficznej aktywności MAO komplikuje fakt istnienia różnych form MAO. Sugeruje się, że zmiany specyficznej aktywności enzymu zaobserwowane po podaniu hormonów (progesteron i estradiol) pochodzą z ilościowych zmian w pojedynczych formach enzymu (65). Elektroforeza na żelu poliakryloamidowym, częściowo oczyszczonego enzymu pochodzącego z macicy szczura, wykazała obecność pojedynczego pasma wędrującego ku anodzie (MAO_I) oraz tylko dwóch pasm wędrujących ku katodzie (MAO_{II} i MAO_{III}). Po podaniu zwierzętom progesteronu lub estradiolu pasma MAO_I i MAO_{II} miały podobną aktywność jak w preparatach kontrolnych, natomiast zwiększała się aktywność MAO_{III}. Pasma MAO_{III} miało wyraźnie mniejszą aktywność u zwierząt traktowanych estradiolem, natomiast dziesięciokrotnie większą w grupie zwierząt otrzymujących progesteron (57, 65). Zmiany aktywności całkowitej MAO pod wpływem podawania hormonów są podobne w homogenatach jak i preparatach częściowo oczyszczonych (65, 78).

V. Inhibitory monoaminooksydazy

Inhibitorom MAO poświęcono bardzo dużo artykułów przeglądowych, dotyczących zarówno chemii tych związków jak i zastosowania klinicznego (101—105). Kwestia leków hamujących aktywność MAO jest nadal szeroko dyskutowana. Pierwszym inhibitorem MAO wprowadzonym do lecznictwa był iproniazyd (106). Ten tuberkulostatyk i inhibitor MAO odznacza się pobudzającym działaniem na ośrodkowy układ nerwowy. Obecnie ilość inhibitorów MAO znacznie wzrosła. Do najczęściej używanych należą oprócz wspomnianego już iproniazylu (Marsylid), Tersawid (1-benzyl-2-piralołohydrazyna), Catron (α -metylofenetylołohydrazyna), Nialamid oraz Nardil. Z punktu widzenia farmkologicznego należy podkreślić, że żaden z dotychczas poznanych inhibitorów MAO nie hamuje tego enzymu w sposób wybiórczy (107).

Ostatnie badania dotyczą grupy nowych inhibitorów MAO takich jak: Klogrylina (79—81), Deprenyl (108) czy M-cyklofenoksyetylamina (109). Inhibitory te mają jedną wspólną właściwość — wykres zależności między stopniem hamowania aktywności MAO wyrażonym w procentach a stężeniem inhibitora ma postać dwóch krzywych sigmoidalnych połączonych wspólnym poziomym odcinkiem (110). W tym zakresie stężenia inhibitora procent hamowania aktywności enzymu jest niezmienny. O takim przebiegu krzywej decyduje obecność wspomnianych uprzednio dwóch form o różnej wrażliwości w stosunku do inhibitorów (formy te określano jako A i B) (79—81, 111, 112).

Tabela 3

Wpływ podawania różnych inhibitorów na aktywność MAO mózgu człowieka

Inhibitor	tkanka	Klogrylina		Tranilcypromina		Izokarboksazyd	
		ZP	KM	ZP	KM	ZP	KM
izoenzym							
		Kynuramina					
MAO	1	40	37	80	78	92	92
	2	40	45	100	95	94	95
	3	15	30	86	70	27	20
	R	0	0	50	60	5	23
		Tyramina					
MAO	1	20	17	89	95	86	85
	2	0	21	78	77	86	85
	3	30	35	14	15	13	23
	R	0	11	0	0	10	7
		Tryptamina					
MAO	1	20	10	100	60	87	90
	2	0	17	81	87	70	92
	3	0	0	20	27	43	33
	R	0	0	11	13	20	20
		Dopamina					
MAO	1	12	5	47	45	50	55
	2	14	13	51	50	61	75
	3	20	0	33	40	13	18
	R	5	0	28	25	0	15

Liczby przedstawione w tabeli wyrażają aktywność MAO w odsetkach aktywności kontrolnej. Kontrolę stanowiła aktywność w mózgu ludzi nieleczonych inhibitorami MAO. Mózg pobierano w 12 godz. po — śmierci pacjenta. Rozdział izoenzymów przeprowadzono na żelu poliakryloamidowym. Aktywność izoenzymów MAO określano stosując jako substrat: ^{14}C -kynuraminę, ^{14}C -tyraminę i ^{14}C -tryfaminę i ^{14}C -dopaminę (wg 56).

ZP — zwój podstawowy mózgu ludzkiego

KM — kora mózgu człowieka

Jak już wspomniano (rozdział II), jeden z izoenzymów MAO mózgu — MAO_R, wydaje się katalizować głównie dezaminację dopaminy i jego swoistość jest bardzo duża (57). Dotychczas stwierdzono tylko jeden inhibitor MAO (tranilcyprominę) inaktywujący ten izoenzym (56). Nieefek-

tywność terapeutyczna inhibitorów MAO w licznych schorzeniach, wydaje się być właśnie wynikiem istnienia różnych form enzymu posiadających własne preferencje substratowe. Badania dotyczące różnej wrażliwości izoenzymów MAO na inhibitory są obecnie bardzo wyrwykawe. Efekt działania trzech inhibitorów na aktywność różnych form MAO izolowanych z zwoju podstawnego oraz z kory mózgu człowieka przy zastosowaniu różnych substratów przedstawia tabela 3.

Widać wyraźnie, że pod względem działania inhibitory MAO nie stanowią grupy jednolitej, ale nadzwyczaj różnorodną. Stąd też nic dziwnego, że ich wpływ na zachowanie zwierząt oraz działanie farmakologiczne jest niejednakowe (101, 105, 107).

Heterogenność enzymów jest zjawiskiem powszechnym będącym wyrazem przystosowania się tkanek i narządów do pewnych określonych warunków środowiska. Poszczególne formy danego enzymu różnią się najczęściej właściwościami istotnymi z punktu widzenia regulacji procesów metabolicznych. Różne formy MAO mają charakterystyczne rozmieszczenie tkankowe i odmienną specyficzność substratową, mogą więc kontrolować wewnątrzkomórkowe stężenie monoamin. Nasuwa się jednak pytanie w jakich miejscach organizmu żywego i w stosunku do których monoamin enzym spełnia te funkcje. Częściową odpowiedź na drodze empirycznej otrzymaliśmy już analizując wyniki stosowania terapii różnymi inhibitorami MAO. Być może, odkrycie inhibitorów MAO działających swoiście na poszczególne izoenzymy MAO pozwoli pogłębić wiedzę o ich roli.

Artykuł otrzymano 3.1.1975, po rewizji autorskiej przyjęto 2.5.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Hare M. L., (1928), *Biochem. J.*, **22**, 968—979.
2. Blaschko H., Richter D., Schlossmann H., (1937), *Biochem. J.*, **31**, 2187—2196.
3. Kohn H. I., (1937), *Biochem. J.*, **31**, 1693—1704.
4. Pugh C. E., Quastel J. M., (1937), *Biochem. J.*, **31**, 286—291.
5. Pugh C. E., Quastel J. M., (1937), *Biochem. J.*, **31**, 2306—2321.
6. Richter O., (1937), *Biochem. J.*, **31**, 2022—2024.
7. Hagen P., Weiner N., (1959), *Fed. Proc.*, **18**, 1005.
8. Fisher A. G., Schulz A. R., Oliner L., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 460—471.
9. Matuszewski W., Winter R., (1972), *Diag. Lab.*, **3**, 227—232.
10. McEwen C. M., Cohen J. O., (1963), *J. Lab. Clin. Med.*, **62**, 766—776.
11. McEwen C. M., Cohen J. O., (1964), *J. Lab. Clin. Med.*, **64**, 540—545.
12. Waroński W., Stęplewski Z., Turzański L., (1970), *Ginecol. Pol.*, **1**, 187—190.
13. Hidaka H., Nagatsu T., Nagasaka A., Ishizuki Y., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **23**, 383—385.
14. Weiner N., (1960), *J. Neurochem.*, **6**, 79—86.

15. Bodanski D. F., Weissbach H., Udenfriend S., (1957), *J. Neurochem.*, **1**, 272—275.
16. Champlain J., Mueller R., Axelrod J., (1969), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **166**, 339—345.
17. McEwen C. M. Jr., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2003—2010.
18. McEwen C. M. Jr., Sasaki G., Lenz W. R. Jr., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5217—5225.
19. McEwen C. M. Jr., Sasaki J. G., Jones D. C., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3952—3962.
20. McEwen C. M. Jr., Sasaki J. G., Jones D. C., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3963—3972.
21. Winter R., Jerzykowski T., Matuszewski W., Otrzonsek N., (1973), *Bull. Acad. Pol. Sci.*, **5**, 321—329.
22. Schnaitman G., Erwin V. G., Greenawalt J. W., (1967), *J. Cell. Biol.*, **34**, 719—735.
23. Erwin V. G., Hellermann L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4230—4238.
24. Harada M., Mizutani K., Nagatsu T., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 559—569.
25. Hollunger G., Orelan L., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **139**, 320—328.
26. Murali D. K., Radhakrishnan A. N., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 61—70.
27. Nara S., Gomes B., Yasunobu K. T., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2774—2780.
28. Orelan L., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **146**, 410—421.
29. Tipton K. F., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 103—107.
30. Nara S., Jgaue B., Gomes B., Yasunobu K. T., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 324—328.
31. Tipton K. F., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 451—459.
32. Youdim M. B., Sourkes T. L., (1971), *Biochem. J.*, **121**, 20P.
33. Gorkin V. Z., (1966), *Pharmacol. Rev.*, **18**, 115—120.
34. Akopyan Zh. I., Veryovkina I. V., Levyant M. I., Moskvitina T. A., Gorkin V. Z., Orekhovich V. N., (1971), *Int. J. Protein Res.*, **3**, 121—130.
35. Sourkes T. L., (1968), *Adv. Pharmacol.*, **6A**, 61—69.
36. Shih J-H., Eiduson S., (1969), *Nature*, **224**, 1309—1310.
37. Youdim M. B., Sandler M., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 43P.
38. Symes A., Missala K., Sourkes T. L., (1971), *Science*, **174**, 153—155.
39. Youdim M. B., Sourkes T. L., (1966), *Can. J. Biochem.*, **44**, 1397—1400.
40. Gabay S., Valcourt A. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 440—450.
41. Norstrand I. F., Glantz M. D., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 1—11.
42. Tufvesson G., (1970), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **25**, 231—235.
43. Tufvesson G., (1969), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **23**, 71—77.
44. Yamada H., Gee P., Ebata E., Yasunobu K., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **81**, 165—171.
45. Tatyanyenko L. V., Gvozdev R. J., Lebedeva O. J., Vorobyov L. V., Gorkin V. Z., Yakovlev V. A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 23—35.
46. Gorkin V. Z., (1969), *Experientia*, **2**, 1142—1143.
47. Gorkin V. Z., Komisarowa N. V., Lerman M. I., Veryovkina I. V., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 383—389.
48. Gorkin V. Z., Romanowa L. A., (1959), *Biokhimiya*, **24**, 826—832.
49. Hardegg W., Heilbronn E., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 553—559.
50. Squires R. F., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1401—1409.

51. Alles G. A., Heegard E. V., (1943), *J. Biol. Chem.*, **147**, 487—494.
52. Barbato L. M., Abood L. G., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 531—541.
53. Youdim M. B., Sourkes T. L., (1965), *Can. J. Biochem.*, **43**, 1305—1318.
54. Collins G. G. S., Youdim M. B. H., Sandler M., (1972), *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1995—1998.
55. Youdim M. B., Collins G. G., Sandler M., (1971), *Biochem. J.*, **121**, 34P—36P.
56. Youdim M. B., Collins G. G., Sandler M., Bevan Jones A. B., Pare C. M., Nicholson W. J., (1972), *Nature*, **236**, 225—228.
57. Sandler M., Youdim M. B., (1972), *Pharmacol. Rev.*, **24**, 331—348.
58. Lagnado J., Okamoto M., Youdim M. B. H., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 177—180.
59. Glenner G. C., Burtner H. J., Brown G. W., (1957), *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, 591—600.
60. Kim H. C., D'Iorio A., (1968), *Can. J. Biochem.*, **46**, 295—297.
61. Ragland J. B., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 203—208.
62. Youdim M. B., Collins G. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 73—78.
63. Gomes B., Igaue I., Kloepter H. G., Yasunobu K. T., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 16—27.
64. Collins G. G., Sandler M., (1971), *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 289—296.
65. Collins G. G. S., Southgate J., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 38P.
66. Tipton K. F., Spires I. P., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2137—2141.
67. Youdim M. B., Collins G. G., Sandler M., (1969), *Nature*, **223**, 626—628.
68. Kearney E. B., Salach J. I., Walker W. H., Seng R. L., Kenney W., Zeszotek E., Singer T. P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **24**, 321—327.
69. Walker W. H., Kearney E. B., Seng R. L., Singer T. P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **24**, 328—331.
70. Collins G. G. S., Youdim M. B. H., Sandler M., (1968), *FEBS Letters*, **1**, 215—218.
71. Shih J.-H., Eiduson S., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1221—1227.
72. Baker P. C., (1971), *Experientia*, **27**, 245—246.
73. Collins G. G. S., Sandler M., Williams E. D., Youdim M. B. H., (1970), *Nature*, **225**, 817—820.
74. Youdim M. B., Collins G. G. S., Sandler M., (1970), W Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp. 18, Enzymes and Isoenzymes, red. Shugar D., str. 281—289, Academic Press, London.
75. Hartman B. H., Kloepter H. G., Yasunobu K. T., (1969), *Fed. Proc.*, **28**, 857.
76. Hartman B. H., Yasunobu K. T., Udenfriend S., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 797—804.
77. Hidaka H., Hartman B. H., Udenfriend S., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **147**, 805—809.
78. Collins G. G. S., Pryse-Davies J., Sandler M., Southgate J., (1970), *Nature*, **226**, 642—643.
79. Johnson J. P., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 1285—1297.
80. Hall D. W., Logan B. W., (1969), *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1955—1959.
81. Hall D. W., Logan B. W., Parsons G. H., (1969), *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1447—1454.
82. Veryovkina N., Gorkin V. Z., Mityushin V. M., Elpiner I. E., (1964), *Biophysics*, **9**, 503—506.
83. Tipton K. F., Houslay M. D., Garrett N. J., (1973), *Nature, New Biology*, **246**, 213—214.
84. Goridis C., Neff N. H., (1971), *Brit. J. Pharmacol.*, **43**, 814—818.

85. Oreland L., Olivecrona T., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 710—714.
86. Gawron O., Mahajan K. P., Limetti M., Kananen G., Glaid A. J., (1966), *Biochemistry*, **5**, 4111—4119.
87. Sekuzu I., Jurtshuk P., Green D. E., (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 71—75.
88. Blokhuis G., Veldstra H., (1970), *FEBS Letters*, **11**, 197—199.
89. Neidle A., Van Den Berg. G. J., Grynbaum A., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 225—234.
90. Bitensky M. W., Yielding K. L., Tomkins G. M., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1077—1082.
91. Mann K. G., Vestling G. S., (1970), *Biochemistry*, **9**, 3020—3025.
92. Kaplan N. O., (1968), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **151**, 382—399.
93. Gomes B., Naguwa G., Kloepter H. G., Yasunobu K. T., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 28—33.
94. Cavanaugh M. J., Zeller E. A., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, 814.
95. Holzbauer M., Youdim M. B. H., (1972), *Brit. J. Pharmacol.*, **44**, 355P—356P.
96. Kamberi J. A., Kobayashi Y., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 260—268.
97. Wurtman R. J., Axelrod J., (1963), *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 1417—1419.
98. Zolovick A. J., Pearse R., Boehlke K. W., Eleftherion B. E., (1966), *Science*, **154**, 649—651.
99. Matuszewski W., Kamiński K., Waroński W., (1974), *Ginecol. Pol.*, **45**, 609—612.
100. Waroński W., Kamiński K., Matuszewski W., (1975), *Endokrynol. Pol.* (w druku).
101. Vetulani J., (1973), *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **27**, 725—780.
102. Blaschko H., (1964), w *Progress in Brain Research*, red. Himwich, H. E., Himwich W. A., t 8, str. 1—16. Elsevier, Amsterdam.
103. Biel J. H., Horita H., Drukker A. E., (1964), w *Psychopharmacological Agents*, red. M. Gordon, t 1, str. 359—369. Academic Press, New York.
104. Kopin I. J., (1966), *Pharmacol. Rev.*, **18**, 513—523.
105. Pletscher A., (1966), *Pharmacol. Rev.*, **18**, 121—129.
106. Zeller E. A., Barsky J., (1952), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **81**, 459—461.
107. Scherbel A. L., (1961), *Arch. Int. Med.*, **107**, 37—42.
108. Knoll J., Magyar K., (1972), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 393—408.
109. Fuller R. W., (1972), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 339—354.
110. Sandler M., Youdim M. N., (1974), *Int. Pharmacopsychiat.*, **9**, 27—24.
111. Squires R. F., (1972), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 355—370.
112. Neff N. H., Goridis C., (1972), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 307—323.

JOANNA KWAST-WELFELD *)

Regulacja aktywności kinaz białkowych

Regulation of the Activity of Protein Kinases

Po raz pierwszy zwrócono uwagę na istnienie kinaz białkowych w trakcie badań glikogenolizy aktywowanej poprzez cAMP w mięśniach ssaków (1, 2). Jednak dopiero w parę lat później ustalono mechanizm aktywacji glikogenolizy przez cAMP i określono rolę, jaką w tym procesie odgrywa kinaza białkowa (3, 4). Kontynuacja tych badań doprowadziła do wyjaśnienia mechanizmu aktywacji kinaz białkowych przez cAMP (5, 6, 7, 8,) oraz do częściowego zbadania struktury jak i innych właściwości tych enzymów (9, 10, 11, 12,). Udział kinaz białkowych w różnorodnych procesach w komórce (13, 14, 15, 16, 17, 18) nasunął przypuszczenie, że są one pośrednikiem wielu, jeśli nie wszystkich funkcji pełnionych przez cAMP (19).

Kinazy białkowe badane w warunkach *in vitro*, w zależności od stopnia oczyszczenia i źródła pochodzenia preparatu, mogą być aktywowane przez inne cykliczne nukleotydy (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26), jak i niektóre ich pochodne (27, 28, 29, 30). Aktywność kinaz białkowych regulują nie tylko cykliczne nukleotydy. W komórkach zwierzęcych stwierdzono występowanie ciepłotrwałego, białkowego inhibitora kinaz białkowych, który *in vivo* i *in vitro* hamuje aktywność tych enzymów, a także wpływa na ich specyficzność substratową (31, 32).

Aktywność kinaz białkowych zależy również od rodzaju fosforylowanego substratu (33, 34, 35, 36, 37, 38), od rodzaju donora reszt fosforylowanych (9, 39, 40, 41) oraz od obecności i stężenia jonów dwuwartościowych (9, 40, 42). Wpływ poszczególnych czynników na aktywność kinaz jest przedmiotem niniejszego artykułu.

*) Mgr, Zakład Enzymatyki, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; cGMP — cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan; cIMP — cykliczny inozyno-3',5'-monofosforan; ATP — adenozynotrójfosforan; GTP — guanozynotrójfosforan; CTP — cytydynotrójfosforan; ITP — inozynotrójfosforan; pCMB — parachlorortęciobenzoesan; ACTH — hormon adrenokortykotropowy; TSH — hormon tyreotropowy; RC — holoenzym kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP; R — podjednostka regulatorowa kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP; C — podjednostka katalityczna kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP.

I. Wielopostaciowość kinaz białkowych

Podczas otrzymywania preparatów kinaz białkowych oczyszczanych przy zastosowaniu chromatografii jonowymiennych (4, 24), sączenia lub elektroforezy w żelach (22, 34) oraz wirowania w gradiencie stężeń sacharozy (34, 44), stwierdzono równoczesne występowanie kilku różnych kinaz w poszczególnych tkanakch. Okazało się, że np. w cytosolu komórek wątroby (90) i trzustki szczura (24), a także w cytosolu mięśni (25) i retikulocytów królika występują 3 różne kinazy (34); w jądrach limfocytów ludzkich — 3 (45); w jądrach komórek szczura — 4 (46, 47); a wołu — 12 (48).

Obserwowane formy kinaz są często produktami dysocjacji lub degradacji powstałymi w trakcie otrzymywania lub przechowywania preparatu enzymu (46, 47). Wiele kinaz pochodzących z tej samej tkanki różni się jednak podstawowymi właściwościami: zdolnością reagowania na obecność cyklicznych nukleotydów (45, 49, 50); względną specyficznością substratów (48); masą cząsteczkową (34); wytrzymałością na temperaturę i przechowywanie (34); optimum pH działania enzymu (51); wpływem stężenia jonów na dysocjację enzymu (52); oraz różną wrażliwością na inhibitory (14).

Wymienione różnice we właściwościach wskazują na wielopostaciowość kinaz białkowych występujących nie tylko w heterologicznych ale i homologicznych tkankach, a nawet w poszczególnych subfrakcjach komórkowych.

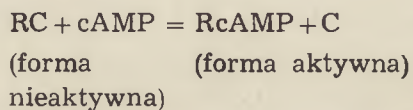
I.1. Kinazy aktywowane i nieaktywowane przez cAMP

Obok kinaz aktywowanych przez cAMP stwierdzono występowanie kinaz, na których aktywność nie wpływają cykliczne nukleotydy (14, 53). Niewrażliwe na cAMP są kinazy występujące w jądrze i jąderku komórek wątroby szczura i wołu (46, 47, 48), niektóre endogenne kinazy rybosomalne (54), kinazy trzustki szczura (23) oraz mięśni i wątroby kurczęcia (52, 55). W przypadku cytosolowych kinaz komórek *Physarum polycephalum* (56, 57), *Neurospora crassa* (58) i *Discotelim discoidium* (59), obserwowano nawet hamowanie reakcji fosforylacji przez cAMP. Jak z powyższych danych widać w warunkach doświadczeń *in vitro* cAMP nie zawsze pobudza fosforylację białek, co sugeruje istnienie kinaz aktywowanych i nieaktywowanych przez cykliczne nukleotydy (14, 52). Jednak zaklasyfikowanie badanego enzymu jako kinazy nieaktywowanej przez cAMP może okazać się zbyt pochopne. Obserwowany brak aktywacji w warunkach *in vitro*, często spowodowany jest dysocjacją holoenzymu kinazy w czasie preparatyki lub w trakcie oznaczenia aktywności (np. dysocjacja enzymu pod wpływem substratu (25, 60). Efekt pobudzenia fosforylacji białka przez cAMP zależy czasami od odpowiednio dobranych warunków reakcji, np. od ilości użytego substratu lub siły jonowej mieszaniny reak-

cyjnej (61). Natomiast w nieoczyszczonych preparatach kinaz białkowych obserwowany brak wrażliwości na cykliczne nukleotydy może być spowodowany obecnością endogennego cAMP (14) lub inhibitora kinaz białkowych (21, 31, 32). Czasami może to być efekt sumarycznego działania nierozdzielonych kinaz o różnych właściwościach (48, 62). Zastosowanie w badaniach izolowanej podjednostki regulatorowej lub inhibitora białkowego dla charakterystyki preparatów kinaz, wydaje się jedynym sposobem ich jednoznacznego określenia. Metoda ta (14) zostanie omówiona w dalszej części artykułu.

I.2. Mechanizm działania kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP

Kinazy białkowe, których aktywność zależy od współdziałania z cyklicznymi nukleotydami składają się z podjednostki regulatorowej (R) i katalitycznej (C). Podjednostki te tworzą nieaktywny kompleks (RC). cAMP powoduje dysocjację tego kompleksu z uwolnieniem aktywnej podjednostki katalitycznej według schematu (27, 33, 34, 44, 63):



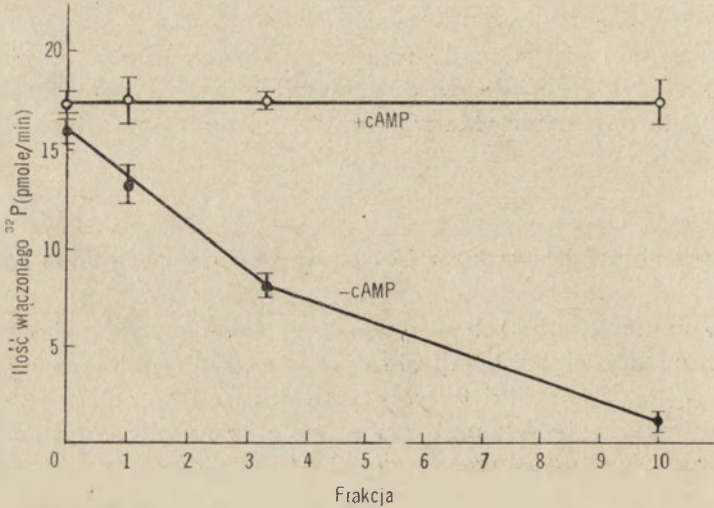
Zastosowanie chromatografii powinowactwa pozwoliło na oddzielenie podjednostki katalitycznej od podjednostki regulatorowej kinazy z mięśni królika i tym samym wykazało słuszność przedstawionego modelu regulacji aktywności kinaz białkowych przez cAMP (27).

W wyniku rekombinacji otrzymanych podjednostek odtwarza się kinazę, której aktywność ponownie może regulować cAMP. Rycina 1 przedstawia zależność fosforylacji kazeiny przez podjednostkę katalityczną kinazy białkowej od ilości podjednostki regulatorowej.

Mechanizm aktywacji kinaz przez cGMP i cIMP jest taki sam jak w przypadku cAMP (22, 24, 25, 60). Niektóre pochodne cyklicznych nukleotydów wywołują również dysocjację holoenzymu omawianych kinaz (27, 28, 29, 30). I tak 8-tio i 8-metylotio-pochodne cAMP aktywują kinazy białkowe w tym samym stopniu co cAMP (29). Pod wpływem innych pochodnych cAMP, np. tubercydyno-3,5-monofosforanu aktywność kinazy jest wyższa niż w obecności cAMP (30). Wymienione pochodne cyklicznych nukleotydów nie wykazują współzawodnictwa z cAMP o miejsce wiązania z białkiem enzymatycznym. Fakt ten sugeruje istnienie więcej niż jednego miejsca wiążącego pochodne cyklicznych nukleotydów w podjednostce regulatorowej kinaz białkowych (29).

Dysocjację holoenzymu na podjednostki wywołują również niektóre substraty białkowe (27, 33, 34, 60). Jednak w dalszym ciągu jeszcze nie-

wiele wiadomo o rodzaju oddziaływań pomiędzy podjednostkami kinazy. Nieliczne dane (6) wskazują na udział grup tiolowych, gdyż pCMB pochodne wwołują dysocjację holoenzymu.



Ryc. 1. Zależność aktywności podjednostki katalitycznej kinazy białkowej od stężenia podjednostki regulatorowej (27)
Aktywność oznaczono w obecności cAMP (o—o) i bez cAMP (●—●)

II. Podjednostka regulatorowa kinaz białkowych

II.1. Rozdzielenie podjednostek kinaz białkowych aktywowanych przez cykliczne nukleotydy

Preparaty enzymatyczne kinaz można rozdzielić na poszczególne podjednostki różnymi metodami. Najwcześniej stosowano metodę ultrawierowania w gradiencie stężeń sacharozy preparatu uprzednio oczyszczonego chromatograficznie na DEAE-celulozie oraz wybiórczą denaturację cieplną podjednostki katalitycznej w preparatach holoenzymu kinazy (44). Ostatnio zaś uzyskuje się rozdział podjednostek enzymatycznych przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa na kolumnach z Sepharose 4 B i agarozы podstawionych przez cAMP (64, 65) lub też białkowy substrat: kazeinę czy histony (27).

Masy cząsteczkowe poszczególnych podjednostek kinaz białkowych różnią się, w zależności od stopnia oczyszczenia preparatu jak i rodzaju tkanki, z której preparat enzymatyczny uzyskano. Masy cząsteczkowe podjednostek regulatorowych kinaz z mięśni królika określono jako: 37 000, 50 000, 82 000 a podjednostek katalitycznych jako 45 000 (26); natomiast podjednostki regulatorowej kinazy z mięśnia serca wołu jako 55 000, a podjednostki katalitycznej — 42 000 (27). Już z tych przykładów widać, że

masy cząsteczkowe podjednostek regulatorowych wymienionych kinaz wyraźnie się różnią. Natomiast podjednostki katalityczne kinaz białkowych pochodzących z różnych tkanek charakteryzują się podobnymi właściwościami oraz mniejszymi różnicami w wielkościach mas cząsteczkowych. Porównano preparaty kinaz białkowych z mięśni królika i wątroby szczura (26), mózgu wołu i mięśni homara (60) oraz preparaty trzech różnych kinaz z retikulocytów królika rozdzielonych na DEAE-celulozie (34). Okazało się, że otrzymane różne kinazy posiadały identyczne podjednostki katalityczne i odmienne podjednostki regulatorowe. Podjednostki katalityczne jednej kinazy wiązały podjednostki regulatorowe innych kinaz nie tylko z homologicznych ale i heterologicznych tkanek (14).

II-2 Białka wiążące cAMP

Występowanie białek wiążących cAMP stwierdzono w komórkach zwierzęcych (11, 14, 20, 24, 63, 66, 67, 68) i bakteryjnych (70, 71, 72). Natomiast o występowaniu białka zdolnego do wiązania cyklicznego nukleotydu w komórkach roślinnych są stosunkowo nieliczne dane (73, 74). Funkcja jaką pełnią te białka w różnorodnych komórkach nie jest jednakowa. U eukariota białka wiążące cAMP pełnią głównie funkcje podjednostek regulatorowych kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP (53). U prokariota natomiast oddziałują bezpośrednio na genom powodując wzmoczenie syntezy specyficznego RNA (np. u *Escherichia coli*) (75) nie biorąc udziału w procesach fosforylacji. W komórkach roślinnych funkcja białka wiążącego cAMP nie jest wyjaśniona, nie stwierdzono bowiem jak dotąd występowania kinazy białkowej, którą aktywowałby cAMP (74, 76, 77).

Białka wiążące cAMP występują powszechnie we wszystkich subfrakcjach komórek zwierzęcych, jednakże ich rozmieszczenie jest charakterystyczne dla poszczególnych tkanek. W trzustce szczura białka wiążące cAMP występują głównie we frakcji mikrosomalnej i jądrowej (24), w błonie śluzowej macicy krowy (41) i w gruczole mlecznym myszy (11) zaś we frakcji cytosolowej. W jądrach komórek wątroby szczura niektóre białka kwaśne chromatyny oraz rozpuszczalne białko w nukleoplaźmie wiążą cAMP (66). Białka wiążące cAMP występujące we frakcji błon komórkowych i cytoplazmatycznych można wyekstrahować stosując Lubrol-WX lub dezoksycholan sodu (69, 78, 79, 80). Charakterystyczne jest równoczesne występowanie w tych samych subfrakcjach komórkowych białek wiążących cAMP i kinaz białkowych.

W normalnych tkankach zwierzęcych wykazano ścisłą korelację pomiędzy wzrostem aktywności kinaz białkowych pod wpływem zwiększonego poziomu cAMP, a zdolnością do wiązania cAMP (81). Doświadczenie wykonano używając preparatów błon cytoplazmatycznych z komórek przepony szczura, w których pod wpływem adrenaliny (związek aktywujący cyklazę adenylową w błonach) lub teofiliny (związek hamujący aktywność

fosfodwuesterazy cAMP) następował wzrost aktywności kinazy białkowej oraz proporcjonalnie zmniejszenie zdolności błon cytoplazmatycznych do wiązania egzogenego $^3\text{HcAMP}$. Wynik ten sugeruje, że w błonach cytoplazmatycznych komórek wątroby szczura białko wiążące cAMP odpowiada podjednostce regulatorowej kinazy białkowej zlokalizowanej w błonach i aktywowanej przez zwiększony poziom cAMP. Jak dotąd nie wiadomo jeszcze, czy w poszczególnych subfrakcjach komórek innych tkanek zwierzęcych wszystkie białka wiążące cAMP spełniają rolę podjednostek regulatorowych kinaz białkowych, czy też niezależnie od systemu kinaz białkowych istnieją białka wiążące cAMP (53). Przykładem tych ostatnich może być białko wiążące cAMP o masie większej niż masa cząsteczkowa kinazy białkowej, którego obecność stwierdzono w ekstrakcie z wątroby szczura (82).

Funkcja takich białek w komórkach zwierzęcych, jak i roślinnych nie jest jeszcze wyjaśniona np. dla białka wiążącego cAMP w kłączach karczocha (74) i drożdżach (83). Obok białek wiążących cAMP istnieją również białka wiążące cGMP. Występowanie białka wiążącego cGMP stwierdzono np. w cytoplaźmie komórek ośrodkowego układu nerwowego mola woskowego (20). Badany preparat miał również zdolność wiązania cAMP. K_m wiązania cAMP wynosiło 1×10^{-7} M, zaś dla cGMP 10^{-8} M, co wskazuje na istnienie dwóch różnych białek wiążących specyficznie różne nukleotydy.

III. Substraty kinaz białkowych

III-1. Donory reszt fosforylowych

Donorem reszt fosforylowych dla reakcji fosforylacji białek, katalizowanej przez kinazy jest ATP (53). Do reakcji niezbędne są jony magnezu tworzące kompleks z ATP, który dopiero w tej postaci jest substratem kinaz białkowych (84). Jednak niektóre kinazy białkowe również aktywnie wykorzystują inne trójfosfonukleotydy w reakcjach fosforylacji białek. Np. kinazy z frakcji kwaśnych białek grasicy cielęcej charakteryzują się identyczną stałą Michaelisa wobec ATP, GTP, CTP, ITP, i UTP (39). Podobnie cytosolowe kinazy białkowe z wątroby szczura (85) i retikulocytów królika (86) odznaczają się identyczną stałą Michaelisa dla ATP i GTP. W zależności od fosforylowanego białkowego substratu ATP niekiedy aktywuje reakcje fosforylacji białek, w których donorem reszt fosforylowych jest GTP. Fakt ten tłumaczy się szybką wymianą znakowanego fosforu między GTP i ATP (50, 86). Jednak wydaje się, że pogląd wykorzystania innych trójfosfonukleotydów w reakcjach przenoszenia reszt fosforylowych z ATP na białko, nie zawsze jest słuszny. Np. jedna z dwóch kinaz z tkanki tłuszczowej szczura przy wykorzystaniu GTP jako donora reszt fosforylowych wykazywała 2,5 krotnie wyższą szybkość reakcji fosforylacji niż podczas wykorzystania ATP (50).

CTP, GTP i UTP mają również hamujący wpływ na aktywność kinaz w błonie śluzowej macicy krowy (41) i przysadki wołu (88). Te trójfosfonukleotydy powodują niekiedy zmiany właściwości kinaz białkowych, np. we wrażliwości na aktywację przez cAMP lub zmiany w zapotrzebowaniu na jony metali (9).

Stwierdzono, że ATP reguluje aktywność kinaz białkowych nie tylko jako donor reszt fosforylowych, ale wpływa również na powinowactwo enzymu do cAMP (62, 89). Inkubacja enzymu w obecności μ molowych stężeń ATP i magnezu powoduje zmianę stałej dysocjacji cAMP w reakcji wiązania z enzymem; z 2×10^{-8} do 2×10^{-7} M i K_m aktywacji kinazy dla cAMP z 3×10^{-9} M do 5×10^{-8} M. To dziesięciokrotne zmniejszenie czułości enzymu na cAMP spowodowane jest wiązaniem kompleksu ATP—Mg⁺⁺ z holoenzymem kinazy.

III-2. Białkowe substraty kinaz

Kinazy aktywowane przez cAMP fosforylują reszty treoniny i seryny białkowego substratu. Wiązanie estrowe pomiędzy tymi aminokwasami a resztami fosforylowymi jest trwałe w środowisku kwaśnym (86, 90, 91). W przypadku kwaśnych białek jądrowych komórek rakowych Walker 256, stwierdzono fosforylację reszt histydyny i lizyny (51). Reakcję katalizują dwie różne kinazy. Obie są niewrażliwe na cAMP ale tylko jedną hamuje CTP, różnią się poza tym optimum pH. Powstałe w wyniku ich działania wiązanie estrowe jest nietrwałe w środowisku kwaśnym.

Najczęściej stosowanymi substratami w badaniach *in vitro* są histony (poszczególne frakcje oraz ich mieszanina) (34, 45, 90), kazeina (8, 34, 52, 90), protamina (21, 90, 91) i fosfityna (61, 90, 94). Niektóre substraty powodują dysocjację enzymu, analogiczną do dysocjacji wywoływanej przez cAMP lub cGMP. Takie właściwości wykazują histony (44) i protamina (33, 34). Oddziaływanie pomiędzy białkowym substratem a enzymem (33) powoduje niewrażliwość na cykliczne nukleotydy, przy zwiększonym poziomie fosforylacji spowodowanej uwolnieniem podjednostki katalitycznej (44).

Ze względu na funkcje pośrednictwa w działaniu niektórych hormonów i cAMP, jakie przypisuje się kinazom, szczególnie istotną wydaje się znajomość fizjologicznych substratów tych enzymów. Jednak tylko pewne endogenne substraty są dokładnie poznane i scharakteryzowane. Dobrze znana jest fosforylacja niektórych enzymów przez kinazy występujące we frakcji cytosolowej (13, 15, 16, 17, 18). Takimi enzymami są: syntetaza glikogenowa I (93) i kinaza fosforylaza b z mięśni szkieletowych królika (95), trójglicerydowa lipaza z tkanki tłuszczowej szczura (96, 97) oraz polimeraza RNA z *E. coli* (98) i tkanek ssaków (99). Ostatnio stwierdzono fosforylację aktywowaną przez cAMP jeszcze innych białek enzymatycz-

nych. Kinazę pirogronianową (100) z wątroby szczura w warunkach *in vitro* fosforyluje kinaza z tej samej tkanki lub kinaza z serca wołu. Fosforylacja wywołuje obniżenie aktywności kinazy pirogronianowej. Efekt ten jest szczególnie wyraźny przy niskich stężeniach substratu. Kinazy z mięśni świni i mózgu wołu fosforylują również jeden z dwu izoenzymów anhidrazy węglowej z erytrocytów wołu (101). Przebieg tej reakcji zależy od stężenia cAMP i ATP. W wyniku fosforylacji obserwuje się zwiększenie aktywności anhidrazy. Również aktywność dehydrogenazy pirogronianowej (102) i regulują reakcje fosforylacji i defosforylacji. Fosforylacja powodująca obniżenie aktywności enzymu katalizuje wewnątrzmitochondrialna kinaza białkowa niewrażliwa na cAMP (13). Interesujący jest fakt autofosforylacji, zaobserwowany przez Erlichmana (8, 103). Kinaza białkowa z serca wołu aktywowana przez cAMP fosforyluje białko podjednostki regulatorowej. Włączanie reszt fosforylowych do białka podjednostki wiążącej cAMP, nie wpływa na zdolność wiązania cAMP, ułatwia jednak dysocjację holoenzymu. Wydaje się, że reakcja ta może *in vivo* odgrywać rolę w regulacji aktywności kinazy przez cAMP. Ze względu na funkcje pełnione w komórce ważnym endogennym substratem, fosforylowanym przez kinazy, są białka występujące w jądrze. Pobudzaną przez cAMP fosforylację histonów *in vivo* i *in vitro* opisano w wielu pracach (8, 34, 43, 62, 104, 105), podobnie jak i nie zależną od cAMP fosforylację kwaśnych białek chromatyny (47, 77, 106, 107).

Kolejnym substratem którego fosforylacja ma wpływ na szybkość syntezy białka w komórce są poszczególne białka rybosomalne (92, 108, 109). *In vitro* stwierdzono aktywowaną przez cAMP fosforylację poszczególnych białek rybosomalnych przez endogenne jak i egzogenne dodane kinazy białkowe (110). *In vivo* zaobserwowano również zwiększenie poziomu fosforylacji w rybosomach wątroby szczura pod wpływem zwiększonego stężenia cAMP wywołanego podaniem glukagonu (111). W przypadku fosforylacji rybosomalnych białek wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo* nie zawsze pokrywają się. Stosując egzogenne podany ^{32}P szczurom z regenerującą wątrobą, stwierdzono, że fosforyluje się tylko jedno białko w małej podjednostce, w odróżnieniu od fosforylacji licznych białek obserwowanej *in vitro* (112). Fosforylację białek rybosomalnych katalizują nie tylko kinazy aktywowane przez cAMP (np. spośród kilku białek rybosomalnych fosforylowanych przez endogenne kinazy z retikulocytów królika cAMP pobudza fosforylację tylko jednego białka) (54). Stwierdzono również fosforylację prerybosomalnych białek w jąderku (113, 114), gdzie fosforylacji ulegają inne białka rybosomalne niż na terenie cytoplazmy. Kinazy białkowe aktywowane przez cAMP związane z błonami komórkowymi i cytoplazmatycznymi fosforylując selektywnie białka wpływają na regulację przekazywania synaptycznego, wiązania jonów i przepuszczal-

ności błon (42). Fosforylację białek błon cytoplazmatycznych stwierdzono w erytrocytach człowieka (8), przysadce wołu (115), gruczole mlecznym myszy (11), w korze nadnerczy (110), w mięśniach szkieletowych i sercu psa (109) oraz tkance tłuszczowej szczura (40). Niektóre z endogennych substratów wykazują również zdolność do dysocjacji holoenzymu kinazy, np. zasadowe białka mieliny z mózgu wołu (91).

III-2.1 Specyficzność substratowa kinaz białkowych

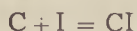
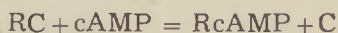
Specyficzność substratową poszczególnych kinaz białkowych trudno scharakteryzować a zatem i porównać. Przyczyn tych trudności jest kilka. Przede wszystkim brak jest szczegółowego określenia ilości fosforylowanych reszt w poszczególnych substratach (14). Poza tym do badań stosuje się preparaty enzymatyczne zawierające często oprócz kilku kinaz różniących się właściwościami także inne endogenne białka, będące na ogół dobrymi substratami badanej kinazy. W takich przypadkach często obserwuje się zmiany szybkości fosforylacji różnych substratów w zależności od zmian warunków reakcji (pH, stężenie jonów dwuwartościowych itd.) (44). Kinazy występujące w poszczególnych subfrakcjach komórkowych różnią się istotnie specyficznością w stosunku do egzogennych substratów. Kinazy obecne w cytosolu z reguły aktywnie fosforylują histony (99), nieco słabiej zaś kazeinę i fosfitynę (91). Natomiast kinazy obecne we frakcji jądrowej w niewielkim stopniu fosforylują histony (46, 47, 51). Także kinazy występujące w innych organellach komórkowych lub związane z błonami cytoplazmatycznymi różnią się specyficznością substratową w porównaniu z kinazą cytosolową tych samych komórek, np. kinaza cytosolowa fosforylująca protaminę i histony oraz kinaza związana z neurotubulami komórek nerwowych fosforylująca histony II A (35). Wiele danych (45, 50, 90) świadczy o tym, że nawet kinazy występujące w jednej subfrakcji i rozdzielone przy pomocy chromatografii preparatywnej wykazują wyraźne różnice w specyficzności substratowej, np. z dwunastu kinaz zlokalizowanych we frakcji kwaśnym białek chromatyny tylko dwie fosforylowały kwaśne białka, trzy histony i to jedynie w obecności cAMP, a pięć kazeinę (48). Porównywano również specyficzność substratową izolowanych podjednostek katalitycznych trzech kinaz z cytosolu wątroby szczura (przy czym jedna z tych kinaz była niewrażliwa na cAMP) (26). Okazało się, że preparaty te różnią się w niewielkim stopniu szybkością fosforylacji histonów f_1 , f_{2c} , f_{2b} , f_3 (26). Preparaty kinaz występujących w cytosolu komórek mięśni szkieletowych kurczęcia wykazywały różną zdolność do fosforylacji histonów i kazeiny w obecności 100 i 300 mM stężenia jonów sodu, w zależności od wieku kurczęcia (52).

IV. Ciepłotrwały białkowy inhibitor kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP *)

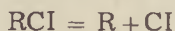
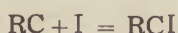
Potencjalnym regulatorem aktywności kinaz białkowych *in vivo* jest ciepłotrwałe białko występujące w tkankach zwierzęcych (14, 31, 32, 117) określane mianem inhibitora (31) lub modulatora (32). Obecność inhibitora, który hamował aktywację kinazy fosforylazy, pobudzaną przez cAMP po raz pierwszy stwierdzono w nieoczyszczonym ekstrakcie z tkanki mięśniowej królika (118). Wkrótce potem Appleman (119) wyodrębnił z tej samej tkanki białko hamujące aktywność fosforylazy glikogenowej jak i przejście formy I w D syntetazy glikogenowej. W późniejszych badaniach (14, 31, 32, 120) stwierdzono występowanie inhibitora w różnych tkankach zwierzęcych oraz zbadano jego właściwości.

IV-1. Mechanizm działania inhibitora kinaz białkowych

Inhibitor hamuje kinazy białkowe aktywowane przez cAMP zmniejszając prędkość początkową reakcji, nie wpływa natomiast na aktywność kinaz niewrażliwych na cykliczne nukleotydy (14, 31, 32). Hamowanie zależy zarówno od ilości enzymu jak i inhibitora (120). Inhibitor obniża aktywność kinazy białkowej pomimo że nie katalizuje defosforylacji białkowego substratu, nie oddziałuje z cyklicznymi nukleotydami, ani nie współzawodniczy z żadnym z substratów (14). W przypadku holoenzymu (RC) następuje to jedynie w obecności cAMP, natomiast w przypadku wolnej podjednostki katalitycznej (C) — także w nieobecności cAMP (21). Przedstawia to rycina 2. Fakt ten wskazuje na możliwość dwu różnych mechanizmów działania inhibitora. Według pierwszego, wiązanie przez inhibitor (I) podjednostki katalitycznej (C) uwolnionej pod wpływem cAMP, przebiega następująco (14):

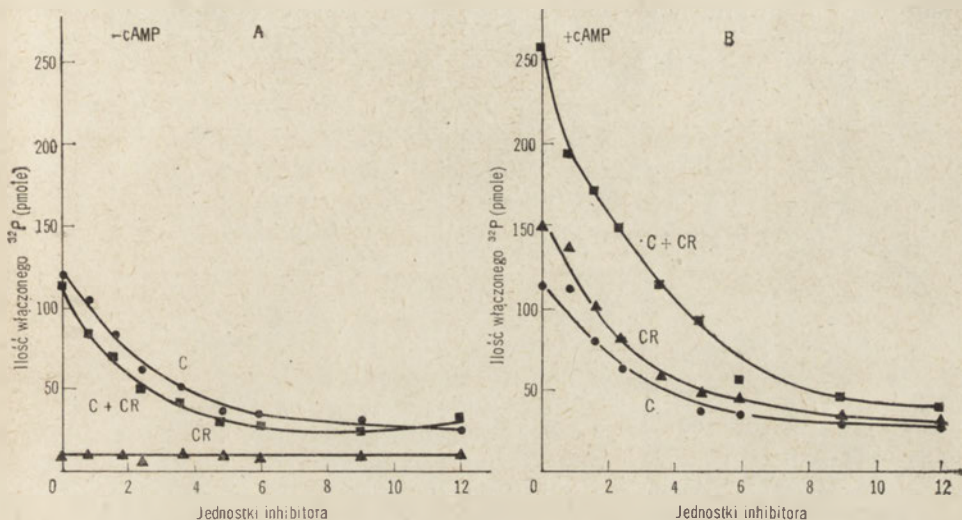


Drugi mechanizm zakłada bezpośrednie wiązanie inhibitora (I) z holoenzymem RCI. W wyniku dysocjacji tego kompleksu uwalnia się podjednostka regulatorowa R oraz związana z inhibitorem nieaktywna podjednostka katalityczna CI, według reakcji (14):



*) Ponieważ będzie omawiany tylko jeden inhibitor kinaz białkowych zamiast terminu „ciepłotrwały białkowy inhibitor kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP” w dalszej części artykułu będzie stosowany termin „inhibitor kinaz białkowych” lub „inhibitor”.

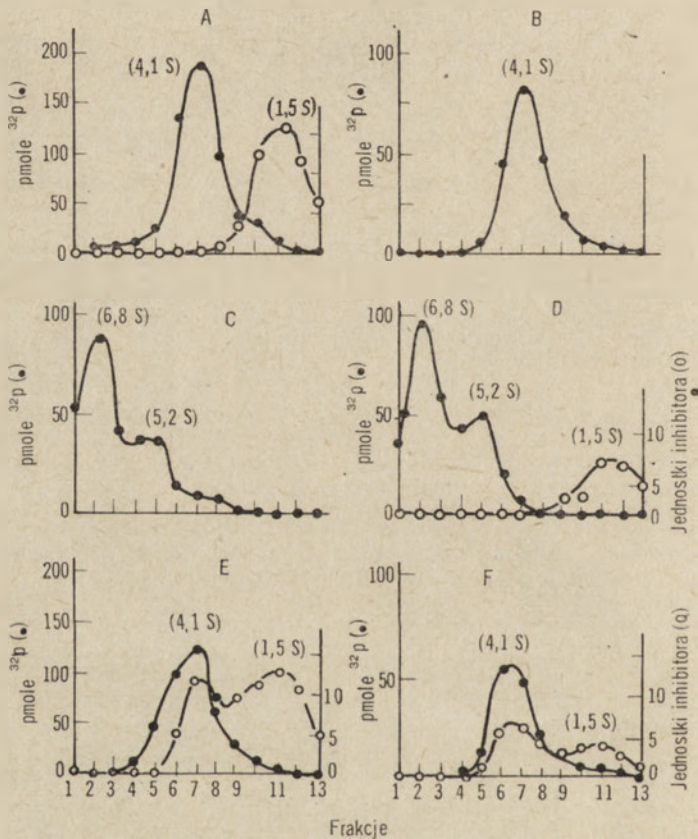
Ashby i Walsh (31) potwierdzili mechanizm działania inhibitora przedstawiony w reakcji pierwszej, wykonując doświadczenie analizujące oddziaływania pomiędzy inhibitorem i kinazą białkową. Rycina 3 przedstawia uzyskane w doświadczeniu wyniki rozdziału mieszanin zawierających inhibitor (I) podjednostkę katalityczną (C) lub holoenzym (RC), podczas ultrawierowania w gradiencie stężenia sacharozy (31).



Ryc. 2. Zależność aktywności katalitycznej podjednostki kinazy białkowej (31) (o—o) holoenzymu kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP (Δ—Δ) oraz mieszaniny podjednostki katalitycznej i holoenzymu (□—□) od ilości inhibitora (△—△) od ilości inhibitora. Aktywność oznaczano bez cAMP (A) i w obecności tego nukleotydu (B). Jednostka inhibitorowa jest to taka ilość inhibitora, która w warunkach standardowych hamuje aktywność kinazy fosforylasy w 50%.

Stała sedymentacyjna inhibitora z mięśni królika wyznaczona podczas wirowania w ciągłym gradiencie sacharozy — wynosi 1,5S (Ryc. 3A), a kinazy białkowej również z mięśni królika 6,8S i 5,2S (Ryc. 3C). Natomiast ten sam preparat kinazy po uprzedniej inkubacji w obecności cAMP, jak i izolowana podjednostka katalityczna kinazy mają stałą sedymentacji 4,1S (Ryc. 3A, B). Preparat podjednostki katalitycznej inkubowanej z inhibitorem (Ryc. 3E) nie rozdzielał się na poszczególne białka, a jego stała sedymentacyjna wynosiła 4,1 S. Ultrawierowanie preparatów zawierających holoenzym kinazy i inhibitor — po uprzedniej inkubacji z cAMP i bez cAMP — daje różne wyniki. Białka preparatu inkubowanego z cAMP nie rozdzielały się podczas ultrawierowania (Ryc. 3F). Ultrawierowanie zaś niezdysojowanego holoenzymu (preparat inkubowany bez cAMP) powodowało rozdzielanie inhibitora i kinazy białkowej (Ryc. 3D). Wyniki te wy-

kazują, że inhibitor może wiązać się z białkiem enzymatycznym, jedynie po uprzedniej dysocjacji holoenzymu na podjednostki i wykluczają możliwość powstawania kompleksu RCI. Sugeruje to łączenie inhibitora z podjednostką katalityczną w miejscu wiążącym podjednostkę regulatorową. Inhibitor jednak różni się od podjednostki regulatorowej właściwościami fizycznymi, takimi jak termostabilność, niższa masa cząsteczkowa, a także brakiem zdolności do wiązania cyklicznych nukleotydów. Hamuje on aktywność kinaz białkowych w sposób nieodwracalny przez cAMP, w odróżnieniu od hamowania wywołanego przez podjednostkę regulatorową (14).



Ryc. 3. Profile sedymentacyjne preparatów kinazy białkowej i białkowego inhibitora kinazy z mięśni królika (31)

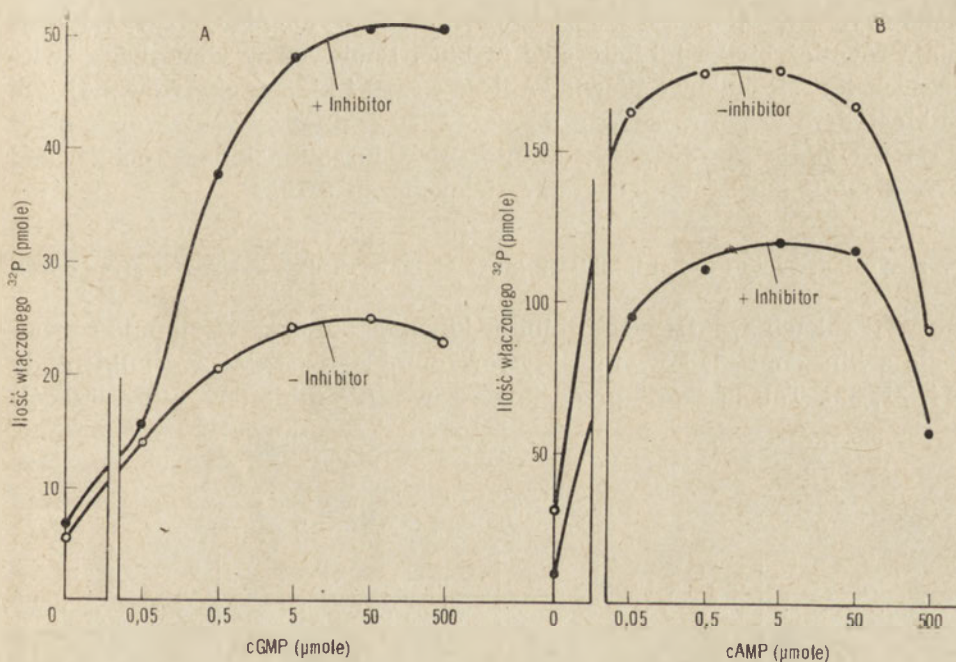
W liniowym gradiencie stężenia sacharozy wirowano osobno preparaty podjednostki katalitycznej kinazy białkowej i inhibitora (A), preparat zdysocjowanego holoenzymu kinazy po inkubacji z cAMP (B), niezdisocjowanego holoenzymu kinazy białkowej (C), holoenzymu inkubowanego z inhibitorem (D), podjednostki katalitycznej kinazy białkowej inkubowanej z inhibitorem (E), holoenzymu kinazy białkowej inkubowanego z inhibitorem w obecności cAMP (F).

-o-o- aktywność kinazy białkowej wyrażono w pmolach ^{32}P włączanego do preparatu histonów;
-o-o- Ilość jednostek inhibitora.

Jednostka inhibitora jest to taka ilość inhibitora, która w warunkach standardowych hamuje aktywność kinazy fosforylaza w 50%.

IV-2. Właściwości inhibitora kinaz białkowych

Inhibitor jest termostabilny — ogrzewany do temperatury 95°C nie traci zdolności hamowania kinazy białkowej. Masa cząsteczkowa białka inhibitora wynosi 26 000 (31), 34 000 (32), a punkt izoelektryczny 4,2. Wykazuje on zdolność hamowania aktywowanej przez cAMP fosforylacji kazeiny (31) oraz histonu f_{2b} (32), katalizowanej przez kinazy z różnych tkanek. Jednak działanie inhibitora kinaz na fosforylację innych substratów białkowych jest niejednakowe (32). Rycina 4 przedstawia wpływ inhibitora na aktywność kinazy aktywowanej przez cAMP(A) i kinazy aktywowanej przez cGMP(B).



Ryc. 4. Wpływ białkowego inhibitora z mięśni homara na aktywność kinaz białkowych aktywowanych przez cykliczne nukleotydy (32)

Aktywność kinaz oznaczano bez (-o-o-) oraz w obecności inhibitora (-●-●-).

A. Aktywność kinazy białkowej z mięśni homara, aktywowanej przez cGMP oznaczano w obecności wzrastającego stężenia cGMP.

B. Aktywność kinazy białkowej z serca wołu, aktywowanej przez cAMP oznaczano w obecności wzrastającego stężenia cAMP.

Badania aktywności inhibitora z mięśni homara (o właściwościach podobnych do inhibitora wyizolowanego z mięśni królika) (31), potwierdziły efekt hamowania aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP w stosunku do tych samych substratów, to jest kazeiny i histonu f_{2b} (32). Inhibitor hamuje również aktywność obu kinaz, (aktywowanej przez cAMP i aktywowanej przez cGMP), gdy fosforylowanym substratem jest histon li-

zynowy lub cała frakcja histonów, natomiast pobudza aktywność tych kinaz gdy substratem jest protamina. Gdy substratem jest histon argininy obserwuje się w obecności inhibitora, efekt hamowania kinazy białkowej pobudzanej przez cAMP i aktywowania kinazy pobudzanej przez cGMP. Zdolność modulowania specyficzności substratowej kinaz pobudzanych przez cykliczne nukleotydy, z tkanki mięśniowej homara, wykazywały również białka inhibitorowe izolowane z innych źródeł (32). W warunkach *in vitro*, na obserwowaną stymulację lub hamowanie aktywności kinaz białkowych przez inhibitor wpływa kilka czynników: rodzaj i ilość substratu, obecność i rodzaj jonów dwuwartościowych (32), rodzaj i stężenie cyklicznego nukleotydu (32) oraz pochodzenie i ilość inhibitora, jak i właściwości samego enzymu. Istotną rolę w regulacji aktywności kinaz białkowych, w zależności od wielu czynników wymienionych wyżej spełniają również białka inhibitorowe *in vivo*. Ponieważ w komórkach zwierzęcych jest stosunkowo niewielka ilość cGMP i kinazy aktywowanej tym nukleotydem w porównaniu z ilością cAMP i kinazy aktywowanej przez cAMP, wydaje się, że aktywowanie przez inhibitor kinazy pobudzanej przez cGMP ma istotne znaczenie fizjologiczne *in vivo*.

IV-3. Występowanie *in vivo* inhibitora kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP

W tkankach zwierzęcych inhibitor kinaz białkowych występuje równolegle z kinazami białkowymi aktywowanymi przez cykliczne nukleotydy (14, 31, 32). Tabela 1 (31) przedstawia zawartość inhibitora w poszczegól-

Tabela 1

Rozmieszczenie inhibitora kinaz białkowych
w tkankach królika (31)

Tkanka	Stężenie inhibitora (jednostki inhibitora* /g mokrej masy)
Mózg	9200
Mięsień sercowy	6200
Mięsień szkieletowy	6000
Wątroba	600
Nerka	600
Tarczycza	500

* Jednostka inhibitorowa jest to taka ilość inhibitora, która w warunkach standardowych powoduje hamowanie aktywności kinazy fosforylasy w 50%.

nych tkankach królika. W mięśniach szczura i królika *in vivo* około 18—21% kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP hamuje inhibitor (14).

Ilość inhibitora zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia (14). Głodzenie powoduje obniżenie aktywności właściwej inhibi-

tora *) o około 30%, a alloksan o około 60%, w odróżnieniu od insuliny powodującej zwiększenie aktywności inhibitora (14). W czasie rozwoju szczura zaobserwowano zmiany poziomu aktywności inhibitora w cytosolu komórek brunatnej tkanki tłuszczowej (120). Aktywność inhibitora w preparatach z tkanki płodowej była wyższa niż w preparatach z tkanki 10-dniowych szczurów. Inhibitor pochodzący z tego źródła hamował aktywność cytosolowej kinazy białkowej z tkanki tłuszczowej oraz kinazy z serca wołu.

Wysoka aktywność inhibitora obserwowana w embrionalnym okresie rozwoju szczura (122) oraz inne przykłady zmian poziomu aktywności inhibitora w zależności od stanu fizjologicznego zwierzęcia (14, 120) sugerują, że inhibitor ma udział w regulacji funkcji cAMP *in vivo*.

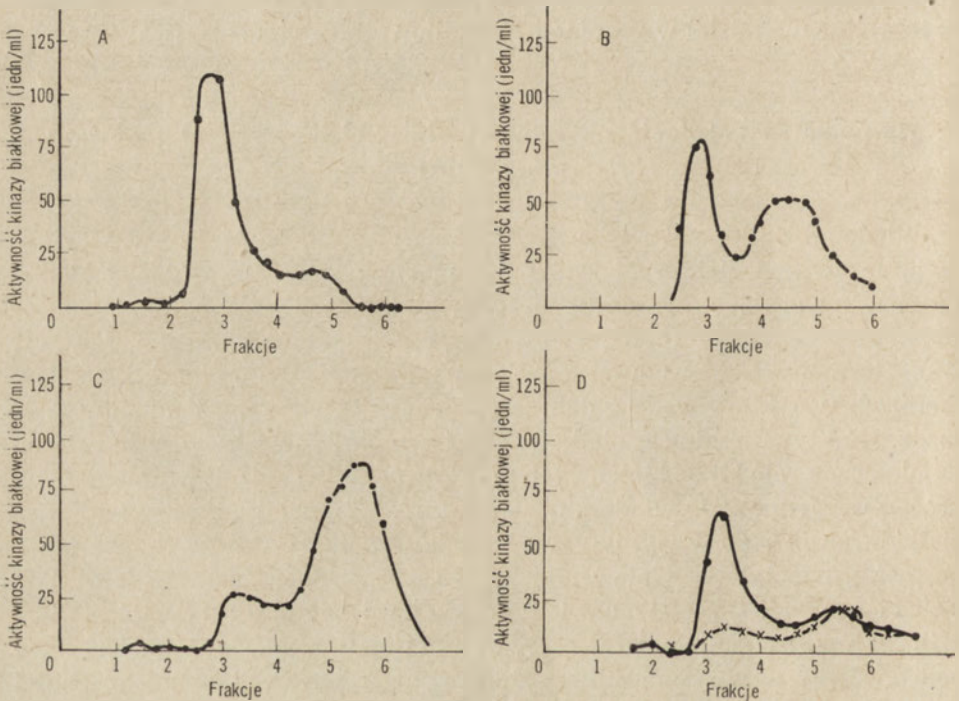
V. Hormonalna regulacja aktywności kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP

Wiadomo, że kinazy białkowe w obecności ATP, Mg^{++} i cAMP zwiększają aktywność niektórych enzymów, np. lipazy trójglicerydowej (96,97) i kinazy fosforylazy (95). Znany jest również fakt zwiększania *in vivo* poziomu glikogenolizy i lipolizy pod wpływem adrenaliny, glukagonu i ACTH (13). Hormony te powodują jednoczesne zwiększanie poziomu cAMP w tkankach (13), który według dobrze poznanego *in vitro* mechanizmu (patrz rozdz. I) aktywuje kinazę białkową. Zestawienie tych faktów wskazuje na fizjologiczną rolę kinaz białkowych w hormonalnej regulacji wymienionych procesów. Jednak doświadczalne wykazanie regulacji aktywności kinaz białkowych *in vivo* w wyniku zwiększenia poziomu cAMP w tkance przez hormony, napotykało wiele trudności (78, 129). Udało się to dopiero Soderlingowi, Corbinowi i Parkowi (123). Autorzy ci stwierdzili, że inkubacja tkanki tłuszczowej z adrenaliną powoduje zwiększenie podstawowej aktywności kinazy białkowej (oznaczonej w nieobecności cAMP). Pobudzenie aktywności związane jest z dysocjacją holoenzymu i w konsekwencji z pojawieniem się zwiększonej ilości aktywnych podjednostek katalitycznych w komórce. Fakt ten zaobserwowano oddzielając holoenzym od podjednostki katalitycznej na kolumnie Sephadex G-100. Rycina 5 przedstawia wyniki rozdziału preparatów kinazy białkowej z tkanki tłuszczowej szczura (123).

Maksymalną aktywację lipolizy w komórkach inkubowanych z $11\mu M$ adrenaliną obserwowano (po 2 do 5 minut) równocześnie ze zwiększeniem poziomu cAMP i pojawieniem się zwiększonej ilości wolnych podjednostek

*) Aktywność właściwa preparatu inhibitora wyraża się ilością jednostek aktywności inhibitora na mg białka preparatu. Jednostka aktywności inhibitora jest to taka ilość inhibitora, która w warunkach standardowych hamuje aktywność kinazy fosforylazy w 50%.

katalitycznych (Ryc. 5A i B). Podczas inkubacji w obecności adrenaliny i kafeiny, zanim nastąpiła maksymalna aktywacja kinazy białkowej, w komórkach tłuszczowych obserwowano maksymalny poziom lipolizy (Ryc. 5C). Wzrost aktywności kinazy białkowej, mierzonej bez cAMP, w stosunku do aktywności mierzonej wobec cAMP — wywołują również glukagon i ACTH. Natomiast insulina obniża podwyższony, w wyniku inkubacji z adrenaliną, poziom aktywności kinazy białkowej. Po 10 minutach obserwuje się względne zmniejszenie ilości wolnej podjednostki katalitycznej oraz obniżenie poziomu cAMP w tkance tłuszczowej (Ryc. 5D).



Ryc. 5. Profile elucji z kolumny Sephadex G-100 kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP z tkanki tłuszczowej szczura (123)

Izolowaną tkankę tłuszczową inkubowano w buforze fosforanowym Krebsa-Ringera (A), w obecności 11 μ M adrenaliny (B), w obecności 11 μ M adrenaliny z dodatkiem 1 mM kafeiny (C) z dodatkiem 6,9 nM insuliny (D). Aktywność kinazy białkowej oznaczano w obecności cyklicznego AMP (●—●) i bez tego nukleotydu (X—X). Jednostka aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP jest to taka ilość enzymu, która katalizuje włącznie 1 pmola 32 P do preparatu histonów w ciągu 1 minuty.

Analogiczne wyniki otrzymano podczas badania hormonalnej regulacji kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP w komórkach mięśnia przepony szczura (80). Stwierdzono, że inkubacja przepony w obecności adrenaliny powoduje zmniejszenie aktywności pobudzonej przez cAMP jak i zmniejszenie wiązania cyklicznego 3 HAMP. Natomiast aktywność podsta-

wowa (niepobudzona przez cAMP) wzrasta. Antagonistyczne działanie insuliny w stosunku do pobudzenia aktywności kinazy wywołanej przez adrenalinę, zaobserwowane w tym przypadku, ma inny charakter niż w tkance tłuszczowej. Insulina w komórkach przepony szczura nie wywołuje obniżenia poziomu cAMP — nie zmienia również aktywności inhibitora kinaz białkowych. Inne badania także potwierdzają wzrost aktywności kinaz białkowych w skrawkach tkanek inkubowanych w obecności hormonów zwiększających poziom cAMP. W skrawkach tarczycy pod wpływem TSH (124), w brunatnej tkance tłuszczowej pod wpływem noradrenaliny (125), a także glukagonu w komórkach wysepek Langerhansa (126) i w komórkach perfundowanej wątroby (105) stwierdzono zwiększenie poziomu aktywności kinazy białkowej.

Analogiczne wyniki otrzymano podając te hormony *in vivo*. Np. w wątrobie szczura izolowanej w ciągu 10 minut po podskrónym wstrzyknięciu glukagonu stwierdzono również zwiększenie dysocjacji kinazy białkowej (127).

Korenman i wsp. (128) poza potwierdzeniem hormonalnej regulacji kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP, zwrócili uwagę na wewnątrzkomórkowe przemieszczanie uwalnianej podjednostki katalitycznej. Stwierdzono, że pod wpływem isoproterenolu w komórkach macicy maleje stężenie kinazy białkowej w cytosolu, a ilość wolnych podjednostek we frakcji mikrosomalnej zwiększa się. Jak dotąd nie potwierdzono jeszcze w innych tkankach przemieszczania się wewnątrzkomórkowego uwolnionych podjednostek kinazy pod wpływem hormonów.

O hormonalnej regulacji aktywności kinazy białkowej w inny sposób niż poprzez zwiększenie poziomu cAMP nie ma wielu danych. Wiadomo, że glukokortykoidy, związki diabetologiczne (alloksan i streptozotocyna) oraz głodzenie, powoduje po 1—4 dni, obniżenie poziomu aktywności kinazy (67, 127) białkowej mierzonej bez cAMP, albo w jego obecności. Wyniki te wskazują na zmniejszenie ilości podjednostek regulatorowych i katalitycznych, a więc na zmiany w syntezie lub degradacji enzymu pod wpływem wymienionych czynników. Mechanizm regulacji aktywności kinazy białkowej na tej drodze nie jest jeszcze wyjaśniony.

VI. Uwagi końcowe

Ze względu na rolę, jaką przypisuje się kinazom białkowym wpływającym na aktywność niektórych białek funkcjonalnych (31, 40, 92, 93, 95, 96, 97, 100, 101) jak i aktywność genów u zwierząt, problem regulacji tych kinaz jest bardzo istotny. Mechanizm aktywacji kinaz białkowych przez cykliczne nukleotydy badanych w warunkach *in vitro* (22, 27, 44) i *in vivo* (123) jest jednakowy dla wszystkich kinaz aktywowanych przez cAMP. Zacytowane przykłady hormonalnej regulacji kinaz białkowych *in vivo*

(patrz rozdz. IV), dotyczą jednak tylko kinaz rozpuszczalnych, których właściwości, substraty i funkcje, są dobrze scharakteryzowane. O pozostałych kinazach białkowych zwłaszcza związanych z substrukturami komórkowymi, brak wyczerpujących danych. Przy niewystarczającej ilości często podstawowych informacji o tych kinazach, niewiele można powiedzieć o regulacji ich aktywności, tym bardziej, że nie zawsze nawet wiadomo, czy badana kinaza może być aktywowana przez cykliczne nukleotydy.

Kinazy pobudzone i niepobudzone przez cykliczne nukleotydy można rozróżnić dzięki metodzie zaproponowanej przez *Walsha* (14). Metoda ta wykorzystuje omówione wcześniej właściwości podjednostek regulatorowych kinaz białkowych (27). Obniżenie aktywności podjednostek katalitycznych przez egzogennie dodane podjednostki regulatorowe pozwala w badanym ekstrakcie odróżnić obecność zdysocjowanych podjednostek katalitycznych kinazy aktywowanej przez cAMP od kinazy niewrażliwej na cykliczne nukleotydy. Również inhibitor kinaz białkowych dodany egzogennie do badanego preparatu, wiążąc zdysocjowaną podjednostkę katalityczną obniża poziom fosforylacji białek (patrz rozdz. IV-1.). Zastosowanie preparatu podjednostki regulatorowej kinazy oraz inhibitora do identyfikacji kinaz białkowych przedstawia tabela 2 (14, 130).

Tabela 2

Określanie charakteru kinaz białkowych (III) na podstawie wpływu podjednostki regulatorowej (I) lub inhibitora (II) na poziom fosforylacji substratu (14, 130)

I. Podjednostka regulatorowa	II. Inhibitor	III. Badana kinaza
Nie wpływa ±cAMP	Hamuje +cAMP	Holoenzym kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP
Hamuje -cAMP	Hamuje ±cAMP	Wolna podjednostka katalityczna kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP
Nie wpływa ±cAMP	Nie wpływa ±cAMP	Inne kinazy

Zastosowanie izolowanych podjednostek regulatorowych pozwoliło na określenie kinaz białkowych chromatyny jądrowej komórek wątroby szczura (46, 47). Mimo stwierdzonej obecności białka wiążącego cAMP, wszystkie próby aktywacji tych kinaz przez cykliczne nukleotydy nie dawały rezultatów, co pozornie wskazywało na obecność kinaz niewrażliwych na cAMP w chromatynie. Jednak podczas chromatografii kwaśnych białek jądrowych na fosfocelulozie otrzymano dwie frakcje charakteryzujące się zdolnością do wiązania cAMP i dwie frakcje o własnościach kinazy białko-

wej niewrażliwej na cAMP. Jeden rodzaj oczyszczonego białka o zdolności do wiązania cAMP, jak i podjednostka regulatorowa kinazy białkowej aktywowanej przez cAMP z serca wołu, hamowały aktywność jednej kinazy białkowej z kwaśnych białek jądrowych. Inhibicja ta była odwracalna w obecności 5 μ M stężenia cAMP. Wyniki te pozwoliły na określenie badanych kinaz; jednej — jako kinazy wrażliwej na cAMP, która podczas preparatyki została zdysocjowana na dwie podjednostki; drugiej — jako kinazy niewrażliwej na cykliczne nukleotydy. Zidentyfikowanie szeregu kinaz jako niewrażliwych na cAMP wyklucza możliwość regulacji aktywności wszystkich kinaz *in vivo* poprzez cykliczne nukleotydy. Zagadnienie regulacji aktywności tych enzymów pozostaje więc otwarte. Dotychczasowe dane o regulacji aktywności kinaz aktywowanych przez cAMP *in vivo*, są również zaledwie wstępem do badań nad tym zagadnieniem.

Autorka składa Panu Profesorowi dr Zbigniewowi Kaniudze podziękowanie za sugestie i cenne uwagi przy przygotowaniu niniejszego artykułu.

Artykuł otrzymano 14.2.1975, po rewizji autorskiej przyjęto 12.6.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Krebs E. G., Love D. S., Bratvold G. E., Trayser K. A., Meyer W. Z., Fischer E. H., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1022—1033.
2. Posner J. B., Stern R., Krebs E. G., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 982—985.
3. DeLange R. J., Kemp R. G., Riley W. D., Cooper R. A., Krebs E. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2200—2205.
4. Walsh D. A., Perkins J. P., Krebs E. G., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3763—3765.
5. Corbin J. D., Brostrom C. O., Alexander R. L., Krebs E. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3736—3740.
6. Brostrom C. O., Reimann E. M., Walsh D. A., Krebs E. G., (1970), w *Advances Enzyme Regulation*, red. Weber G., t. 8, str. 191—205, Pergamon Press, Oxford.
7. Tao M., Salas M. L., Lipmann F., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 408—411.
8. Rubin C. S., Erlichman J., Rosen O. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 36—44.
9. Huang L. C., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 281—288.
10. Corbin J. D., Soderling T. R., Park M. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1813—1821.
11. Majumder G. C., Turkington R. W., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2650—2657.
12. Garbers D., First N., Lardy H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **248**, 875—879.
13. Krebs E. G., (1972), w *Current Topics of Cellular Regulation*, red. Horecker B. L., Stadtman E. R., t. 5, str. 99—128, Academic Press, New York.
14. Walsh D. A., Ashby C. D., (1973), w *Recent Progress in Hormone Research*, red. Gotwood, t. 29, str. 329—359, Academic Press, New York.

15. Greengard P., and Costa E., (1970), *Role of Cyclic AMP in Cell Function*, Raven Press, New York.
16. Rosen O. M., Rubin C. S., Erlichman J., (1973), w *Protein Phosphorylation in Control Mechanisms*, red. Huiyng F., Lee E. Y. C., str. 67—83, Academic Press, New York.
17. Szumiel I., Zajdel M. E., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 175—198.
18. Kahl A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 199—224.
19. Kuo J. F., Greengard P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4067—4073.
20. Tsuzuki J., Newburgh R. W., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **354**, 101—106.
21. Donnelly T. E., Jr., Kuo J. F., Reyces P. L., Lin Y. P., Greengard P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 190—199.
22. Kuo J. F., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 4037—4041.
23. Mac Donald R. J., Ronzio R. A., (1974), *FEBS Letters*, **40**, 203—206.
24. Van Leemput-Contrez M., Camus J., Christophe J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 182—190.
25. Corbin J. D., Brostrom C. O., King C. A., Krebs E. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7790—7798.
26. Chen L. J., Walsh D. A., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3614—3621.
27. Reimann E. M., Brostrom C. O., Corbin D. J., King C. A., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 187—194.
28. Fikus M., Kwast-Welfeld J., Kazimierczuk Z., Shugar D., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 465—474.
29. Kuo J. F., Miyamoto R., Reyes F. L., (1974), *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2011—2021.
30. Drummond G. J., Powell C. A., (1970), *Molec. Pharmacol.*, **6**, 24—30.
31. Ashby C. D., Walsh D. A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1255—1261.
32. Donnelly T. E., Jr., Kuo J. P., Miyamoto E., Greengard P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 199—204.
33. Tao M., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 56—61.
34. Tao M., Hachet P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5324—5332.
35. Letterier J. F., Rappaport L., Nunez J., (1974), *Molec. Cell. Endocrinol.*, **1**, 65—75.
36. Rappaport L., Letterier J. F., Nunez J., (1972), *FEBS Letters*, **26**, 349—352.
37. Reddington N., Lagnado J. R., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 188—194.
38. Rubin C. S., Erlichman J., Rosen O. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 36—44.
39. Kleinsmith L. J., Alfrey V. G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 123—135.
40. Chang K. J., Marcus N. A., Cautrecases P., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6854—6865.
41. Sanborn B. M., Bhalla R. C., Stanley G., Korenman S. G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3595—3600.
42. Ueda T., Maeno H., Greengard P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8295—8305.
43. Chae Ch., Smith M. C., Irvin J. L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 134—153.
44. Miyamoto E., Petzold G. L., Harris J. S., Greengard P., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 305—312.
45. Farago A., Antoni P., Fabian F., Takats A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 517—526.

46. Rikans L. E., Ruddon R. W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 387—394.
47. Ruddon R. W., Anderson S. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res., Commun.*, **46**, 1499—1503.
48. Kish V. M., Kleinsmith L., (1974), *J. Biochem. Chem.*, **49**, 750—760.
49. Skala J. P., Knight B. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **385**, 114—123.
50. Knight B. L., Skala J. P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **385**, 124—132.
51. Smith D. L., Chen M., Bruegger B. B., Holtz S. L., (1947), *Biochemistry*, **13**, 3780—3785.
52. Piras M. M., Staneloni R., Leiderman B., Piras R., (1972), *FEBS Letters*, **23**, 199—201.
53. Langan T. A., (1973), *Adv. Cyclic Nukleotides*, **3**, 99—153.
54. Cawthon M. L., Bitte L. F., Krystosek A., Kabat D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 275—278.
55. Kaniuga Z., Kwast-Welfeld J., Sołtysiak-Pawluczuk D., (1974), *Int. J. Biochem.*, **6**, 141—158.
56. Kuehn G. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6366—6371.
57. Kuehn G. D., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 414—419.
58. Gold M. M., Segel I. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2417—2423.
59. Weinstein B. J., Koritz S. B., (1973), *Develop. Biol.*, **34**, 159—162.
60. Miyamoto E., Petzold G. L., Kuo J. F., Greengard P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 179—189.
61. Tenner A. J., Wallace R. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 416—424.
62. Haddox M. K., Newton N. N., Hartle D. K., Goldberg N. D., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 653—661.
63. Gill G. N., Garren L. D., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 335—343.
64. Wilchek M., Salomon Y., Love M., Selinger Z., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1177—1184.
65. Ramseyer H., Kaslow U. R., Gill G. N., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 813—821.
66. Gilman A. G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **67**, 305—312.
67. Donovan G., Oliver I. T., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3904—3910.
68. Satre M., Chambar H. M., Vignais P. V., (1971), *FEBS Letters*, **12**, 207—211.
69. Forte R. R., Chao W. H., Walkenbach R. J., Byington K. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1510—1517.
70. Zubay G., Schwartz D., Beckwith J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **66**, 104—110.
71. Emmer M., De Crombrugghs B., Pastan I., Perlman R. L., (1970), *Proc. Nat. Acad., Sci. U. S. A.*, **66**, 480—487.
72. Anderson W. B., Schneider A. D., Emmer M., Perlman R. L., Pastan I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5929—5937.
73. Nicolas P., Nigon V., (1974), *FEBS Letters*, **49**, 254—259.
74. Giannattasio M., Carratu G., Tucci G. F., (1974), *FEBS Letters*, **49**, 249—253.
75. De Crombrugghes B., Chen B., Anderson W. B., Gottesman M. E., Perlman R. L., Pastan I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7343—7348.
76. Ralph R. K., Mc Combs P. J. A., Tener G., Wojcik S. J., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 901—911.
77. Keats R. A. B., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 655—661.
78. Zapf J., Waldvogel M., Froesch E. R., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 253—256.

79. Granner D. K., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1516—1522.
80. Walaas O., Walaas E., Gresnerod D., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 465—477.
81. Do Khac L., Harbon S., Clauser H. J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 177—185.
82. Chambaut A. M., Leray F., Hanourie J., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 328—334.
83. Sy J., Richter D., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2788—2791.
84. Hujing F., Lerner J., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **55**, 647—653.
85. Ventimiglia S. A., Vool I. G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **71**, 350—354.
86. Traugh J. A., and Traut R. R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 373—376.
87. Kao J. F., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1755—1759.
88. Labrie F., Lemaire S., Courte C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7293—7302.
89. Brostrom C. O., Corbin J. D., King C. A., Krebs E. G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **68**, 2444—2447.
90. Matsumura S., Takeda M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 237—241.
91. Miyamoto E., Kakiuchi S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2769—2777.
92. Jergil O., Ohlsson R., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 13—25.
93. Soderling T. R., Hickenbottom J. P., Reimann E. M., Hunkele F. L., Walsh D. A., Krebs E. G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6317—6328.
94. Dastuque B., Tichonicky L., Kruh J., (1974), *Biochemie*, **56**, 491—500.
95. Walsh D. A., Perkins J. P., Brostrom C. O., Ho E. S., Krebs E. G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1968—1976.
96. Corbin J. D., Reimann E. M., Walsh D. A., Krebs E. G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4849—4851.
97. Huttenen J. K., Steinberg D., Mayer S. E., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1350—1356.
98. Martelo O. J., Woo S. L. C., Reimann E. M., Davie S. W., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4807—4813.
99. Martelo O. J., Hirsch J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 1008—1015.
100. Ljungstrom D., Hjelmquist G., Engström L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 289—298.
101. Narumi S., Miyamoto E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 215—224.
102. Wieland O., Siess K., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **65**, 947—950.
103. Erlichman J., Rosenfeld R., Rosen O. N., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5000—5003.
104. Langan T. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5763—5765.
105. Mallette L. E., Nablett M., Eton J. H., Langan T. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6289—6291.
106. Rickwood D., Riches P. G., Mac Gillivray A. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 162—171.
107. Johnson E. M., Alfrey V. G., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 786—794.
108. Martini O. U., Gould H. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 621—629.
109. Wray H. L., Gray R. R., Olsson R. A., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1496—1498.
110. Walton G. M., Gill G. N., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2604—2611.
111. Blat C., Loeb J. E., (1971), *FEBS Letters*, **18**, 124—126.

112. Gressner A. M., Wool J. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6917—6925.
113. Grumt I., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 125—127.
114. Prestayko A. W., Olson M. O., Bush H., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 131—135.
115. Lemaire S., Pelletier G., Labrie F., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7303—7310.
116. Tada H., Kirchberger M. A., Repke D. J., Katz A. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6174—6180.
117. Corbin J. D., Krebs E. G., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 328—336.
118. Posner J. B., Hammermeister K. K., Bratvold J. G. E., Krebs E. G., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1040—1044.
119. Appleman M. M., Birnbaumer L., Torres H. N., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 39—43.
120. Skala J. P., Drummond G. J., Hahn P., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 195—199.
121. Skala J., Novak E., Hahn P., Drummond G. J., (1972), *Int. J. Biochem.*, **3**, 229—242.
122. Novak E., Drummond G. J., Skala J., Hahn P., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 511—518.
123. Soderling T. R., Corbin J. D., Park C. R., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1822—1829.
124. Spaulding S., Burrow G. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 386—387.
125. Knight B. L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 287—296.
126. Montague W., Howell L., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 321—327.
127. Sudilovsky D., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 85—91.
128. Korenman S. G., Bhalla R. C., Stevens R. H., (1974), *Science*, **183**, 430—432.
129. Gorin E., Rosenblum S., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 510—518.
130. Traugh J. A., Traut R. R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1207—1212.

RYSZARD FARBISZEWSKI *), KRZYSZTOF WOROWSKI **)

Enzymy proteolityczne tkanek nowotworowych

Proteolytic Enzymes of Malignant Tissues

Badania ostatnich lat dostarczyły wielu danych eksperymentalnych świadczących o udziale enzymów proteolitycznych w rozroście tkanek nowotworowych. Badania nad aktywnością enzymów proteolitycznych w nowotworach zostały zapoczątkowane w 1957 r. przez grupę badaczy z Ośrodka Badań nad Rakiem Instytutu Karola w Sztokholmie (1).

W poniższym przeglądzie zebrano dane dotyczące występowania lokalizacji, swoistości działania enzymów proteolitycznych tkanek nowotworowych, ich roli w procesie rozrostu i różnicowania komórek, ze szczególnym uwzględnieniem zmian składników powierzchniowych błon komórkowych pod wpływem tych enzymów. Przedstawiono również poglądy dotyczące znaczenia enzymów fibrynolitycznych oraz enzymów wywołujących proces krzepnięcia krwi w rozroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych.

I. Wewnątrzkomórkowe proteazy komórek nowotworowych

I-1. Ogólna charakterystyka i swoistość działania

Wewnątrz komórkowe enzymy proteolityczne występują powszechnie w tkankach prawidłowych i nowotworowych (2—17). Enzymy te charakteryzuje najwyższa aktywność w środowisku kwaśnym.

Postęp badań nad izolowaniem, oczyszczaniem, kontrolą właściwości fizykochemicznych i stałych kinetycznych oraz swoistości działania wewnątrzkomórkowych proteaz niektórych tkanek nowotworowych zaznaczył się szczególnie w ostatnich latach. Stwierdzono, że enzymy proteolityczne izolowane z komórek nowotworowych charakteryzują się odmiennymi właściwościami.

*) , **) Dr. Zakład Biochemii, Instytut Fizjologiczno-Biochemiczny, Akademia Medyczna, ul. Mickiewicza 2, 15-222 Białystok

Wykaz stosowanych skrótów: DMBA — dwumetylobenantracen, TLCK — tosylo-L-lizyno-chlorometyloketon, TPCK — tosylo-L-fenylalanino-chloroketon, TAME — ester metylowy tosylo-argininy.

ciwościami fizycznymi, w porównaniu z proteazami komórek prawidłowych m.in. wykazują zmniejszoną wrażliwość na temperaturę (7, 18). Optimum działania enzymów proteolitycznych niektórych tkanek nowotworowych, w odróżnieniu od analogicznych enzymów komórek prawidłowych, leży w dwóch zakresach pH, a mianowicie przy pH 3,8 i 4,5 (7).

Drogą chromatografii kolumnowej na CM-celulozie wyizolowano kwaśne proteazy z komórek raka wysiękowego Ehrlicha, podano ich charakterystykę oraz wykazano, że w komórkach tych występują dwie kwaśne proteazy, działające w dwóch różnych zakresach pH i posiadające różne właściwości fizykochemiczne (6). Badania porównawcze nad kwaśnymi proteazami wątroby, śledziony i nerki oraz mięsaka wskazują na różnice w swoistości substratowej tych enzymów.

Tabela 1

Swoistość katepsyny D mięsaka M-1 i wątroby szczurów przy zastosowaniu syntetycznych peptydów wg (8)

Lp	Substrat	% zhydrolizowanego wiązania w ciągu 3 godz.			% zhydrolizowanego wiązania w ciągu 17 godz.	
1	Ala-Asp-Gly-Leu-Glu-Val ↑	Gly-Leu 35			Gly-Leu 100	
2	Ala-Asp-Gly-Leu-Val ↑	Gly-Leu 35			Gly-Leu 100	
3	Z-Asp-Gly-Leu-Val ↑	—			Gly-Leu 25	
4	Ala-Phe-Gly-Leu-Asp-Val ↑ ↓ ↓	Ala-Phe	Gly-Leu		Ala-Phe	Gly-Leu
		5	35		12	85
5	Ala-Phe-Gly-Leu-Phe-Val ↑ ↓ ↓	Gly-Leu 35			16	35
					Gly-Leu	Leu-Phe
6	Ala-Asp-Gly-Leu-Phe-Val ↑ ↓ ↓	Gly-Leu 40			40 Gly-Leu 100	
7	Gly-Phe-Leu-Gly-Phe-Leu ↑ ↑ ↑	20	12	20	—	
		Phe-Leu	Leu-Gly	Gly-Phe		
		8	25	10		
8	Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lis ↑ ↑	50	8	15	—	
		Phe-Phe	Phe-Tyr	Tyr-Thr		
		25	—	30		

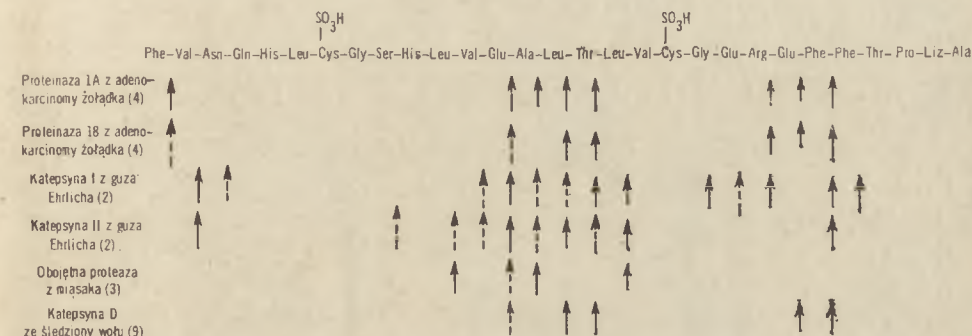
* Liczby umieszczone nad wiązaniami peptydowymi określają odsetki wiązania peptydowego zhydrolizowanego przez katepsynę D wątroby, natomiast liczby podane pod wiązaniami przez katepsynę D mięsaka.

Badania kinetyczne wykazały, że katepsyna D z przeszczepialnego mięsaka M-1 szczurów i katepsyna D wątroby mają różne powinowactwo do syntetycznych substratów (8). Katepsyna D z mięsaka, w przeciwieństwie do katepsyny z wątroby zdrowej hydrolizuje wiązania peptydowe w heksa-

peptydzie i pentapeptydzie, w których znajdują się dwie reszty aminokwasów dwukarboksylowych. Zastąpienie lub usunięcie jednego z aminokwasów dwukarboksylowych przez fenyloalaninę czyni ten substrat podatny również na działanie katepsyny D z wątroby.

Różnice w zdolności do rozszczepiania wiązań peptydowych przez wewnątrzkomórkowe proteazy z nowotworowych i tkanek prawidłowych dotyczą także innych syntetycznych peptydów (Tabela 1).

Różnice w swoistości proteaz komórek nowotworowych i prawidłowych wykazano również wobec utlenionego łańcucha B insuliny wołu (Ryc. 1).



Ryc. 1. Swoistość wewnątrzkomórkowych proteaz nowotworów badana na utlenionym łańcuchu B insuliny wołu

Strzałka ciągła oznacza hydrolizę szybką, strzałka przerywana hydrolizę powolną.

I-2. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja proteaz

Dotychczas niewiele wiemy o lokalizacji wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych komórek nowotworowych, podczas gdy wiemy, że w komórkach prawidłowych występują one głównie w lizosomach. Obecność proteaz wykazano jednak i w innych frakcjach subkomórkowych. De Duve i wsp. (19) wykazali już w 1955 r., że w komórkach wątrobiaka enzymy proteolityczne znajdują się zarówno we frakcji sedymentującej jak i rozpuszczalnej.

Stosując różnicowe wirowanie homogenatów guza Guérin w gradencie stężeń sacharozy stwierdzono aktywność katepsyny D we frakcji mitochondrialnej, w retikulum endoplazmatycznym i we frakcji mikrosomalno-lizosomalnej (20). Inkubacja lizosomów izolowanych z normalnych komórek wątrobowych, w pH 5,0 i w temperaturze 37°C powoduje aktywację proteaz lizosomalnych (21). Enzymy lizosomów wątrobiaka (21) oraz lizosomalne katepsyny nabłoniaka Guérin (20), czy też raka wysiękowego Ehrlicha (22) w tych warunkach nie ulegają aktywacji.

Ostatnio wykazano, że w guzie Guérin aktywność katepsyn A, B₁, D zwiększa się wraz z jego rozrostem, osiągając maksimum w końcowym

stadium rozwoju tego guza (23). Wzrost aktywności dotyczy zwłaszcza katepsyn obecnych we frakcji cytoplazmatycznej. Równoległe ze wzrostem aktywności tych enzymów zwiększa się zawartość produktów degradacji białek w tkance nowotworowej.

Wzrost aktywności niektórych proteaz lizosomalnych we frakcji cytoplazmatycznej komórek guza Guérin może świadczyć o zmianach ich przepuszczalności, a co za tym idzie, o zmianach w strukturze błon lizosomalnych. Ostatnio stwierdzono, że powierzchnia komórek nowotworowych i stransformowanych onkogennymi wirusami wykazują większą aktywność proteazową, zwłaszcza katepsyny B₁ niż powierzchnia komórek prawidłowych (24, 25).

I-3. Aktywność proteaz w tkankach nowotworowych i płynach ustrojowych

Aktywność proteaz lizosomalnych ludzkich guzów nowotworowych i wywołanych doświadczalnie nowotworów zwierzęcych jest wyższa niż w tkankach, z których te nowotwory pochodzą (26, 27, 28, 29). Zaobserwowano na przykład wysoką aktywność katepsyny D w guzach narządu rodowego człowieka (30). W nowotworach skóry myszy stwierdzono wysoką aktywność katepsyny D, a także β -glukuronidazy i fosfatazy kwaśnej (31). Fibroblasty stransformowane przez wirusy onkogenne wykazują również kilkakrotnie zwiększoną aktywność lizosomalnych proteaz w porównaniu z fibroblastami prawidłowymi (32). Również w pozakomórkowych płynach nowotworowych wykazano znaczny wzrost aktywności dwupeptydazy (33, 34), endopeptydazy, aminopeptydazy, katepsyny D oraz B₁ (34). W tabeli 2 przedstawiono aktywność kwaśnych proteaz i dwupeptydaz niektórych nowotworów i płynów ustrojowych.

Komórki nowotworowe młodej populacji przejawiają wyższą aktywność katepsynową i wyższą aktywność dwupeptydaz niż komórki nowotworowe starszej populacji (33). Szczegółowe badania nad aktywnością proteaz w komórkach nowotworowych wykazały, że aktywność tych enzymów jest różna w poszczególnych fazach cyklu mitotycznego komórki. Najwyższa aktywność proteaz przypada w okresie bezpośrednio poprzedzającym podział komórki i w czasie podziału, natomiast we wczesnej interfazie (prawdopodobnie w fazie G₁) aktywność proteaz jest najmniejsza (25). Spadek aktywności kwaśnych proteaz zaobserwowano w obszarach guzów nowotworowych objętych rozległą martwicą.

Sylvén i Bois-Swensson wyrażają pogląd, że nowotwory bardziej złośliwe charakteryzują się wyższą aktywnością kwaśnych proteaz niż nowotwory łagodne (34). Doświadczalnie wywołane czerniaki melanotyczne chomika złocistego mają wyższą aktywność proteolityczną niż czerniaki amelanotyczne (35). Przyczyną tego zjawiska jest prawdopodobnie występowanie w czerniakach melanotycznych dużych lizosomów z licznymi pochłoniętymi ziarnami melaninowymi tzw. melanosomów (36). W

czerniakach amelanotycznych nie wykryto powyższych struktur (37). W związku z powyższymi faktami autorzy próbują korelować obecność nieprawidłowych lizosomów z większą inwazyjnością w porównaniu z inwazyjnością czerniaków amelanotycznych.

Tabela 2

Aktywność kwaśnych proteaz i dwupeptydaz w wywołanych doświadczalnie guzach oraz w płynach zewnątrzkomórkowych, wg (34, 50)

	Aktywność kwaśnych proteaz A _{650pH 3,9}	Aktywność dwupeptydaz μl NaOH/godz
Mięsako-włókniak wywołany metylocholanrenem	0,38	25
Mięsako-włókniak prążkowano-komórkowy MCIM	—	15
Mięsak 37	0,59	46
Guz Walkera	0,07	9
Guz gruczołu piersiowego	0,67	9
Rak Ehrlicha-Landschütza	0,15	0,2
Płyn otrzewnowy, nienowotworowy	0,25	1,2

Aktywność kwaśnych proteaz określano stosując jako substrat hemoglobinę zdenaturowaną mocznikiem, aktywność dwupeptydaz wobec Ala-Gly jako substratu.

Aktywność enzymów proteolitycznych niektórych tkanek osobników z nowotworami ulega również zmianie. Aktywność katepsyn badana w wielojądrazstych leukocytach szczurów z guzem Walkera i mięsakiem Jensena jest niższa niż w leukocytach szczurów zdrowych (38). Ponieważ hydrolazy lizosomalne biorą udział w fagocytozie bakterii, niektórzy uważają, że spadek aktywności katepsyn może być przyczyną większej podatności na infekcje bakteryjne osobników z guzami nowotworowymi. W wątrobie ludzkiej z chorobą nowotworową oraz zwierząt z mięsakiem wykazano wzrost aktywności enzymów lizosomalnych (33,34). Niektórzy badacze próbują korelować podwyższoną aktywność katepsyny D w komórkach wątrobowych z wielkością nowotworu (39, 40).

Nie znamy dotąd przyczyny wzrostu aktywności proteaz w komórkach wątrobowych ludzi z nowotworami zlokalizowanymi w innych narządach. Niektórzy czynią odpowiedzialnym za wzrost aktywności katepsyny D czynnik cytotoksyczny wytwarzany przez guz nowotworowy, który mógłby pobudzać biosyntezę tego enzymu w lizosomach wątrobowych (41). Inni próbowali tłumaczyć to zjawisko znacznym wzrostem liczby lizosomów w komórkach wątrobowych zwierząt z przeszczepialnym mięsakiem (42). Podczas gdy dawniej uważano, iż proteazy lizosomalne tkanek nowotworowych przechodzą do krążenia i są wtórnie wychwytywane i gromadzone przez komórki wątrobowe (43). Za tym poglądem przemawiać by mogła podwyższona aktywność proteaz komórkowych w surowicy krwi i w płyc-

nach ustrojowych ludzi chorych (44, 45, 56) oraz zwierząt z wywołanymi doświadczalnie nowotworami (47). Wzrost aktywności pyrrolidynokarboksypeptydazy wykazano w surowicy krwi myszy obarczonych wątrobiakiem lub rakiem gruczołu sutkowego (48). Zwiększoną aktywność proteaz komórkowych stwierdzono również w moczu chorych z nowotworami (49). Wydaje się, że podwyższenie aktywności kwaśnych proteaz w płynach ustrojowych może zależeć od wielkości guza nowotworowego (50).

I-4. Znaczenie proteaz tkanek nowotworowych w karcynogenezie

Znaczenie enzymów proteolitycznych w tkankach nowotworowych jest podobne do tego, jaki enzymy te odgrywają w tkankach prawidłowych. Podobnie jak w tkankach prawidłowych działanie ich nie ogranicza się jedynie do degradacji białek tkankowych (51, 52). Proteazy te biorą ponadto udział w metabolizmie enzymów (53, 54) przeciwciał (55, 56), hormonów peptydowych i białkowych (57, 58, 59).

Wyższa aktywność wewnątrz komórkowych proteaz w tkankach nowotworowych niż w tkankach z których się one wywodzą może jednak nasuwać przypuszczenie o przyspieszonym katabolizmie białek nowotworowych. Z badań nad wewnątrzkomórkową degradacją białek komórek prawidłowych i nowotworowych wynika, że znacznie szybciej trawione są białka komórek nowotworowych (52, 60). Powyższe dane znajdują potwierdzenie w badaniach *in vitro*, w których wykazano, że białko zasadowe guza Guérin jest bardziej wrażliwe na działanie lizosomalnych proteaz komórek guza niż białka zasadowe komórek prawidłowych (61). Wskazywałoby to, że jedną z ważnych funkcji wewnątrzkomórkowych proteaz tkanek nowotworowych jest usuwanie nieprawidłowych białek tzn. białek powstałych w drodze mutacji lub białek charakterystycznych dla komórek nowotworowych. Obecność takich białek wykazano w komórkach nowotworowych ludzi i w nabłonniaku Guérin szczurów (62, 63). Produkty białek uwolnionych z rozpadu, nisko molekularne peptydy, bogate w argininę przechodzą do przestrzeni śródkomórkowych i do krwi (64, 65).

Inkubując komórki z hodowli znakowanymi ^{14}C -białkami *Chlorella* stwierdzono ponadto 3—10-krotnie szybszą degradację białek przez proteazy komórek nowotworowych i fibroblastów stransformowanych onkogennymi wirusami niż w przypadku proteaz komórek prawidłowych (12). Stosując białka zawierające znakowaną ^{14}C -argininę i jej strukturalny analog kanawaninę, udało się wykazać, że białka w skład których wchodzi ten niespotykany w przyrodzie analog ulegają szybciej degradacji niż białka prawidłowe (66). W efekcie działania proteaz lizosomalnych z komórek nowotworowych mogą uwalniać się nawet białka o znacznych ciężarach cząsteczkowych (67).

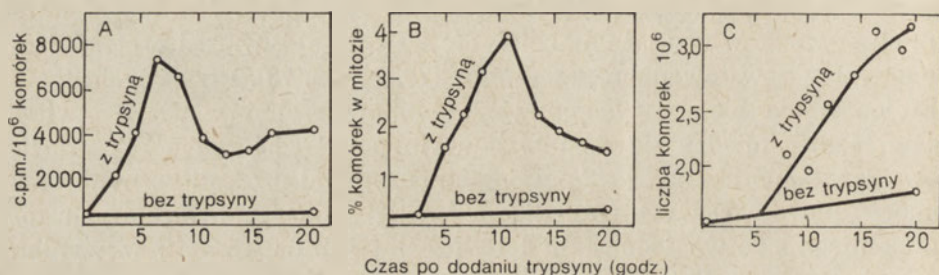
Duże znaczenie w rozpadzie komórek prawidłowych i nowotworowych przypisuje S y l v e n katepsynom B, zwłaszcza katepsynie B₁ (68, 69). En-

zym ten występuje w płynach śródmiąższowych guzów w dwóch lub trzech formach molekularnych i działa w szerokim zakresie pH. Jego aktywność jest około 20-krotnie wyższa w płynach śródmiąższowych guzów niż w płynach pochodzących z tkanek prawidłowych. Przyjmuje się, że katepsyna B₁ może degradować zarówno powierzchniowe składniki komórek jak i wewnątrzkomórkowe (25). Z porównania działania różnych enzymów proteolitycznych na komórki wynika, że katepsyna B₁ wywołuje szybciej zmiany strukturalne komórek niż trypsyna (25). Pojawienie się katepsyny B₁ na powierzchni komórek nowotworowych i komórek stransformowanych wirusami onkogennymi jest przyczyną zmian konformacji białek i zwiększenia szybkości połowicznego rozpadu sialopeptydów, znajdujących się na powierzchni błon komórkowych (25). Wzrost dostępności wewnątrzkomórkowych proteaz na powierzchni błon komórkowych może ponadto przyczyniać się do powstawania przerzutów nowotworowych, dzięki ułatwionemu odrywaniu się komórek od części litej guza. Przemawiają za tym obserwacje wskazujące na zbieżność wzrostu aktywności proteaz lizosomalnych z powstawaniem przerzutów (70, 71, 72, 73). Przy użyciu techniki jodowania białek występujących na powierzchni komórek stwierdzono różnice między składem białkowym powierzchni komórek prawidłowych a komórek, na które podziałano enzymami proteolitycznymi oraz komórek nowotworowych (74). Białka powierzchniowe prawidłowych komórek ulegają łatwo jodowaniu i bardzo łatwemu usuwaniu w wyniku działania proteaz. Natomiast na powierzchni komórek nowotworowych, stransformowanych wirusami onkogennymi oraz traktowanych enzymami proteolitycznymi nie ma białek podlegających jodowaniu.

Coraz więcej jest ostatnio danych na temat zależności między transformacją onkogeną komórek a obniżoną zawartością składników węglowodanowo-białkowych powierzchniowej warstwy błon (74, 75, 76). G a h m b e r g i H a k o m o r i (77) wyizolowali z błon komórek prawidłowych frakcję galaktoproteidową o ciężarze cząsteczkowym 200 000, nie wykrywaną w komórkach nowotworowych i stransformowanych. Ostatnio H a k o m o r i (78) w obszernej pracy przeglądowej podsumował badania z tej dziedziny. Sądzi on, że procesowi transformacji onkogennej lub transformacji wywołanej czynnikami chemicznymi towarzyszą zawsze zmiany w składzie i syntezie składników glikoproteidowych, spowodowane wypadnięciem z powierzchniowej warstwy błon wysokocząsteczkowych frakcji. Konsekwencją jest stymulacja syntezy DNA, pobudzenie mitoz i ujawnienie odmiennych właściwości komórek.

Pod działaniem egzogennych enzymów proteolitycznych pojawiają się na powierzchni komórek prawidłowych zmiany podobne do zmian wywołanych pod wpływem onkogennych wirusów lub chemicznych czynników rakotwórczych (79). Zmiany te polegają na częściowej degradacji powierzchniowych składników glikopeptydowych i mukopeptydowych błon komórkowych (80, 81). Komórki takie wykazują wzmożoną aktywność pro-

liferacyjną (80, 81, 82), tracą zdolność do hamowania kontaktowego (83), uzyskują odmienne właściwości antygenowe (84, 85, 86) oraz z łatwością ulegają aglutynacji pod wpływem lektyn (87, 88, 89, 90). Badania nad wpływem działania proteaz na izolowanie tkanki szczura wykazały, że enzymy zawierające w centrum aktywnym serynę stymulują wbudowywanie ^3H -leucyny do białek komórkowych (91). Stwierdzono również wzrost szybkości wbudowywania ^3H -tymidyny w DNA komórek, pobudzenie mitoz i wzrost ich liczby, proporcjonalny do stężenia dodanej trypsyny (80). Pronaza i ficyna, dodane do hodowli komórek wykazują podobne efekty jak trypsyna (80). Zjawisko to autorzy tłumaczą bezpośrednim działaniem tych enzymów na komórki, modyfikacją powierzchniowej warstwy błony komórkowej oraz zmianą przepuszczalności błon komórkowych dla niektórych czynników regulujących wzrost komórek.

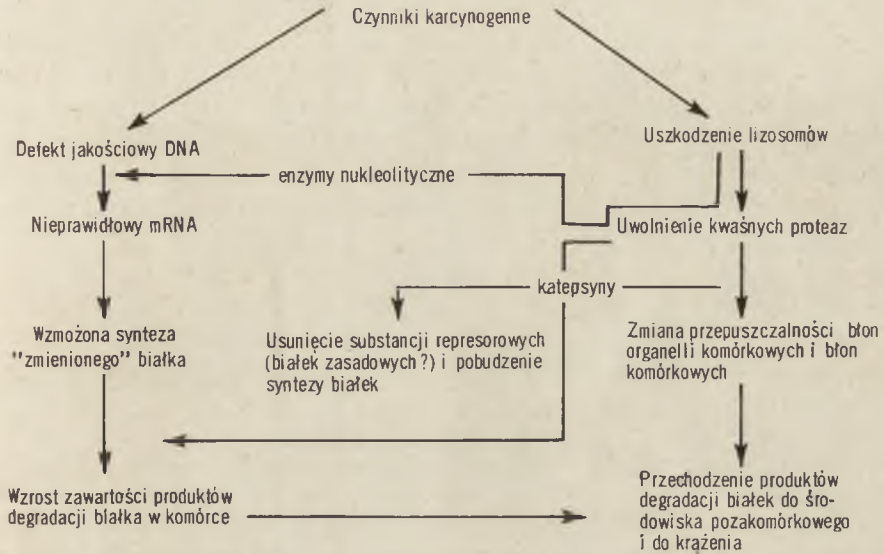


Ryc. 2. Wpływ trypsyny na: A) szybkość wbudowywania ^3H -tymidyny, B) % komórek w mitozie, C) liczbę komórek, (80).

Uważa się, że powstające w wyniku działania proteaz, zmiany składu chemicznego powierzchniowej warstwy błon komórek, mogą być odpowiedzialne za utratę kontroli wzrostu, za wzbudzenie i zmianę informacji genetycznej komórek prawidłowych oraz za indukcję procesów biosyntezy białka w komórce (80, 92, 93). Potwierdzeniem tych sugestii są doświadczenia z inhibitorami proteaz, które dodane do hodowli komórek transformowanych hamowały ich wzrost bardziej efektywnie niż wzrost komórek prawidłowych (11, 12).

Szereg autorów wyraża pogląd, że dzięki zwiększonej aktywności proteaz lizosomalnych, białka zasadowe obecne w jądrze komórkowym i związane z DNA, mogą ulec oderwaniu z tego kompleksu (94, 95, 96). Powoduje to odblokowanie DNA, derepresję genów, zwiększoną syntezę białka oraz wzrost ilości podziałów komórkowych. O istotnej roli proteaz lizosomalnych w inwazji nowotworowej opublikowano niedawno artykuł poglądowy w *Postęпах Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (97). Powiązania działania czynników kancerogennych i roli enzymów lizosomalnych w procesie nowotworzenia stara się przedstawić hipoteza przedstawiona na rycinie 3.

W wyniku działania czynników karcynogennych może dochodzić do defektu jakościowego DNA i powstawania nieprawidłowego mRNA oraz biosyntezy „zmienionego” białka. Z drugiej strony czynniki kancerogenne wpływać mogą na lizosomy komórkowe i uwalniać enzymy hydrolityczne, które w zależności od swoistości substratowej zmieniać będą bądź to DNA lub RNA albo degradować substancje represorowe (białka zasadowe) i pobudzać tą drogą syntezę białek.



Ryc. 3. Hipotetyczny schemat ilustrujący powiązania działania czynników karcynogennych i udziału enzymów lizosomalnych w procesie nowotworzenia. (Schemat autorów).

II. Znaczenie enzymów uczestniczących w procesie krzepnięcia krwi i fibrylizacji we wzroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych

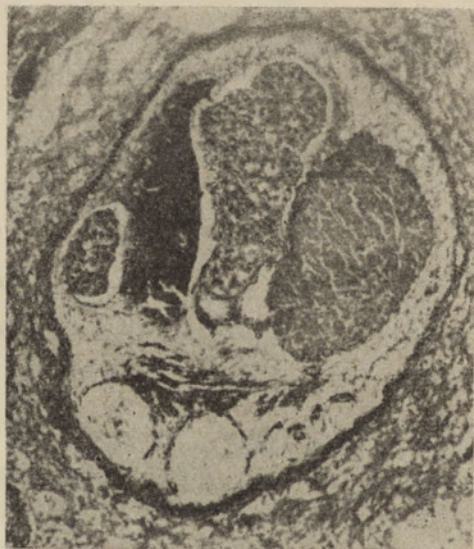
Powstawaniu fibryny w stanach nowotworowych sprzyjają:

- nadkrzepliwość krwi polegająca na zwiększeniu poziomu prekursorów białkowych czynników krzepnięcia i fibrynogenu oraz zahamowanie układu fibrynolitycznego na skutek podwyższenia poziomu antyplazmin,
- zwolnienie szybkości przepływu krwi w naczyniach zaopatrujących tkankę nowotworową,
- uszkodzenie ściany naczyń krwionośnych w obrębie tkanki nowotworowej, odsłonięcie włókien kolagenu, aktywacja czynnika XII i uwolnienie tromboplastyn tkankowych.

Białkowe czynniki biorące udział w procesie krzepnięcia krwi i fibrylizacji są enzymami proteolitycznymi o wysokiej specyficzności substrata-

towej. W warunkach fizjologicznych występują one w ustroju w postaci nieczynnej, a ich aktywacja jest wynikiem ograniczonej proteolizy. Stwierdzono, że enzymy te mogą ulegać aktywacji między innymi przez substancje zawarte w komórkach nowotworowych (98, 99, 100) i stransformowanych przez onkogenne wirusy DNA, RNA i czynniki rakotwórcze (101, 102).

Mechanizm aktywacji układu krzepnięcia przez substancje zawarte w tkance nowotworowej nie jest całkowicie wyjaśniony. Stwierdzono, że nowotwory ludzi i zwierząt wykazują aktywność tromboplastyczną, którą zlokalizowano we frakcji mikrosomalnej komórek (103). Istnieją poglądy, że aktywność tromboplastyczna komórek nowotworowych zależy od obecności w nich „rakowego czynnika krzepnięcia” (CCF — *cancer coagulative factor*) (99, 100). Obecność tego czynnika stwierdzono także we frakcji prealbuminowej osocza (100). Uważa się, że przy rozpadzie guza nowotworowego czynnik ten uwalnia się do środowiska i zapoczątkowuje proces krzepnięcia krwi.



Ryc. 4. Naczynie krwionośne z mikrozakrzepem zawierającym komórki nowotworowe. Powiększenie 300x (104).

Bardzo interesujące są wyniki badań Simki z 1968 (104), który stwierdził rozsiane mikrozakrzepy w małych i w dużych naczyniach krwionośnych osób zmarłych z powodu choroby nowotworowej. W niektórych mikrozakrzepach wykazano obecność komórek nowotworowych (Rycina 4).

Przy pomocy technik histochemicznych stwierdzono obecność dużych ilości fibryny wokół tkanek nowotworowych (105, 106). Doświadczenia z fibrynogenem znakowanym ^{131}J potwierdziły te obserwacje (107, 108). Stwierdzono również wybiórcze gromadzenie się przeciwciał antyfibry-

nowych znakowanych ^{131}J wokół tkanki nowotworowej (109, 110). Powyższe dane stworzyły nowe możliwości lokalizacji guza nowotworowego i radioterapii nowotworów.

Kierulf i Godal w 1972 r. opublikowali badania dotyczące fibrynemii w nowotworach trzustki (111). Zasługują one z dwóch punktów widzenia na uwagę: po pierwsze potwierdzają występowanie różnych form molekularnych fibrynogenu i rozpuszczalnej fibryny związanej kompleksowo z fibrynogenem, po drugie świadczą o wyraźnej nadkrzepliwości w chorobie nowotworowej. Autorzy ci stwierdzili, na podstawie oznaczeń N-końcowych aminokwasów, że w białku krzepnącym, izolowanym z osocza osób z nowotworem trzustki, występuje około 11% rozpuszczalnej fibryny.

Odkładanie się fibryny na powierzchni komórek nowotworowych posiada istotne znaczenie w rozroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych. Nierozpuszczalny, „zdenaturowany” włóknik stanowi dobrą pożywkę dla rozrastającego się guza, gdyż jest bardziej podatny na proteolizę od rodzimego białka, jakim jest rozpuszczalny fibrynogen (112). Przyjmuje się, że tylko komórki nowotworowe, związane ze śródbłonkiem naczyń krwionośnych za pośrednictwem włóknika, mogą być źródłem ognisk przerzutowych, natomiast pozostałe komórki zostają pochłonięte przez fagocyty (113, 114, 115).

Za istotną rolę krzepnięcia krwi i fibrynolizy we wzroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych przemawia także zmniejszenie się ilości przerzutów po podaniu inhibitorów układu krzepnięcia jak: heparyny i dikumarolu lub aktywacji układu fibrynolitycznego poprzez plazminę, streptokinazę lub urokinazę (116, 117, 118, 119, 120). Plazmina i inne enzymy proteolityczne trawiąc włóknik wokół komórek nowotworowych ułatwiają wnikanie do niego cytostatyków. Zastosowanie inhibitorów plazminy wykazuje działanie przeciwstawne, przyspiesza wzrost komórek guza i zwiększa powstawanie przerzutów (121).

Preparaty antykoagulacyjne utrudniają adhezję komórek nowotworowych do tkanek. Ostatnio wykazano, że podawanie antykoagulantów chorym hamuje rozprzestrzenianie się komórek guza, dzięki zmniejszeniu poziomu protrombiny i zapobieganiu precypitacji fibrynogenu na powierzchni komórek nowotworowych (122). Istnieją poglądy, że antytrrombinowe działanie antykoagulantów ułatwia mikrocyrkulację wewnątrz guza i zwiększa skuteczność chemoterapeutyków w leczeniu nowotworów (117).

III. Uwagi o roli inhibitorów enzymów proteolitycznych w rozroście nowotworów

W rozważaniach nad rolą inhibitorów enzymów proteolitycznych we wzroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych należy brać pod uwagę specyficzność tych inhibitorów w stosunku do określonych enzymów

proteolitycznych oraz miejsce ich działania w obrębie ustroju. Wydaje się, że rola tych inhibitorów w tkankach nowotworowych, w płynach ustrojowych i w krążeniu jest odmienna.

W guzach nowotworowych Guérin wykazano obecność inhibitorów katepsyny D, których zawartość obniża się w późniejszym stadium rozwoju guza, co zbiega się czasowo z szybszym rozrostem guza (123). Sugerowałoby to, że inhibitory proteaz wewnątrzkomórkowych opóźniają wzrost nowotworów. H o z u m i i wsp. (124) zaobserwowali zahamowanie wzrostu nowotworu skóry myszy, wywołanego 7,12 DMBA i olejem krotonowym *in vivo* po zastosowaniu leupeptyny, inhibitora proteaz izolowanego z drobnoustrojów.

Podobnie, syntetyczne inhibitory TLCK, TPCK i TAME dodane do medium inkubacyjnego komórek włókniako-mięsaka chomika złocistego powodują częściowe zahamowanie ich aktywności proliferacyjnej (125). W badaniach nad leukocytami białaczkowymi L — 1210, wytwarzającymi znaczne ilości proteaz oraz nad guzem DANA — 435 wykazano, że α_2 -makroglobulina hamuje podziały leukocytów i wzrost guza szczurów (126). Znaczne zahamowanie rozrostu złośliwych nowotworów typu włókniako-mięsaka oraz nowotworów gruczołu sutkowego stwierdzono po zastosowaniu trasylołu (127). Efekt przeciwnowotworowy trasylołu wiąże się być może z zahamowaniem aktywności proteolitycznej komórek poddanych jego działaniu.

Inhibitory proteaz, syntetyczne i niektóre naturalne, dodane do hodowli transformowanych fibroblastów myszy SV 3T3 wywołują zmiany w kinetyce wzrostu populacji (128). W obecności inhibitorów proteaz zwiększa się populacja komórek będących w fazie G₂. Badając efekty naturalnych inhibitorów proteaz wykazano, że inhibitor sojowy trypsyny nie zmienia szybkości wbudowywania znakowanej tymidyny do DNA (129). Obecnie uważa się, że inhibitory proteaz mogą wywołać pewne „uporządkowanie” wzrostu na szkle komórek transformowanych, a zmiany przez nie wywołane można traktować jako zmiany fenotypowe (128).

In vivo inhibitory proteaz hamują w jednakowym stopniu aktywność proteaz tkanek nowotworowych (127) jak i podwyższoną aktywność proteaz tkanek „gospodarza” (np. olej krotonowy) (95, 124).

Co się tyczy inhibitorów plazminy, trypsyny i chymotrypsyny to ich zawartość w tkankach nowotworowych jest znaczna (130, 131, 132). Występują one w zwiększonych ilościach również w osoczu krwi (133, 134, 135) i w płynach ustrojowych (133). Przyjmuje się, że źródłem zwiększonej zawartości tych inhibitorów są rozpadające się komórki guza (133). Inhibitory proteaz we krwi w przypadkach nowotworów złośliwych u ludzi i zwierząt sprzyjają powstawaniu przerzutów nowotworowych, utrudniając trawienie włókniaka wokół komórek nowotworowych i zwiększając w ten sposób ich przyleganie i ułatwiają ufixowanie się w naczyniu krwionośnym (121).

IV. Uwagi końcowe

Enzymy proteolityczne mogą powodować zmiany w „architekturze” powierzchniowej warstwy błon komórkowych. W efekcie może to doprowadzić do zaburzeń w międzykomórkowym oddziaływaniu, zaniku hamowania kontaktowego i w ruchliwości elektroforetycznej komórek. W wyniku tych zmian komórka uwalnia się w mniejszym lub większym stopniu spod kontroli mechanizmów regulujących jej wzrost. Nawet śladowe ilości proteaz mogą stymulować syntezę DNA, pobudzać mitozy i podziały komórek. Występujące w zwiększonej ilości w cytoplazmie i na powierzchni błon komórek nowotworowych proteazy, trawią białka komórkowe, doprowadzając do powstawania produktów ich degradacji. Produkty te pojawiają się w przestrzeniach śródkomórkowych i przechodzą do naczyń krwionośnych.

Rola enzymów proteolitycznych biorących udział w procesie krzepnięcia krwi i fibrynolizy, we wzroście i powstawaniu przerzutów nowotworowych jest niewątpliwa. Poznanie powyższych powiązań stwarza możliwość zapobiegania wzrostowi i przerzutom nowotworowym za pomocą aktywacji układu fibrynolitycznego lub hamowania powstawania fibryny.

Należy podkreślić, że przedstawione w niniejszym artykule poglądy i hipotezy dotyczące roli enzymów proteolitycznych i ich inhibitorów w karcynogenezie mają charakter dyskusyjny. Ponieważ nieznaną jest dotychczas patogeneza nowotworów wydaje się, że wysunięte przypuszczenie o roli enzymów proteolitycznych w powstawaniu i rozroście nowotworów winny być również brane pod uwagę.

Artykuł otrzymano 12.7.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 13.6.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Sylven B., Malgren H., (1957), *Acta Radiol. (Suppl.)*, **154**, 1—124.
2. Keilova H., Keil B., (1964), *Collec. Czech. Chem. Commun.*, **29**, 2272—2275.
3. Kozakova O. W., Orechowicz W. N., (1969), *Biokhimiya*, **34**, 73—76.
4. Etherington D. J., Taylor W. H., (1972), *Clin. Sci.*, **42**, 79—90.
5. Weiss L., (1972), W *The Chemistry of Biosurfaces*, red. Hair M. L. str. 377—447, Academic Press, New York.
6. Keilova H., Keil B., (1962), *Collec. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 2193—2201.
7. Keilova H., Keil B., (1962), *Collec. Czech. Chem. Commun.*, **27**, 2186—2192.
8. Kozakova O. V., Orekhovich V. N., Pourchet L., Schuck J. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4224—4228.

9. Press E. M., Porter R. R., Cebra J., (1960), *Biochem. J.*, **74**, 501—514.
10. Bosmann H. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **264**, 339—343.
11. Schnebli H. P., Burger M. M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3825—3827.
12. Schnebli H. P., (1972), *Schweiz. Med. Wschr.*, **102**, 1194—1197.
13. Unkeless J. C., Tobia A., Ossowski L., Quigley J. P., Rifkin D. B., Reich E., (1973), *J. Exp. Med.*, **137**, 85—111.
14. Ossowski L., Quigley J. P., Kellermann G. M., Reich E., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 1056—1064.
15. Rifkin D. B., Loeb J. N., Moore G., Reich E., (1974), *J. Exp. Med.*, **139**, 1317—1328.
16. Bosmann H. B., Lockwood T., Morgan H., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **83**, 25—31.
17. Bosmann H. B., (1974), *Nature*, **249**, 144—145.
18. Feo F., Bonelli G., (1971), *Experientia*, **27**, 317—318.
19. De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmans F., (1955 b), *Biochem. J.*, **60**, 604—617.
20. Poole A. R., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 543—549.
21. Wattiaux R., Wattiaux-de Coninck S., Van Dijck J. M., Dupal M. F., Morris H. P., (1970), *Eur. J. Cancer*, **6**, 503—515.
22. Horvat A., Touster O., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **148**, 725—740.
23. Farbiszewski R., Worowski K., Rzeczycki W., (1974), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**, 829—836.
24. Schnebli H. P., (1974), W Control of Proliferation in Animal Cells, red. Clarkson B., Baserga R., str. 327—362, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
25. Sylven B., Snellman O., Stränk P., (1974), *Virchows Arch.*, **17**, 97—112.
26. Sylven B., (1968), *Eur. J. Cancer*, **4**, 463—474.
27. Hess R., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 940—943.
28. Ottoson R., Sylven B., (1960), *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 41—47.
29. Gullino P. M., (1973), *J. Nat. Cancer Inst.*, **51**, 313—316.
30. Blackwood C. E., Mandl I., Long M. E., (1965), *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, **91**, 419—429.
31. Shamberger R. J., Rudolph G., (1967), *Nature*, **213**, 617—618.
32. Bosmann H. B., (1969), *Exp. Cell. Res.*, **54**, 217—221.
33. Sylven B., Malgren H., (1957), *Acta Radiol. (Suppl.)*, **154**, 1—124.
34. Sylven B., Bois-Swensson I., (1965), *Cancer Res.*, **25**, 458—468.
35. Zbytniewski Z., Drewa G., (1971), *Nowotwory*, **21**, 67—74.
36. Novikoff A. B., Albala A., Biempiec L., (1968), *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 299—319.
37. Mishima Y., (1967), *Adv. Biol. Skin*, **8**, 509—548.
38. Kampchmidt R. F., Wels D., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 2369—2371.
39. Scherstan T., Wahlgvist L., Johansen L. G., (1969), *Cancer*, **23**, 608—613.
40. Scherstan T., Wahlgvist L., Jilderos B., (1971), *Cancer*, **27**, 278—284.
41. Holmberg B., (1964), *Z. Krebsforsch.*, **66**, 65—72.
42. Ghadially F. N., Parry E. W., (1965), *Cancer*, **18**, 485—495.
43. Straus W. J., (1962), *Exp. Cell. Res.*, **27**, 80—94.
44. Weissman G., (1967), *Ann. Rev. Med.*, **18**, 97—112.
45. Butherworth S. T. G., (1970), *J. Path.*, **101**, 227—232.
46. Möbius W., Müller W., Carol W., Bonnow A., (1967), *Arch. Geschwulstforsch.*, **30**, 5—41.

47. Kampschmidt R. F., Wels D., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 1028—1035.
48. Szewczuk A., Albert Z., (1973), *Fol. Histochem. Cytochem.*, **11**, 75—82.
49. Tetzner E., (1971), *Österr. Zschr. Krebsforsch.*, **26**, 233—237.
50. Sylven B., Bois I., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 831—836.
51. Dingle J. T., Barrett A. J., Weston P. D., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 1—13.
52. Goldberg A. L., Dice J. F., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 835—869.
53. Pütter J., Otto K., (1972), *Arzneim. Forsch.*, **22**, 1743—1746.
54. Bond J. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **327**, 157—165.
55. Fehr K., Lospalluto J., Ziff M., (1970), *J. Immunol.*, **105**, 973—983.
56. Ghetie V., Mihaescu S., (1973), *Immunochemistry*, **10**, 251—255.
57. Maruyama M., Fujita T., Ohata M., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 245—253.
58. Kussendrager K. O., Jong Y., Bouma J. M. W., Gruber M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 75—86.
59. Callaham P. X., Mc Donald J. K., Ellis S., *Fed. Proc.*, (1972), **31**, 1105—1113.
60. Goldberg A. L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 422—426.
61. Farbiszewski R., Rzczycki W., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (w druku).
62. Dickinson J. P., Caspary E. A., (1973), *Brit. J. Cancer*, **28** suppl. **1**, 224—228.
63. Farbiszewski R., Rzczycki W., (1974), *Neoplasma*, **21**, 363—366.
64. Farbiszewski R., Rzczycki W., (1974), *Experientia*, **30**, 855—856.
65. Farbiszewski R., Rzczycki W., Worowski K., Głowiński S., (1973), *Neoplasma*, **20**, 203—208.
66. Knowless S. E., Gunn J. M., Hanson R. W., Balard F. J., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 595—600.
67. Wallach D. F. H., (1973), w *Biological Membranes*, red. Chapman D., Wallach D. F. M., t. 2, str. 253—294, London, New York, Academic Press.
68. Sylven B., (1968), *Eur. J. Cancer*, **8**, 559—562.
69. Sylven B., (1974), *Scgweiz. Med. Wschr.*, **104**, 258—261.
70. Sylven B., (1971), *Oncology*, **1**, 411—416, Chicago: Year Book Med. Publ. Inc.
71. Cho-Chung Y. S., Gulino P. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4743—4749.
72. Shamberger R. J., Hozumi M., Morris H. P., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1632—1639.
73. Weiss L., (1967), w *Proc. Sewenth. Cancer Conf. Toronto*, str. 292—315, Pergamon.
74. Hynes R. O., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3170—3174.
75. Bussel R. H., Robinson W. S., (1973), *J. Virol.*, **12**, 320—327.
76. Roushlahti E., Vaheri A., Kunsela P., Linder E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 352—358.
77. Gahmberg C. G., Hakomori S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3329—3333.
78. Hakomori S., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **417**, 55—89.
79. Rubin H., (1970), *Science*, **167**, 1271—1272.
80. Sefton B. M., Rubin H., (1970), *Nature*, **227**, 843—845.
81. Burger M. M., (1970), *Nature*, **227**, 170—171.
82. Winzler R. J., Harris I. D., Pekas D. J., Johnson C. A., Weber P., (1967), *Biochemistry*, **6**, 2195—2202.
83. Holley R. W., Kierman A. J., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 300—304.
84. Häyry P., Defendi Y., (1970), *Virology*, **41**, 22—29.

85. Rapp F., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 1832—1834.
86. Burger M. M., Goldberg A. R., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 359—366.
87. Inbar M., Sachs L., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 1418—1425.
88. Kornfeld S., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **192**, 542—545.
89. Sharon N., Lis H., (1972), *Science*, **177**, 949—959.
90. De Petris S., Raff M. C., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 275—278.
91. Sakai T., Lavis V. R., Ensick J. W., Williams R. H., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 1096—1099.
92. Hirschhorn R., Kaplan J. M., Goldberg A. F., Hirschhorn K., Weissman G., (1965), *Science*, **147**, 55—57.
93. Weiss L., (1967), *W Frontiers of Biology*, str. 123—289. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
94. Allfrey Y. G., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 1447—1460.
95. Troll W., Klassen A., Janoff A., (1970), *Science*, **169**, 1211—1213.
96. Weissmann G., Troll B. L., Van Duuren, Sessa G., (1968), *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 2421—2434.
97. Rostworowska B., (1974), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **28**, 875—900.
98. Holyoke E., Ichihashi H., (1966), *J. Nat. Cancer. Inst.*, **36**, 1049—1055.
99. O'Meara R. A. Q., (1958), *Irish J. Med. Sci.*, **6**, 474—479.
100. O'Meara R. A. Q., Thornes R., (1961), *Irish J. Med. Sci.*, **423**, 106—112.
101. Unkeless J., Tobia A., Ossowski L., Quigley J., Riffin O., Reich E., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 851.
102. Ossowski L., Unkeless J. C., Tobia A., Quigley J. P., Rifkin D. B., Reich E., (1973), *J. Exp. Med.*, **137**, 112—126.
103. Clarke N., (1965), *Nature*, **205**, 608—610.
104. Simko M., (1968), *Bratislavská, Lek Listy*, **49**, 58—65.
105. Back N., Shields R., de Witt G., Branshaw R., Ambrus C. M., (1966), *J. Nat. Cancer Inst.*, **36**, 171—180.
106. Fisch C., Jones A., Gambil M., (1951), *Gastroenterology*, **18**, 190—195.
107. Ogura T., Tsubura E., Yamamura Y., (1970), *Gann*, **61**, 443—449.
108. Copeland E. S., Michaelson S. M., (1970), *Acta Radiol.*, **9**, 323—336.
109. Spar I. L., Bale W. F., Goodland R. L., Casarett G. W., Michaelson S. M., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 1501—1504.
110. Day E. D., Plaminsek J. A., Pressman D., (1959), *J. Nat. Cancer Inst.*, **22**, 413—431.
111. Kierulf P., Godal H. G., (1972), *Scand. J. Haemat.*, **9**, 370—376.
112. Grossi C. E., Agostino D., Clifton E. E., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 605—608.
113. Fisher B., Fisher E. R., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 421—425.
114. Millar R. C., Ketchan A. S., (1974), *J. Med.*, **5**, 23—31.
115. Jones D. S., Wallace A. C., Fraser E. E., (1971), *J. Nat. Cancer Inst.*, **46**, 493—504.
116. Thornes R. D., (1969), *J. Irish. Med. Assoc.*, **62**, 426—429.
117. Wood S., (1974), *J. Med.*, **5**, 7—22.
118. Thornes R. D., (1974), *J. Med.*, **5**, 83—91.
119. Clifton E. E., Grossi C. E., (1974), *J. Med.*, **5**, 107—113.
120. Brown J. M., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 1217—1224.
121. Boeryd B., Hagmar B., Johnson G., Ryd W., (1974), *Path. Europ.*, **9**, 119—123.
122. Thornes R. D., Smyth H., Browne O., O'Gorman M., Reen D. J., Farrel D., Holland P. D. J., (1974), *J. Med.*, **5**, 92—97.
123. Farbiszewski R., Worowski K., w przygotowaniu do druku.

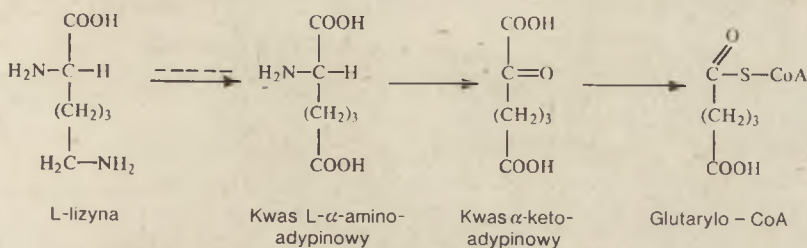
124. Hozumi M., Ogawa M., Sugimura T., Taksuchi T., Umezawa H., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 1725—1728.
125. Goetz I. E., Weinstein C., Roberts E., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2469—2474.
126. Von Ardenne M., Chaplain R. A., (1973), *Experientia*, **29**, 1271—1272.
127. Latner A. L., Longstaff E., Turner G. A., (1974), *Brit. J. Cancer*, **30**, 60—67.
128. Collard J. G., Smets L. A., (1974), *Exp. Cell Res.*, **86**, 75—80.
129. Whur P., Robson R. T., Payne N. E., (1973), *Brit. J. Cancer*, **28**, 417—428.
130. Brecher A. S., Quin N. M., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 203—206.
131. Wasilauskas V. P., Brecher A. S., (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 1212—1215.
132. Harris C. C., Primak A., Cohen M. H., (1974), *Cancer*, **34**, 280—281.
133. Worowski K., Farbiszewski R., (1971), *Nowotwory*, **21**, 253—259.
134. Mootse G., Agostino D., Cliffton E. E., (1965), *J. Nat. Cancer Inst.*, **35**, 567—572.
135. Ogston D., Dawson A. A., (1973), *Acta Haematol.*, **49**, 89—95.
136. Ogston D., Dawson A. A., Adam H. M., (1972), *Acta Haematol.*, **48**, 322—330.

GRZEGORZ RACZYŃSKI *)

Katabolizm lizyny w tkankach ssaków

Catabolism of Lysine in Mammalian Tissues

Badania nad metabolizmem lizyny w tkankach ssaków trwają nieprzerwanie od prawie 40 lat, lecz jeszcze w latach pięćdziesiątych uważano, że lizyna jest metabolicznie nieczynna i odgrywa nieznaczną rolę w procesach transaminacji i dezaminacji. Wnioski te wyciągnięto na podstawie badań, w których wykazano, że po podaniu szczurom lizyny znakowanej ^{15}N w grupie α -aminowej i deuterem w łańcuchu węglowym na-



Ryc. 1. Produkty końcowe katabolicznej przemiany L-lizyny w tkankach ssaków

stępowało jej włączanie do białek bez większych zmian w stosunku D : ^{15}N (1). Także podawanie szczurom ^{15}N -aminokwasów nie prowadziło do wcielania izotopu do α -aminowej grupy lizyny (2, 3). Pogląd ten jednak uległ zmianie gdyż stwierdzono, że lizyna podobnie jak inne aminokwasy, bierze czynny udział w metabolizmie komórkowym ssaków. Część cząsteczki tego aminokwasu wbudowane w łańcuchy polipeptydowe prokolagenu ulegają hydroksylacji do hydroksylizyny — aminokwasu niezbędnego do wytworzenia wiązań krzyżowych w kolagenie (4—7). Wyniki badań przeprowadzonych ostatnio wykazały także, że lizyna jest prekursorem w biosyntezie karnityny (8—12), związku, który bierze udział w przeno-

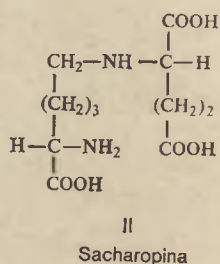
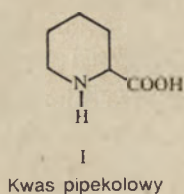
*) Dr, Zakład Fizjologii Odżywiania, Instytut Fizjologii i Żywnienia Zwierząt PAN, 05-110 Jabłonna k/Warszawy

Wykaz stosowanych skrótów: FAD — dwunukleotyd flawinoadeninowy, NAD — dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy, NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego.

szeniu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do mitochondriów (13, 14). Badania przemian lizyny w tkankach ssaków dostarczyły również danych na temat dróg katabolizmu tego aminokwasu.

Produktem pośrednim w przemianach katabolicznych lizyny jest kwas α -aminoadypinowy (15—19). Związek ten przekształca się w kwas α -ketoadypinowy, a następnie w glutarylo-CoA, metabolit powstający także w wyniku przemian innych aminokwasów (Ryc. 1).

Przeprowadzone dotychczas badania w różnych laboratoriach nie wyjaśniły jednak całkowicie w jaki sposób lizyna przekształca się w kwas α -aminoadypinowy w tkankach ssaków — czy poprzez stadium kwasu piperkolowego (I), czy sacharopiny (II).



Celem niniejszego artykułu jest omówienie głównych kierunków badań nad katabolizmem lizyny w tkankach ssaków oraz podsumowanie dotychczasowych osiągnięć w tej dziedzinie.

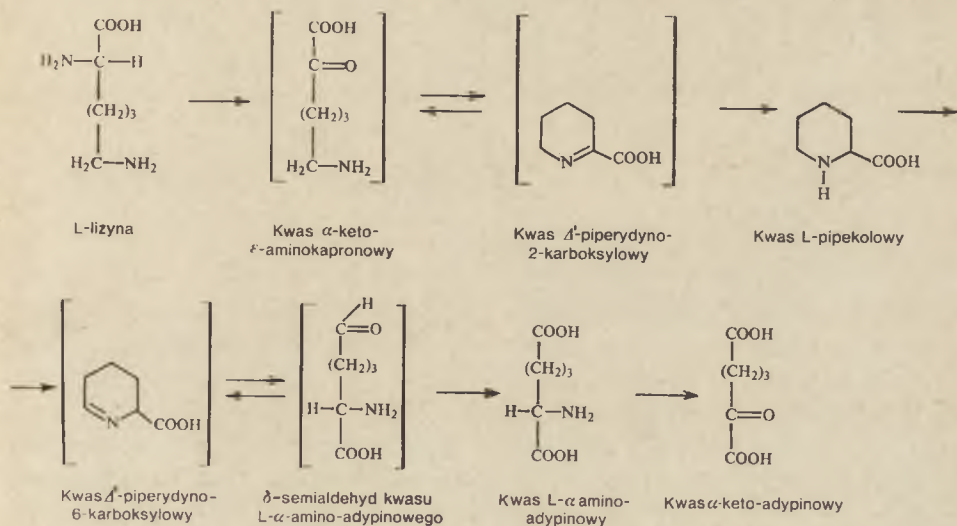
I. Degradacja L-lizyny poprzez stadium kwasu piperkolowego

Wykrycie kwasu piperkolowego (20—24) i wykazanie, że powstaje on z lizyny zarówno u *Neurospora* (25) jak i w organizmach roślin wyższych (26, 27) i ssaków (28—31), przyczyniło się w dużym stopniu do rozszerzenia naszej wiedzy o katabolizmie lizyny.

Punktem zwrotnym w badaniach nad katabolizmem lizyny w tkankach ssaków były doświadczenia, w których podając szczurom dootrzewnowo $6\text{-}^{14}\text{C}$ -L-lizynę stwierdzono w moczu występowanie kwasu ^{14}C -L-piperkolowego (31). Podawanie szczurom $\alpha\text{-}^{15}\text{N}$ lub $\epsilon\text{-}^{15}\text{N}$ -DL-lizyny doprowadziło do ustalenia, że w pierścieniu kwasu piperkolowego występuje ϵ -aminowa grupa lizyny. Wykazano także, że kwas piperkolowy nie powstaje po podaniu szczurom kwasu $6\text{-}^{14}\text{C}$ -DL- α -aminoadypinowego. Pozwoliło to sądzić, że kwas piperkolowy jest pośrednim produktem w przemianie L-lizyny w kwas α -aminoadypinowy oraz wskazywało na nieodwracalność tego przekształcenia. Wyniki tych badań doprowadziły do sformułowania hipotezy, że na szlaku przemiany L-lizyny do kwasu L-piperkolowego znajduje się, podobnie jak u mikroorganizmów, kwas α -keto- ϵ -aminokapro-

nowy (25, 29, 32—34). Dodatkowym poparciem tej hipotezy było stwierdzenie, że u *Neurospora* oksydaza L-aminokwasowa przekształca L-lizynę w kwas Δ' -piperydino-2-karboksylowy (związek będący w roztworze wodnym w równowadze z kwasem α -keto- ϵ -aminokapronowym), z którego w wyniku katalizycznej redukcji i racemizacji powstaje kwas DL-pipekolowy (33, 34). Wykazano również, że syntetyczny kwas Δ' -piperydino-2-karboksylowy ulega stereospecyficznej redukcji do kwasu L-pipekolowego pod wpływem częściowo oczyszczonej oksydoreduktazy wyodrębnionej z wątroby szczura i królika (35, 36).

Dalsza przemiana kwasu pipekolowego w kwas α -aminoadypinowy nie jest jeszcze dokładnie poznana. Stwierdzono, że mitochondria wątroby szczura i wołu utleniają w nieznacznym stopniu kwas DL-pipekolowy do kwasu α -aminoadypinowego (37, 38). Wcześniejsze natomiast badania wykazały, że kwas DL- α -aminoadypinowy przekształca się, podobnie jak L-lizyna, w kwas glutarowy i CO_2 (16, 30). Pośrednim produktem w przemianie



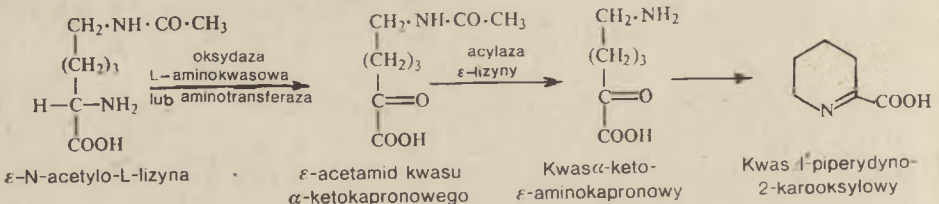
Ryc. 2. Prawdopodobna droga katabolizmu L-lizyny poprzez kwas L-pipekolowy w tkankach ssaków

Dotychczas nie wyizolowane produkty pośrednie ujęto w nawiasy kwadratowe (31).

kwasu pipekolowego w kwas α -aminoadypinowy mógłby być kwas Δ' -piperydino-6-karboksylowy za czym przemawiają badania przeprowadzone na mikroorganizmach (39—43). W badaniach tych wykazano, że u *P. putida* kwas L-pipekolowy pod wpływem dehydrogenazy i FAD ulega przekształceniu do mieszaniny kwasu Δ' -piperydino-6-karboksylowego i δ -semialdehydu kwasu L- α -aminoadypinowego. Związki te przy udziale oksydoreduktazy zależnej od NADP utleniają się do kwasu L- α -aminoadypinowego. Jednakże nie wiadomo dotychczas czy podobny układ enzymatyczny poz-

walający na utlenienie kwasu L-pipekolowego istnieje w tkankach ssaków. Na podstawie podanych obserwacji przypuszczano, że przemiana L-lizyny w kwas α -aminoadypinowy może odbywać się w organizmach ssaków w sposób podany na schemacie (Ryc. 2).

Jakkolwiek przedstawiony schemat jest logiczny i zgodny z danymi doświadczalnymi to dotychczas nie wyodrębniono z tkanek ssaków niektórych produktów pośrednich i enzymów proponowanej drogi degradacji L-lizyny. Ponieważ wiadomo, że grupa α -aminowa z trudem odrywa się od cząsteczki lizyny, najwięcej kontrowersji wzbudza przemiana tego aminokwasu w kwas α -keto- ϵ -aminokapronowy. Oksydaza L-aminokwasowa z jadu węża katalizuje bardzo powoli utlenianie grupy α -aminowej lizyny (32, 44, 45). Zarówno oksydacyjna dezaminacja tej grupy w D i L-lizynie, jak również transaminacja L-lizyny zachodzi o wiele szybciej wówczas, gdy ϵ -aminowa grupa jest zablokowana w cząsteczce (32, 44—46). Dlatego wydaje się, że pierwszy etap degradacji L-lizyny musiałby przebiegać w spo-



Ryc. 3. Przekształcenie ϵ -N-acetylo-L-lizyny w kwas δ' -piperidyno-2-karbooksylo- *in vitro* (54)

sób odmienny od znanego dla innych aminokwasów. Jedną z takich możliwości podczas przemiany L-lizyny w kwas α -keto- ϵ -aminokapronowy mogłoby być wstępne przekształcenie L-lizyny w jej ϵ -N-acylową pochodną. Wiadomo, że szereg ϵ -N-acylowych pochodnych lizyny może być substytutem tego aminokwasu dla ssaków. Zastąpienie L-lizyny w dawce pokarmowej szczura przez ϵ -N-acetylo-L-lizynę (46—50) lub ϵ -(γ -L-glutamilo)-L-lizynę (51) nie hamuje wzrostu szczurów. W doświadczeniach izotopowych wykazano, że lizyna pochodząca z ϵ -(γ -L-glutamilo)-L-lizyny metabolizuje się całkowicie w tkankach szczura, a jej katabolitem jest kwas pipekolowy (52). Występowanie w organizmach ssaków enzymów zdolnych do hydrolitycznego rozszczepienia wiązania ϵ -N-acylowego (53) lub ϵ -N-metylowego L-lizyny (48), skłoniło niektórych badaczy do przyjęcia poglądu, że degradację L-lizyny w tkankach poprzedza jej acetylacja (54), (Ryc. 3).

Według tego poglądu (popartego doświadczeniem modelowym), ϵ -N-acetylo-L-lizyna ulegałaby dezaminacji pod wpływem oksydazy L-aminokwasowej lub aminotransferazy do ϵ -acetamidu kwasu α -ketokapronowego. Ten z kolei podlegałby deacylacji pod wpływem acylazy ϵ -lizyny (54—56) do kwasu α -keto- ϵ -aminokapronowego, który przekształcałby się w kwas

Δ' -piperydino-2-karboksyłowy. Chociaż hipoteza ta wydaje się bardzo interesująca, to jednak należy pamiętać, że dotychczas nie stwierdzono powstawania ϵ -N-acyłowych pochodnych lizyny w organizmie ssaka.

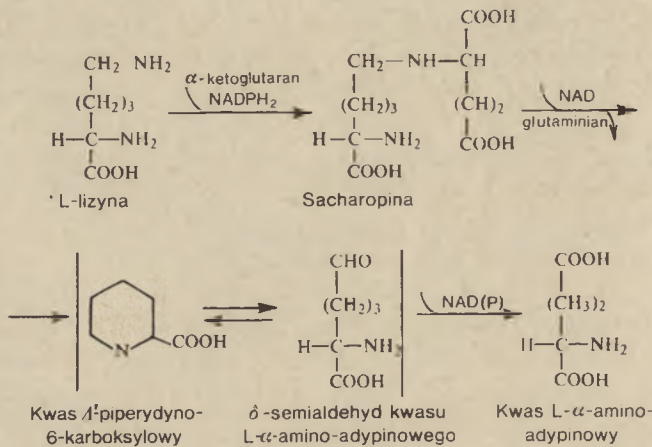
Również w tkankach ssaków nie wykryto dotąd kwasu Δ' -piperydino-2-karboksyłowego i pomimo tego, że wyodrębniona z wątroby szczura i częściowo oczyszczona oksydoreduktaza (35, 36) katalizuje przemianę tego kwasu do kwasu L-pipekolowego, to obecnie enzymu tego nie można odróżnić od 2-oksydoreduktazy L-prolina: NADP (EC 1.5.1.1). Nie wyjaśniono jeszcze całkowicie przekształcenia kwasu L-pipekolowego w kwas L- α -aminoadypinowy i α -ketoadypinowy w tkankach ssaków. Niedawno okazało się również, że obecność ciężkiego azotu wykryta w kwasie α -aminoadypinowym po podaniu szczurom ϵ - ^{15}N -DL-lizyny (31) mogła pochodzić z glutaminianu tj. związku, który powstaje w wyniku rozszczepienia sacharopiny. Spostrzeżenie to wskazywałoby na inną drogę katabolizmu L-lizyny (59), (Ryc. 5). Ponadto trzeba podkreślić fakt, że w badaniach nad metabolizmem tego aminokwasu stosowano często radioaktywną DL-lizynę wychodząc z założenia, iż D-izomer jest metabolicznie nieczynny (57). Okazało się jednak, że D-lizyna ulega przemianom w tkankach ssaków (58, 59), a znakowane produkty jej przekształceń mogły niejednokrotnie zaciemniać obraz przemiany L-formy tego aminokwasu.

Ostatnie lata przyniosły ponadto istotny postęp w badaniach nad katabolizmem L-lizyny w organizmie zwierzęcym (58—62). W doświadczeniach izotopowych wykazano, że po podaniu szczurom D lub L-lizyny znakowanej w pozycji C₆, 96% kwasu L-pipekolowego znalezionego w moczu pochodziło z D-lizyny (58, 59). Wydaje się więc prawdopodobne, że wyniki badań, w których stosowano radioaktywną DL-lizynę, mogły odzwierciedlać metabolizm D-lizyny. Stwierdzono również, wbrew poprzednim badaniom, że kwas L-pipekolowy metabolizuje się bardzo powoli, a zatem nie może odgrywać głównej roli w katabolizmie L-lizyny. Udowodniono to w doświadczeniu z perfundowaną wątrobą i izolowanymi mitochondriami, które okazały się niezdolne do przekształcenia kwasu ^{14}C -L-pipekolowego w warunkach, w których L-lizyna metabolizuje się szybko do CO₂.

II. Degradacja L-lizyny poprzez stadium sacharopiny [ϵ -N-(1-glutarylo-2)-1-lizyna]

Obserwacje poczynione nad metabolizmem kwasu pipekolowego jak również wykazanie, że do kwasu α -aminoadypinowego włącza się grupa α -aminowa, a nie ϵ -aminowa L-lizyny oraz, że L-lizyna i sacharopina dają te same produkty końcowe w wyniku przemiany *in vivo* (60) pozwoliły sądzić, że katabolizm lizyny w tkankach ssaków może zachodzić poprzez stadium sacharopiny tj. na drodze odwrotnej do biosyntezy L-lizyny u drożdży i *Neurospora* (63—68).

Do 1971 roku było niewiele wiadomości na temat sacharopiny jako katabolitu w przemianie L-lizyny. Jakkolwiek stwierdzono, że sacharopina powstaje z L-lizyny *in vitro* (58, 69—72), to jedynie Grove i wsp. (60) wykazali przekształcenie sacharopiny w kwas α -aminoadypinowy i glutarowy *in vivo*. Sacharopinę wykryto co prawda w moczu ludzi cierpiących na zaburzenia w przemianie aminokwasów zasadowych (73), lecz nie udało się jej wykryć w tkankach zdrowych organizmów. Niepowodzeniem skończyły się również próby wykrycia radioaktywności w sacharopinie po podaniu szczurom ^{14}C -L-lizyny (58). Powstała zatem wątpliwość czy sacharopina mogła być rzeczywiście produktem metabolizmu lizyny.



Ryc. 4. Prawdopodobna droga katabolizmu L-lizyny poprzez sacharopinę w tkankach ssaków (74)

Danych o udziale sacharopiny w procesach degradacji L-lizyny w tkankach ssaków dostarczyły dopiero doświadczenia Higashi i wsp. (74), którzy po raz pierwszy wykazali, że sacharopina rzeczywiście występuje w organizmie ssaka. Wyodrębniono ją w małej ilości z wątroby myszy po podaniu zwierzęciu ^{14}C -L-lizyny i wykazano, że jest ona prekursorem kwasu α -aminoadypinowego. W doświadczeniach *in vitro* przy użyciu homogenatów wątroby stwierdzono, że L-lizyna przekształca się w sacharopinę w obecności α -ketoglutaranu i zredukowanego NADP. Degradacja sacharopiny do kwasu α -aminoadypinowego w warunkach *in vitro* wymaga obecności NAD jako kofaktora. Do tej pory nie wyodrębniono produktów pośrednich tego przekształcenia tj. δ -semialdehydu kwasu L- α -aminoadypinowego, ani też produktu jego cyklizacji tzn. kwasu Δ' -piperidyno-6-karboxylogowego. Jednakże inkubacja tego ostatniego związku przy udziale NAD lub NADP prowadzi do utworzenia kwasu α -aminoadypinowego, co wskazuje na udział semialdehydu w tej przemianie. Wyniki tych badań pozwa-

lają wnioskować, że w tkankach ssaków L-lizyna ulega przekształceniu w sacharopinę, ta z kolei w δ -semialdehyd kwasu L- α -aminoadypinowego, który po cyklizacji utlenia się szybko do kwasu L- α -aminoadypinowego (Ryc. 4).

II-1. Enzymy biorące udział w metabolizmie sacharopiny

Synteza i rozpad sacharopiny w tkankach ssaków wymaga obecności szeregu enzymów. Powstawanie sacharopiny z L-lizyny i α -ketoglutaranu odbywa się przy udziale enzymu zwanego reduktazą L-lizyna:2-ketoglutaran, syntetyzującą*. Została ona wyodrębniona z wątroby człowieka i częściowo oczyszczona, a jej optimum pH wynosi 7,0 (71). Nowsze badania (75—77) wykazały również, że w wątrobie ssaków występuje enzym, pod wpływem którego zachodzi rozpad sacharopiny do L-lizyny i α -ketoglutaranu. Enzym ten zwany oksydoreduktazą (oksydoreduktaza sacharopina: NADP, hydrolizująca) jest zależny od NADP i ma optimum działania w pH 9,0. Preparaty tej oksydoreduktazy są aktywowane przez NH_4Cl , który jak wykazano poprzednio, wywiera wpływ hamujący na aktywność enzymu syntetyzującego sacharopinę (70). Obydwa omawiane enzymy odznaczają się różną wrażliwością na temperaturę. Oksydoreduktaza sacharopiny traci swą aktywność po 90 min inkubacji w 30° , a reduktaza jest trwała w tej temperaturze przez okres 4 godz. Aktywność oksydoreduktazy sacharopiny jest najwyższa w tkankach zwierząt trawożernych, a znacznie niższa w tkankach zwierząt mięso i wszystkożernych. W osoczu i moczu ludzi cierpiących na sacharopiniurę występuje nadmierna zawartość lizyny i wydaje się, że jest ona spowodowana represją lub inhibicją reduktazy L-lizyna:2-ketoglutaran przez sacharopinę lub też wzmożoną aktywnością oksydoreduktazy sacharopiny (73, 75—78).

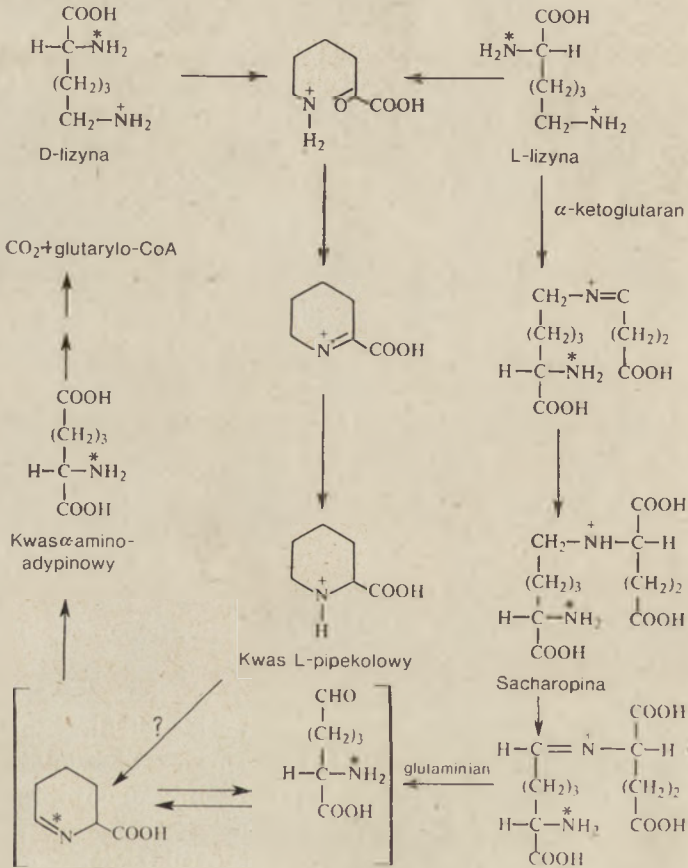
Dehydrogenaza sacharopiny (oksydoreduktaza sacharopina:NAD, hydrolizująca) katalizuje przemianę sacharopiny do δ -semialdehydu kwasu α -aminoadypinowego i glutaminianu. Enzym ten został również wyodrębniony z wątroby człowieka i częściowo oczyszczony. Jego optimum działania przypada na pH ok. 8,8 (72), a aktywność jest znacznie wyższa od aktywności enzymu syntetyzującego sacharopinę. Dlatego każda cząsteczka sacharopiny, powstająca z L-lizyny i α -ketoglutaranu ulega przekształceniu w semialdehyd i glutaminian, nie gromadzi się przeto w tkankach i płynach fizjologicznych zdrowych osobników, co tłumaczy niepowodzenia wielu badaczy w wykrywaniu sacharopiny *in vivo*.

* Wymienione w tym podrozdziale enzymy nie są jeszcze objęte klasyfikacją w „Enzyme Nomenclature”. Recommendation (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. Elsevier Scientific Publishing Company. Copyright 1973.

III. Uwagi końcowe

Na rycinie podano prawdopodobne drogi kataboliczne D i L-lizyny w tkankach ssaków.

Obecny stan wiedzy nie daje jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, którą z proponowanych dróg można uznać za główną w katabolizmie L-lizyny. Drogę poprzez sacharopinę udowodniono w organizmach różnych gatunków zwierząt (60, 69, 72, 74, 79, 80). Wskazują na to doświadczenia,



Ryc. 5. Prawdopodobne kataboliczne drogi D i L-lizyny w tkankach ssaków (59)

w których wykazano wysoką swoistość α -ketoglutaranu względem L-lizyny, powstawanie sacharopiny podczas inkubacji mitochondriów wątroby z α -ketoglutaranem i L-lizyną oraz szybkie przekształcenie sacharopiny w te same produkty, które powstają z L-lizyny. W tkankach badanych ssaków L-lizyna przekształca się tylko w nieznacznym stopniu w kwas L-pipecolowy. Przemianę L-lizyny poprzez kwas L-pipecolowy, typową dla *Neurospora* i *P. putida*, wykazano w tkankach ssaków tylko w nielicznych przy-

padkach (31, 37, 62), a wielu badaczy tej przemiany nie wykryło w organizmach zwierząt (58, 59, 74, 79, 81). Dane te pozwalają przypuszczać, że kwas L-pipekolowy może stanowić „ślepią uliczkę” w przemianie L-lizyny w tkankach ssaków. Kwas ten jest niewątpliwie głównym katabolitem D-lizyny (58, 59). Wydaje się, że kwas L-pipekolowy powstaje w organizmach zwierzęcych tylko w przypadku genetycznie uwarunkowanych wad w katabolizmie L-lizyny (82). Źródłem kwasu L-pipekolowego w ustroju ssaków mogą być również niektóre ϵ -N-acylowe pochodne L-lizyny wprowadzone do organizmu z pożywieniem zawierającym białka uszkodzone termicznie (49, 51—54).

Artykuł otrzymano 3.1.1975, po rewizji autorskiej przyjęto 26.5.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Clark I., Rittenberg D., (1951), *J. Biol. Chem.*, **189**, 521—528.
2. Foster G. L., Schoenheimer R., Rittenberg D., (1939), *J. Biol. Chem.*, **127**, 319—327.
3. Weissman N., Schoenheimer R., (1941), *J. Biol. Chem.*, **140**, 779—795.
4. Hamilton P. B., Anderson R. A., (1955), *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2892—2894.
5. Sinex F. M., Van Slyke D. D., (1955), *J. Biol. Chem.*, **216**, 245—250.
6. Bańkowski E., Gałasiński W., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 481—502.
7. Uitto J., Prockop D. J., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 210—217.
8. Tanphaichitr V., Horne D. W., Broquist H. P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6364—6366.
9. Tanphaichitr V., Broquist H. P., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2176—2181.
10. Cox R. A., Hoppel C. L., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 1075—1082.
11. Cox R. A., Hoppel C. L., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 1083—1090.
12. Cox R. A., Hoppel C. L., (1973), *Biochem. J.*, **142**, 699—701.
13. Fraenkel G., Friedman S., (1957), *Vitam. Horm.*, **15**, 73—118.
14. Pearson D. J., Tubbs P. K., (1967), *Biochem. J.*, **105**, 953—963.
15. Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., Lowy P. H., (1948), *J. Biol. Chem.*, **173**, 423—425.
16. Borsook H., Deasy C. L., Haagen-Smit A. J., Keighley G., Lowy P. H., (1948), *J. Biol. Chem.*, **176**, 1383—1394.
17. Dubnoff J. W., Borsook H., (1948), *J. Biol. Chem.*, **173**, 425—431.
18. Boulanger P., Biserte G., (1951), *Compt. Rend.*, **232**, 1451—1453.
19. Cavallini D., Mondovi B., (1952), *Arch. Sci. Biol. (Bologna)*, **36**, 468—475.
20. Zacharius R. M., Thompson J. F., Steward F. C., (1952), *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2949.
21. Zacharius R. M., Thompson J. F., Steward F. C., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2908—2912.
22. Hulme A. C., Arthington W., (1952), *Nature*, **170**, 659—660.
23. Grobbelaar N., Zacharius R. M., Steward F. C., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 2912—2914.
24. Morrison R. J., (1953), *Biochem. J.*, **53**, 474—478.
25. Schweet R. S., Holden J. T., Lowy P. H., (1954), *Fed. Proc.*, **13**, 293—294.
26. Lowy P. H., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **47**, 228—229.
27. Grobbelaar N., Steward F. C., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4341—4343.

28. Rothstein M., Miller L. L., (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4371—4372.
29. Rothstein M., Miller L. L., (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1459.
30. Rothstein M., Miller L. L., (1954), *J. Biol. Chem.*, **206**, 243—253.
31. Rothstein M., Miller L. L., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 851—858.
32. Meister A., (1954), *J. Biol. Chem.*, **206**, 577—586.
33. Schweet R. S., Holden J. T., Lowy P. H., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 517—525.
34. Schweet R. S., Holden J. T., Lowy P. H., Symp. Amino Acid Metab., Baltimore, 1954, Johns Hopkins Univ., Mc Collum-Pratt, Inst. Contrib., (1955), 105, 496.
35. Meister A., Buckley S. D., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 202—208.
36. Meister A., Radhakrishnan A. N., Buckley S. D., (1957), *J. Biol. Chem.*, **229**, 789—796.
37. Rothstein M., Greenberg D. M., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 714—718.
38. Rothstein M., Cooksey K. E., Greenberg D. M., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2828—2830.
39. Rao D. R., Rodwell V. W., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2232—2238.
40. Basso L. V., Rao D. R., Rodwell V. W., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2239—2245.
41. Cacvert A. F., Rodwell V. W., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 409—414.
42. Baginsky M. L., Rodwell V. W., (1966), *J. Bacteriol.*, **92**, 425—432.
43. Baginsky M. L., Rodwell V. W., (1967), *J. Bacteriol.*, **94**, 1034—1039.
44. Meister A., (1952), *J. Biol. Chem.*, **195**, 813—826.
45. Meister A., (1954), *J. Biol. Chem.*, **206**, 587—596.
46. Neuberger A., Sanger F., (1944), *Biochem. J.*, **38**, 119—125.
47. Neuberger A., Sanger F., (1943), *Biochem. J.*, **37**, 515—518.
48. Neuberger A., Sanger F., (1944), *Biochem. J.*, **38**, 125—129.
49. Bjarnason J., Carpenter K. J., (1969), *Br. J. Nutr.*, **23**, 859—868.
50. Mauron J., (1970), *Int. J. Vitamin.*, **40**, 209—225.
51. Waibel P. E., Carpenter K. J., (1972), *Br. J. Nutr.*, **27**, 509—515.
52. Raczyński G., Snochowski M., Buraczewski S., (1975), *Br. J. Nutr.*, **34**, 291—296.
53. Paik W. K., Bloch-Frankenthal L., Birnbaum S. M., Winitz M., Greenstein J. P., (1957), *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 56—66.
54. Paik W. K., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 518—520.
55. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T., (1962), *Nature*, **195**, 80—81.
56. Kim S., Benoiton L., Paik W. K., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3790—3796.
57. Rothstein M., Bly C. G., Miller L. L., (1954), *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 252—256.
58. Grove J. A., Henderson L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 113—120.
59. Grove J. A., Gilbertson T. J., Hammerstedt R. H., Henderson L. M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 329—337.
60. Grove J. A., Linn T. G., Willett C. J., Henderson L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 191—194.
61. Grove J. A., Roghair H. G., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **144**, 230—236.
62. Grove J. A., Young F., Roghair H. G., Schipke P., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 464—467.
63. Kuo M. H., Saunders P. P., Broquist H. P., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 508—515.
64. Jones E. E., Broquist H. P., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2531—2536.
65. Jones E. E., Broquist H. P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3430—3434.
66. Trupin J. S., Broquist H. P., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2524—2530.

67. Saunders P. P., Broquist H. P., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 3435—3440.
68. Fujioka M., Nakatani Y., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **16**, 180—185.
69. Higashino K., Tsukada K., Liberman I., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 285—290.
70. Higashino K., Fujioka M., Aoki T., Yamamura Y., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 95—96.
71. Hutzler J., Dancis J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **158**, 62—69.
72. Hutzler J., Dancis J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 205—214.
73. Carson N. A. J., Scally B. G., Neil D. W., Carre I. J., (1968), *Nature*, **218**, 679.
74. Higashino K., Fujioka M., Yamamura Y., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 606—614.
75. Wang F. C. I., Lewis M. H. R., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 74—75 P.
76. Fellows F. C. I., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 321—327.
77. Fellows F. C. I., Lewis M. H. R., (1973), **136**, 329—334.
78. Simell O., Visakorpi J. K., Donner M., (1972), *Arch. Dis. Childhood*, **47**, 52—55.
79. Boulanger P., Osteux R., Saquet E., Cherlier H., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **184**, 338—344.
80. Ghadimi H., Chou W. S., (1971), *Biochem. Med.*, **5**, 56—61.
81. Boulanger P., Osteux R., (1960), *Z. Physiol. Chem.*, **321**, 79—88.
82. Woody N. C., Pupene M. B., (1970), *Pediat. Res.*, **4**, 89—95.

STEFAN POZNAŃSKI *), JADWIGA KOWALEWSKA **),
WŁODZIMIERZ BEDNARSKI ***), ARNOLD REPS ****)

β -galaktozydaza, otrzymywanie, właściwości i zastosowanie w technologii żywności

Obtaining, Properties, and Application of β -galactosidase in Food Technology

Ostatnio pojawia się coraz więcej doniesień o występowaniu zaburzeń żołądkowych u niemowląt karmionych mlekiem kobiecym lub krowim. U dzieci najczęściej pojawiają się przewlekłe lub powtarzające się biegunki (1, 2, 3, 4). Nietolerancja laktozy występuje (5) wśród ludności pochodzenia europejskiego znacznie rzadziej (do 10⁰/o) w porównaniu z na przykład ludnością Afryki i Azji (około 60⁰/o).

Badania wykazały, że jedną z poważnych przyczyn wspomnianych zaburzeń żołądkowych jest upośledzenie organizmu polegające na nieprzyswajaniu cukru występującego w mleku — laktozy. Nietolerancja laktozy bardzo często niewłaściwie określana jako nietolerancja mleka (5), wywołana jest obniżoną aktywnością β -galaktozydazy jelitowej, lub w ogóle jej brakiem (6). Nietolerancję w stosunku do laktozy można wyeliminować przez wyłączenie z diety żywieniowej cukru mlekowego. Wyeliminowanie z diety laktozy możliwe jest w przypadku osób dorosłych, które bez wyraźnej szkody dla organizmu, mogą odżywiać się produktami nie zawierającymi laktozy. Znacznie trudniej zastosować dietę z wyłączeniem mleka (laktozy) w przypadku odżywiania niemowląt i dzieci (1).

Występująca w laktozie galaktoza jest między innymi źródłem syntezy galaktozydów mózgu i tkanek nerwowych młodych ssaków oraz bierze udział w biosyntezie polisacharydów (7).

W naszym kraju spotyka się również wśród niemowląt liczne przypadki nietolerancji dla laktozy (1, 3).

Rozpowszechnianie spożycia mleka, a tym samym wartościowego i taniego białka zwierzęcego wśród ludności krajów tropikalnych napotyka

*) Prof. dr hab., **) dr inż., ***) dr inż., ****) dr inż.

Instytut Inżynierii i Biotechnologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, 10-957 Olsztyn.

Wykaz stosowanych skrótów: β -galaktozydaza — galakto-hydrolaza β -D-galaktozydów; DEAE celuloza — dwuetyloaminoetylo celuloza.

na poważne trudności, z uwagi na częste przypadki nietolerancji laktozy, tak u dzieci jak i u ludzi dorosłych tych krajów (5).

Z przedstawionych powyżej względów pożądanym byłoby otrzymanie mleka i koncentratów mlecznych z rozłożoną laktozą do glukozy i galaktozy.

I. Charakterystyka otrzymywania β -galaktozydazy

β -galaktozydaza jest enzymem wewnątrzkomórkowym o ciężarze molekularnym od 500 000 do 700 000 (8, 9) w zależności od pochodzenia. Obecność β -galaktozydazy stwierdzono w komórkach pleśni, między innymi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Neurospora crassa*; w komórkach drożdży jak: *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces fragilis*, *Kluyvermyces lactis* (10, 11) oraz w komórkach różnych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Shigella* (2, 11). W badaniach dotyczących otrzymywania β -galaktozydazy stwierdzono (10), że pleśnie charakteryzują się najwyższą wydajnością komórek, przy czym β -galaktozydaza pleśniowa wykazywała najniższą aktywność, natomiast bakterie syntetyzowały β -galaktozydazę o wysokiej aktywności, jednakże wydajność komórek była najniższa.

Tabela 1

Właściwości β -galaktozydazy pochodzenia mikrobiologicznego
(10, 11, 25, 19, 4, 43, 12)

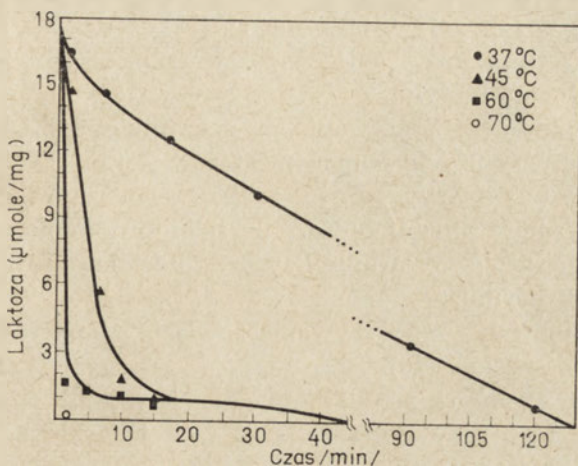
Źródło enzymu	Optimum temperatury	Optimum pH	Stosunek aktywności na jednostkę masy j/mg
bakterie	55°C	6,5—7,5	9,0
drożdże	37°C	6,0—7,0	0,06
pleśnie	63°C	4,0—4,5	0,3

β -galaktozydaza pochodzenia mikrobiologicznego w zależności od rodzaju drobnoustrojów stosowanych do jej biosyntezy różni się własnościami (4, 12) takimi, jak optimum pH, temperatury, aktywnością (tabela 1) oraz stabilnością (Rys. 1 i 2).

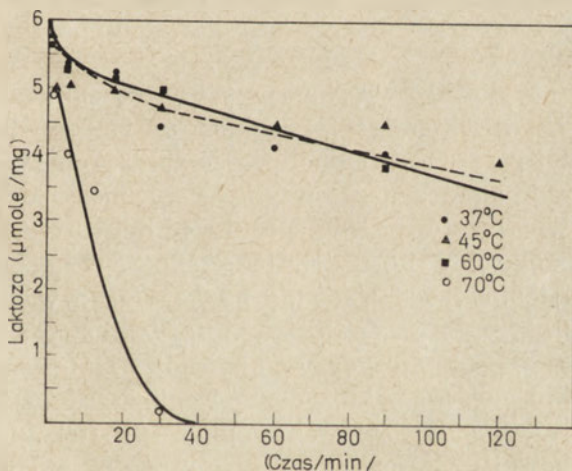
Ponadto β -galaktozydaza występuje w tkankach niektórych roślin, między innymi w migdałach, pączkach dzikiej róży, kawie, ziarnach soi i lucerny. Występuje również w tkankach przewodu pokarmowego zwierząt np.: psów, królików, owiec, cieląt (2).

W organizmie człowieka β -galaktozydaza jest wytwarzana przez kosmki jelita cienkiego, przy czym najbardziej aktywna jest w jelicie nie-

mowlą, natomiast w jelicie ludzi dorosłych ilość i aktywność tego enzymu maleje (2, 5). Ponadto stwierdzono (17), że niedobór białka w diecie obniża aktywność β -galaktozydazy jelitowej bardziej niż dwusacharydy. W ten sposób w przypadku niedożywiania dzieci, które normalnie wykazują wy-



Rys. 1. Stabilność termiczna β -galaktozydazy otrzymanej z drożdży *Kluyveromyces fragilis* (12).



Rys. 2. Stabilność termiczna β -galaktozydazy otrzymanej z pleśni *Mucor pusillus* (12).

soką aktywność β -galaktozydazy jelitowej następuje całkowita jej inaktywacja. Z kolei upośledzenie w przyswajaniu laktozy powoduje niedobór wapnia (wyeliminowanie mleka z diety), który przecież pobiera człowiek głównie (80%) w mleku i produktach mlecznych.

W procesie otrzymywania enzymów wewnątrzkomórkowych, do których należy β -galaktozydaza, ważny jest sposób zniszczenia struktury ko-

mórkowej, niezbędny dla wydajnej ekstrakcji białek enzymatycznych z komórek. Obecnie stosowane metody dezintegracji struktury komórkowej i otrzymywania preparatów enzymatycznych można usystematyzować następująco:

- metody autolityczne — autoliza zawiesin komórek pod warstwą toluenu lub maceracja w roztworach buforowych (13),
- metody chemiczne — maceracja w roztworach takich związków jak gliceryna lub octan metylu,
- metody mechaniczne — prasowanie przy użyciu wysokich ciśnień lub homogenizacja przy użyciu homogenizatorów Potter-Elvehjem (14),
- metody termiczne — nazywane też szokiem termicznym, polegające na kilkakrotnym zamrażaniu i odmrażaniu zawiesiny komórek (15),
- metody biologiczne — stosowanie lizy przy udziale określonych bakteriofagów lub lizozymu,
- metody kombinowane np. rozrywanie zawiesiny komórek przy zastosowaniu ultradźwięków (16).

Żadna z przedstawionych metod nie nadaje się w pełni do zastosowania w praktyce bądź to z przyczyn rozwiązań technicznych, bądź wysokich kosztów. Dlatego potrzebne są dalsze badania nad udoskonaleniem, względnie opracowaniem nowych efektywnych metod dezintegracji komórek i otrzymywaniem wysokoaktywnych preparatów β -galaktozydazy o zadawalającym stopniu czystości. Do oczyszczania β -galaktozydazy izolowanej z materiału biologicznego stosuje się konwencjonalne techniki, których tutaj nie trzeba opisywać.

β -galaktozydaza wykazuje wysoką specyficzność substratową w stosunku do cząsteczki β -galaktozy (18). Z jednakową intensywnością hydroлізуje substrat laktozę oraz O-nitrofenol- β -D-galaktopyranozyd/ONPG (11).

Stwierdzono, że β -galaktozydaza otrzymana z komórek drożdży wykazała zbliżoną aktywność zarówno gdy substratem był roztwór czystej laktozy jak i w przypadku gdy substratem była laktoza w mleku. β -galaktozydaza z *E. coli* natomiast dodawana do mleka wykazywała tylko 27% swej aktywności oznaczanej w roztworze czystej laktozy (11). Dlatego też najczęściej jako źródło β -galaktozydazy do hydrolizy laktozy w mleku stosuje się enzym z drożdży. β -galaktozydaza pleśniowa ze względu na wysoką stabilność termiczną (Rys. 2) oraz optimum pH (tabela 1), znajduje zastosowanie do hydrolizy laktozy w serwatce ukwaszonej (19, 20).

β -galaktozydaza z bakterii, drożdży i pleśni podlega aktywacji przez jony Na^+ , K^+ i Mg^{++} (2, 28, 21, 22). Związki zawierające grupy tiolowe aktywują również ten enzym (2). Natomiast działanie inhibujące wywierają jony Ag^{++} , Hg^{++} (2), Cu^{++} , Fe^{+++} (22), jak dotąd nie ma zgodności czy jony Mn^{++} aktywują β -galaktozydazę (21, 23), czy też ją inaktywują (22).

Cukry takie jak D-glukoza i D-galaktoza oraz sacharoza mogą działać hamująco na aktywność β -galaktozydazy (18, 24, 25). Nagromadzanie się

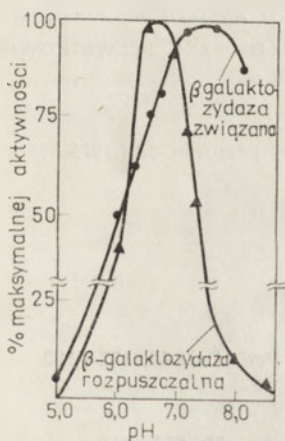
produktów rozkładu laktozy w mieszaninie inkubacyjnej zwalnia hydroлизę, co utrudnia całkowity rozkład tego cukru w toku procesu technologicznego podczas otrzymywania mlecznych produktów bezlaktozowych.

II. Zastosowanie β -galaktozydazy

Usunięcie laktozy z mleka np. w drodze fermentacji mlekowej pozwala na produkcję napojów mlecznych, które można z powodzeniem podawać osobom dorosłym i dzieciom z nietolerancją laktozy (26).

Innym sposobem usuwania laktozy może być dializa. Mleko poddane dializie traci jednakże około 1/3 początkowej wartości kalorycznej oraz wiele składników mineralnych niezbędnych dla młodego organizmu (17). Pełnowartościowe, bezlaktozowe, słodkie mleko otrzymuje się poprzez dodanie do mleka rozpuszczalnej β -galaktozydazy, którą po rozłożeniu laktozy inaktywuje się termicznie. Dodatek enzymu bezpośrednio do mleka jest jednak zabiegiem nieekonomicznym i wywołuje w gotowanym produkcie lekki posmak obcy (27).

Od kilku lat prowadzi się przeto intensywne badania dla opracowania nowych technologii rozkładu laktozy w mleku na skalę przemysłową. Obiecujące okazało się zastosowanie techniki wiązania enzymu z nośnikami



Rys. 3. Porównanie optimum pH β -galaktozydazy rozpuszczalnej i związanej (37).

stałymi. Nośnik ten powinien być substancją trwałą aby nie ulegał zniszczeniu podczas stosowania, obojętną chemicznie oraz przepuszczalną dla substratów i produktów reakcji enzymatycznej (28). Jako nośniki najczęściej stosuje się celulozę (11, 29, 30, 31), kollagen (19, 32), żełe poliakryloamidowe (17, 33), odpowiednio preparowane porowate kuleczki szklane (24, 34, 35) oraz żywice fenolo-formaldehydowe (36).

Porównanie własności β -galaktozydazy związanej z nośnikiem z odpowiednią próbą enzymu w postaci nie związanej, pozwoliło wykazać róż-

nice w zakresie optimum pH (Rys. 3), hydrolizy laktozy, stałej Michaelisa-Menten oraz energii aktywacji. Związana z nośnikiem β -galaktozydaza z *E. coli* wykazuje optimum działania przy pH 7,3 podczas gdy optimum pH wolnego enzymu występuje przy 6,5 (37). Stwierdzono też, że wartość K_m enzymu związanego jest niemal dwukrotnie wyższa w porównaniu z enzymem wolnym (21,0 i 13,1mM, odpowiednio). Zastosowanie preparatu związanej β -galaktozydazy umożliwi wielokrotne (osiemdziesięciokrotne) użycie enzymu w technologii hydrolizy laktozy nawet przez około 100 dni (37), wykazując w tym czasie jeszcze 65,6% początkowej aktywności.

Śledząc trwałość związanej β -galaktozydazy przechowywanej w temp. 4°C przez blisko 100 dni stwierdzono wzrost jej aktywności w porównaniu z preparatem niezwiązanej β -galaktozydazy przechowywanej w tych samych warunkach.

Stosując enzym związany można więc taniej i szybciej rozpowszechnić produkcję mleka z rozłożoną laktozą. β -galaktozydazę stosuje się również w technologii spożywczej, np. do częściowego rozkładu laktozy przy produkcji mleka zagęszczonego aby zapobiegać krystalizacji cukru w gotowym produkcie (38, 39), w intensyfikacji fermentacji laktozy przy otrzymywaniu kwasu mlekowego z serwatki (40), w intensyfikacji hodowli biomasy bakterii fermentacji mlekowej (41), w produkcji artykułów spożywczych takich, jak lody, napoje z mleka i serwatki, czy produkty kandyzowane (42), a także przy otrzymywaniu syropu serwatkowego do celów piwowskich oraz przy otrzymywaniu proszku serwatkowego dla celów piekarniczych (44).

Artykuł otrzymano 3.9.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 12.4.1975.

PIŚMIENNICTWO

1. Kurowska-Taylor A., Białoń T. (1970) *Ped. Pol.* **45**, 177—182.
2. Pomeranz Y. (1964) *Food Techn.* **18**, 682—689.
3. Zalewski I. (1968) *Ped. Pol.* **43**, 1039—1045.
4. Olson N. F., Richardson T. (1974) *J. Food Sci.* **39**, 653—659.
5. Vinodini Reddy (1973) *Neth. Milk Dairy J.* **27**, 355—367.
6. Karłowicz K., Kordysz E., Ratajczyk-Majewska C. (1969) *Ped. Pol.* **44**, 443—447.
7. Pijanowski E. (1971) *Zarys chemii i technologii mleczarstwa*, t. I, PWRiL, Warszawa.
8. Oberman H. (1970) *Post. Mikrob.* **9**, 447—454.
9. Wierzbicki L. E., Edwards V. H., Kosikowski F. V. (1974) *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 397—411.
10. Wierzbicki L. E., Kosikowski F. V. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 26—32.
11. Moris F., Pastore M., Viglia A. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 1123—1127.

12. Serensen S. G., Crisan E. V. (1974) *J. Food Sci.*, **39**, 1184—1187.
13. Hugo W. B. (1954) *Bact. Rev.*, **18**, 87—105.
14. Bernlohr R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 538—543.
15. Ron E. Z., Kohlers R. F., Davis B. D. (1966) *Science*, **153**, 1119—1120.
16. Shirhaung T., Solberg P. (1966) *XVII Int. Dairy Cong.*, **E**, 116—117.
17. Danlquist A., Mattiasson B., Mosbach K. (1973) *Biotechn. Bioeng.*, **15**, 395—402.
18. Dłużewski M. (1969) *Roczn. Techn. Chemii Żywn.*, **16**, 21—23.
19. Giacin J. R., Jakubowski J., Leeder J. G., Gilbert S. G., Kleyn D. H. (1974) *J. Food Sci.*, **39**, 751—754.
20. Wierzbicki L. E., Edwards V. H., Kosikowski F. V. (1974) *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 397—411.
21. Hill J. A., Huber R. E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 530—537.
22. Blankenship L. C., Wells P. A. (1974) *J. Milk Food Technol.*, **37**, 199—202.
23. Hustad G. O., Richardson T., Olson N. F. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 1111—1117.
24. Woychik J. H., Vondolowski M. V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 347—351.
25. Rand A. G., Linklater P. M. (1973) *Austr. J. Dairy Techn.*, **28**, 63—67.
26. Gallagher Ch. R., Molleson A. L., Caldwell J. H. (1974) *J. Amer. Diet. Assoc.*, **65**, 418—419.
27. Woychik J. H., Vondolowski M. V. (1973) *J. Milk Food Technol.*, **36**, 31—33.
28. Braune G., Thomas D., Gellf G., Domurado D., Berjonneau A. M., Guillon C. (1973) *Biotechn. Bioeng.*, **15**, 359—367.
29. Kay G., Lilly M. P., Sharp A. K., Wilson P. G. N. (1968) *Nature*, **217**, 641—647.
30. Sharp A. K., Kay G., Lilly M. D. (1969) *Biotechn. Bioeng.*, **XI**, 363—374.
31. Stasiw R. O., Patel A. B., Brown H. D. (1972) *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 629—641.
32. Coulet P. R., Julliard J. H., Gautheron D. C. (1974) *Biotechn. Bioeng.*, **16**, 1055—1068.
33. Mattiasson B., Mosbach K. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 253—257.
34. Robinson P. J., Dunnill P., Lilly M. D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 659—661.
35. Wierzbicki L. E., Kosikowski F. V., Edwards V. H. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 627.
36. Olson A. C., Stanley W. L. (1973) *J. Agric. Food Chem.*, **21**, 440—445.
37. Hustad G. O., Richardson T., Olson N. F. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 1118—1122.
38. Kiszka J., Switka J., Kruk A., Surazyński A. (1973) *Le Lait*, **53**, 430—439.
39. Dłużewski M., Dąbrowski J., Brzeski S. (1973), Lasota M. *Zesz. nauk. AR w W-wie, Techn. Roln.-Spoż.*, **8**, 131—145.
40. Surazyński A., Chojnowski W., Poznański S., Joniec C. (1975) *Zesz. nauk. ART Olszt.*, **31**, (4), 87—98.
41. Kornacki K., Rymaszewski J., Prośniewska G. (1974) *Roczn. Technol. Chemii Żywn.*, **14**, 97—110.
42. Wendorff W. L., Amundson C. H., Olson N. F. (1971) *J. Milk Food Technol.*, **34**, 294—299.
43. Wierzbicki L. E., Kosikowski F. V. (1973) *J. Dairy Sci.*, **56**, 1182—1184.
44. Dłużewski M., Matuszewski J., Waczkowski W. (1974) *Zesz. nauk. AR w W-wie, Techn. Roln.-Spoż.*, **9**, 79—89.

SPRAWOZDANIA

I Środowiskowa Konferencja Naukowa Chemików Piła, 20—22 marzec 1975

I Środowiskowa Konferencja Naukowa Chemików została zorganizowana przez Komisję Nauk Chemicznych Oddziału PAN w Poznaniu. Na miejsce obrad wybrano Piłę, miasto wielkopolski, w którym przewidywany jest intensywny rozwój przemysłu chemicznego. Konferencja wywołała duże zainteresowanie w środowiskach chemicznych Poznania i Szczecina. Wzięło w niej udział 443 uczestników, wygłoszono 261 komunikatów z prac naukowych, realizowanych głównie w placówkach poznańskich. Przewodniczącym Komitetu Organizacyjnego był prof. dr K. Golankiewicz, sekretarzem naukowym doc. dr Z. Dudzik.

Wykłady plenarne podczas sesji otwarcia wygłosili:

mgr Henryk Konopacki, I Z-ca Ministra Przemysłu Chemicznego — „Rozwój przemysłu chemicznego w Polsce do roku 1980 ze szczególnym uwzględnieniem inwestycji w województwie poznańskim”; prof. dr Adam Bielański — „Tlenki metali grup przejściowych, ich właściwości fizykochemiczne”; prof. dr Maciej Wiewiórowski — „Kataliza wewnątrzcząsteczkowa i wielofunkcyjna — ostatnie osiągnięcia i przykłady zastosowań”; prof. dr Jerzy Wróbel — „Syntezy w dziedzinie niektórych alkaloidów piperydynowych i chinolizydynowych”; prof. dr Jerzy Pawełekiewicz — „Inżynieria genetyczna”.

Obrady toczyły się w czterech głównych sekcjach:

1. Chemia i fizykochemia organiczna
2. Chemia i fizykochemia nieorganiczna
3. Chemia i fizykochemia stosowana wraz z inżynierią chemiczną
4. Biochemia i chemia produktów naturalnych

W ramach Zjazdu odbyło się również kolokwium poświęcone zjawisku agregacji cząsteczek i jego konsekwencjom fizykochemicznym, biochemicznym oraz możliwościom wykorzystania przemysłowego.

Sekcja biochemii i chemii produktów naturalnych:

Obrady sekcji biochemii i chemii produktów naturalnych odbywały się przy współudziale członków Komisji d/s Biologii Molekularnej Oddziału PAN w Poznaniu.

Komunikaty naukowe z zakresu biochemii nadesłane na konferencję można było rozdzielić na cztery tematyczne działy, mianowicie:

1. Biosynteza białka w tkankach roślinnych
2. Metabolizm komórek i tkanek
3. Synteza i badanie właściwości nukleotydów
4. Biochemia analityczna

W analogicznych podsekcjach odbywały się obrady. Działy te w generalnym ujęciu reprezentują główne kierunki badawcze z zakresu biochemii, realizowane od szeregu lat w ośrodku poznańskim.

1. Biosynteza białka w tkankach roślinnych.

Na obradach podsekcji przedstawiono 17 prac, pochodzących głównie z kierowanego przez prof. dr J. Pawełekiewicza Międzyuczelnianego Instytutu Biochemii w Poz-

naniu. Większość prac dotyczyła transferowych kwasów rybonukleinowych i enzymów uczestniczących w biosyntezie białka.

Układami modelowymi dla tych badań były rośliny motylkowe i zboża. Autorzy przedstawili nowe, oryginalne metody izolacji niektórych składników syntezy białek oraz podali szereg interesujących szczegółów z zakresu badań struktury roślinnych t-RNA.

Wyniki tych pracochłonnych badań, referowane na obradach w sposób bardzo skrótowy i zwięzły, posiadają bardzo istotne znaczenie dla rozwoju nauk biochemicznych. Osiągnięcia zespołu prof. dr J. Pawełkiewicza wzbudzają duże zainteresowanie w ośrodkach krajowych i zagranicznych zarówno z uwagi na wciąż bardzo aktualną w biochemii problematykę biosyntezy białka, jak i nowe koncepcje analityczne, realizowane przez zespół poznański w odniesieniu do układów świata roślinnego.

Wprowadzeniem do obrad sekcji biochemii był świetnie opracowany referat prof. dr J. Pawełkiewicza, przedstawiony na sesji plenarnej. W referacie nakreślił autor ostatnie osiągnięcia inżynierii genetycznej, odkrywające już w obecnej chwili realne możliwości ingerowania w strukturę genu i wpływu na wykształcanie się cech dziedzicznych. Wyniki tych badań stawiają uczonych znowu przed poważnym dylematem odpowiedzialności za cele dla jakich osiągnięcia te zostaną wykorzystane — podobnie jak w swoim czasie fizyków jądrowych.

2. Metabolizm komórek i tkanek.

Większość przedstawionych prac dotyczyła aktualnych zagadnień metabolizmu komórek krwi. Problem ten wiąże się ściśle z medycyną praktyczną, a kultywowanie tego kierunku badawczego w Akademii Medycznej w Poznaniu posiada już dłuższe tradycje.

Dwie referowane prace pochodziły z Zakładu Dydaktycznego Biochemii A.M. w Poznaniu, kierowanego przez prof. dr Halinę Karoń. Autorzy omówili zaburzenia metaboliczne, stwierdzone w krwince czerwonej szczurów z przeszczepionym nowotworem doświadczalnym Morrisa. Badania autorów wykazały, że obecność doświadczalnego nowotworu wątroby oddziaływanie w dostrzegalny i charakterystyczny sposób na metabolizm erytrocytów krwi obwodowej. Wyniki te są godne podkreślenia, gdyż z dotychczasowych prac wiadomo, że zmiany w układach oksydacyjno-redukcyjnych dojrzałych erytrocytów pojawiają się w warunkach patologicznych stosunkowo najwolniej, w porównaniu ze zmianami w innych komórkach ustroju. W przypadkach przeszczepialnego wątrobiaka Morrisa krwinka czerwona okazała się komórką, której metabolizm reaguje już wcześniej dostrzegalnymi odchyleniami.

Dalsze referowane prace o pokrewnej tematyce zrealizowane zostały w Zakładzie Biochemii Instytutu Chemii i Analityki A.M. w Poznaniu, kierowanego przez prof. dr J. Chmiela. Dotyczyły one badań mechanizmu radioochronnego oddziaływania cysteaminy w metabolizmie komórek krwi oraz nowych układów enzymatycznych i metabolitów stwierdzonych w erytrocytach i płytkach krwi. Wobec intensywnego rozwoju badań jądrowych i coraz szerszego stosowania radioizotopów w różnych dziedzinach gospodarki, w badaniach naukowych i lecznictwie, poszukiwanie skutecznych związków radioochronnych, które podane człowiekowi lub zwierzęciu krótko przed napromieniowaniem obniżają efekt napromienienia, posiada bardzo istotne znaczenie. Badania zespołu Zakładu Biochemii A.M. wykazały, że komórki krwi stanowią dogodny model do badania mechanizmu radioochrony.

W ścisłym powiązaniu z problematyką medyczną były również dwie dalsze prace — jedna o charakterze metodycznym, przedstawiająca interesującą koncepcję analityczną oznaczania składu glikozaminoglikanów dla celów diagnostycznych w wyćinkach chrząstki pobieranych przy zabiegach chirurgicznych, druga — omawiająca udział esterazy cholesterolowej w regulacji syntezy hormonów sterydowych w korze nadnerczy. Z Zakładu Mikrobiologii i Biochemii Instytutu Towaroznawstwa Akademii Ekonomicznej w Poznaniu przedstawiono dwie prace, z których jedna wzbudziła

dziła szeroką dyskusję nad możliwością wykorzystania otrzymanego nierozpuszczalnego preparatu oksydazy glukozy dla konstrukcji enzymatycznego czujnika, dostosowanego do ciągłego pomiaru poziomu glukozy krwi.

3. Synteza i badanie właściwości nukleotydów.

Zespoły badawcze prof. dr M. Wiewiórowskiego i prof. dr K. Golankiewicza rozwinęły szereg interesujących metod syntezy oligonukleotydów i pochodnych nukleotydów oraz opracowały nowe sposoby badań struktury tych związków. W pracach wykorzystuje się nowoczesne techniki badawcze jak wysokociśnieniową chromatografię cieczową, chromatografię suchą- i krótkokolumnową, wysokorozdzielczy magnetyczny rezonans jądrowy itp. Osiągnięcia z zakresu syntezy i badań struktury nukleotydów w pracowniach Instytutu Chemii UAM w Poznaniu oraz Instytutu Chemii Organicznej PAN w Poznaniu, stanowią stosunkowo niedawny dorobek ośrodka poznańskiego. Wskazują one, że autorzy dobrze już zorganizowali i opanowali trudny warsztat syntezy nukleotydów i przez to stali się bardzo przydatnymi partnerami w badaniach metabolicznych. Konfrontacja referowanych na Konferencji prac przemawia za dużymi przyszłościowymi możliwościami współdziałania i współpracy głównych grup biochemicznych w środowisku poznańskim w rozwiązywaniu wiodących problemów biologii molekularnej.

4. Biochemia analityczna.

Na obradach zaprezentowano głównie prace analityczne z zakresu ilościowego oznaczania niektórych witamin w materiale biologicznym, jak: tiaminy, witaminy B₁₂, kwasu L-askorbinowego oraz produktów jego rozpadu, jak również przedstawiono studia nad trwałością amidu kwasu nikotynowego oraz D, L-alfa-tokoferolu. Problematyka ta, realizowana od dłuższego czasu w Zakładzie Chemii Ogólnej Instytutu Chemii i Analityki A.M. w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr S. Bączyka, posiada wyraźny aspekt praktyczny. Opracowane metody znajdują zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym oraz w laboratoriach diagnostycznych Służby Zdrowia. Zaznaczyć należy, że w metodach tych wykorzystać można aparaturę dostępną w średnio wyposażonych pracowniach chemicznych. Z Instytutu Matematyki, Fizyki i Chemii oraz z Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego Akademii Rolniczej w Poznaniu przedstawiono interesujące doniesienie dotyczące spektroskopowych właściwości ochratoksyn.

Ogółem na obradach Sekcji Biochemii i Chemii Produktów Naturalnych wygłoszono 44 komunikatów, z czego w poszczególnych czterech podsekcjach 17, 10, 10 i 7. Obrady cechowały się dużą frekwencją i zainteresowaniem i poinformowały poznańskich biochemików o wzajemnych osiągnięciach i realizowanych kierunkach badawczych.

J. Chmiel

V Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów San Francisco (USA) 31 marzec — 3 kwiecień, 1972 r.

W dniach 31.III.—3.IV. odbyło się w San Francisco (USA) V Międzynarodowe Sympozjum na temat flawin i flawoproteidów, zorganizowane przez prof. dr T. P. Singera z Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco i finansowane przez IUB, NIH, NSF i kilka przedsiębiorstw przemysłowych oraz Uniwersytet — organizatora sympozjum.

W obradach wzięło udział 120 osób, w przeważającej większości ze Stanów Zjednoczonych, kilkunastu uczestników z Japonii i po 1—3 z krajów zachodniej Europy.

Na program sympozjum składały się 20 minutowe referaty, 5 minutowe komu-

nikaty oraz dyskusja na zakończenie każdej sesji tematycznej. Tematykę sympozjum stanowiły następujące zagadnienia:

1. Aktywacja tlenu przez zredukowane flawiny i flawoproteidy (3 referaty),
2. Lucyferaza (2 referaty i 7 komunikatów),
3. Hydroksylazy i mooksygenazy (7 referatów i 2 komunikaty),
4. Referaty dotyczące wybranych zagadnień (5),
5. Mechanizm odłączania protonu (5 referatów i 3 komunikaty),
6. Kowalencyjnie związane flawiny i nowe flawiny (5 referatów i 6 komunikatów),
7. Deazaflawiny i inne flawiny modelowe (4 referaty i 3 komunikaty),
8. Flawodoksyny (4 referaty i 4 komunikaty),
9. Dehydrogenaza liponianowa, reduktaza glutationu (4 referaty i 5 komunikatów),
10. Złożone flawoproteidy (7 referatów i 5 komunikatów),
11. Flawiny przenoszące elektrony, reduktazy cytochromu, dehydrogenazy flawoproteidowe (7 referatów i 5 komunikatów).

Zasadniczą część obrad stanowiły referaty i dyskusje dotyczące przede wszystkim mechanizmu działania flawin i różnych typów flawoproteidów. Niektóre inne właściwości tej grupy enzymów, omawiane w czasie sympozjum mogą zilustrować następujące przykłady. Aktywny transport ^{14}C -ryboflawiny do komórek mutantów drożdży zachodzi przy udziale specyficznej permeazy ($K_M = 1,5 \times 10^{-5} \text{M}$, 30°). Transport ten jest w znacznym stopniu uwarunkowany pH a o jego wybiórczości dowodzi fakt, że FMN jest inhibitorem współzawodniczym.

Z danych przedstawionych przez Riflina wynika, że hormony tarczycy regulują przekształcenie ryboflawiny w FMN i FAD.

Poza znanymi dotychczas 3 typami kowalencyjnie związanej flawiny z apoenzymami (tj. jako N/3/histydyloryboflawiny, tioestru cysteneiloryboflawiny i tiohemiacetala cysteneiloryboflawiny) przedstawiono wyniki wykazujące istnienie czwartego typu wiązania kowalencyjnego flawiny z białkiem. Występuje ono w dehydrogenazie tiaminy, oksydocyklazie β -cyklopiazonianu (pochodna N-morfolinometylopiperyazyno-(2)-karboksyoamid, tzw. piazolina) i oksydazie L-gulono- γ -laktonu w mitochondriach wątroby szczura. Ten nowy typ wiązania dotyczy podstawienia w pozycji 8 α flawiny. Miejsce i rodzaj podstawników w pierścieniu imidazolowym nie są jeszcze znane.

U *Streptomyces* (szczep 768) wykryto związek nazwany roseoflawiną, który jest naturalnym analogiem ryboflawiny — 7-metylo-3-dwumetyloamino-10-D-rybityloalloksazyną.

Coraz większe zastosowanie w badaniach mechanizmu działania flawin znajdują deazaflawiny (FMN, FAD). Stwierdzono, że koenzymy te użyte w rekonstrukcji oksydazy glikolanu z wątroby i oksydazy D-aminokwasów z nerki świni umożliwiły tylko utlenienie substratu i redukcję enzymu, ale nie reakcję z tlenem. Wskazuje to, że ogólną cechą deazaflawin jest przenoszenie wodoru. Mimo że deazaflawiny działają znacznie słabiej niż natywne flawiny, to jednak są bardzo pomocne w tych badaniach. Jedynym wyjątkiem jest flawodoksyna *Azotobacter vinelandi* (przenosi równoważniki redukcyjne z oświetlanych chloroplastów na kompleks nitrogenazy tego organizmu), która działając z 5-deazaFMN wytwarza etylen pięciokrotnie szybciej niż współdziałając z FMN.

Analizując budowę znanych flawodoksyn w rozwoju ewolucyjnym, Fox postulował, że te niskocząsteczkowe enzymy zawierające FMN jako grupę prostetyczną są u prokariota funkcjonalnie zbliżone od ferredoksyn.

Cechami charakterystycznymi dehydrogenazy NADH *Azotobacter vinelandi* w odróżnieniu od enzymów ssaków, są przede wszystkim niski ciężar cząsteczkowy, zachowanie we wszystkich etapach oczyszczania stałego stosunku aktywności utleniania

NADH/NADPH (9:1) oraz zdolność do redukcji menadionu i hamowanie tej aktywności w 97% przez dikumarol.

Z danych pracowni Singera wynika, że deaktywacja dehydrogenazy bursztynianowej spowodowana przyłączeniem szczawiooctanu oraz aktywacja tego enzymu pod wpływem czynników redukujących (m.in. FMNH₂) i światła + EDTA obejmuje interakcję między kowalencyjnie związaną flawiną i miejscem wiązania szczawiooctanu.

Kilka referatów dotyczyło mechanizmu działania dehydrogenazy i oksydazy ksantyny z różnych źródeł (wątroby indyka, *Micrococcus lactitylucus* i oksydazy ksantynowej mleka), flawocytochromu b₂, flawoproteidowej reduktazy adrenodoksyny (3 prace dotyczące oczyszczania i właściwości), flawoproteidu przenoszącego elektrony. Wykazano, że w mikrosomalnej reduktazie NADPH : cytochrom P-450, zawierającej FAD i FMN, obecność FMN warunkuje transport elektronów na cytochrom P-450, cytochrom c, DCIP, natomiast po usunięciu FMN, redukcja żelazicyjanku przebiega przy udziale tylko FAD.

Materiały sympozjalne zostaną w ciągu roku opublikowane.

Z. Kaniuga

V Międzynarodowe Sympozjum Pterydynowe Konstanz 14—18 kwiecień 1975

W dniach 14—18 kwietnia 1975 odbyło się w Konstanz (RFN) V Międzynarodowe Sympozjum poświęcone biochemii pterydyn i kwasu foliowego. Sympozjum zorganizował prof. W. Pfleiderer z Wydziału Chemii Uniwersytetu w Konstanz. W spotkaniu, które odbywało się na terenie Uniwersytetu, brało udział około 100 uczestników z większości ośrodków badawczych zainteresowanych „problemami folianowymi”, a wśród nich tak wybitni specjaliści jak: A. A. Albert, D. J. Brown i P. Rowe (Australia); G. M. Brown, S. Kaufman, F. Huennekens, R. Kisliuk, G. W. E. Plaut, E. C. Taylor, T. Shiota, S. Waxman, J. M. Whiteley (USA); K. G. Scrimgeour, V. M. Whitehead (Kanada); J. A. Blair, H. S. C. Wood (Wielka Brytania); F. Bergmann (Izrael); K. Iwai, Y. Iwanami (Japonia); W. Pfleiderer, H. Rembold, D. Niethamer (RFN); J. H. Bieri, C. H. Egster (Szwajcaria) oraz wielu innych.

W czasie 5 dniowych obrad wygłoszono 14 referatów sympozjalnych oraz 60 krótkich doniesień, które zostaną w całości wydrukowane w materiałach sympozjalnych. Największa ilość doniesień (3 referaty sympozjalne i 24 komunikaty) dotyczyła różnych aspektów chemicznej syntezy szeregu pochodnych pterydynowych oraz pochodnych i analogów folianu. Przedstawiono, między innymi, syntezę nowych, tiolowych pochodnych kwasu pterydynowego, kwasu foliowego oraz aminopteryny i ametoptyeryny. (R. Kisliuk i inni, Nair i Baugh, McCormack). Podkreślono, że w przeciwieństwie do tiolowych pochodnych aminopteryny i ametoptyeryny, kwas tiofoliowy nie hamował aktywności reduktazy dihydrofolianowej.

Dużo uwagi poświęcono również omówieniu biosyntezy kwasu dihydrofoliowego, pochodnych poliglutaminianowych folianu oraz biosyntezy prostych pterydyn (3 referaty sympozjalne, 15 komunikatów) u bakterii i u owadów. Doniesiono o wyizolowaniu, oczyszczeniu w wysokim stopniu (często przy zastosowaniu chromatografii powinowactwa) oraz zbadaniu własności kilku enzymów katalizujących różne etapy biosyntezy pterydyn i dihydrofolianu. (Wood, Brown, Iwai, Rowe). Poznanie własności tego typu enzymów ułatwia znalezienie specyficznie działających inhibitorów syntezy dihydrofolianu, co ma szczególnie duże znaczenie w chemoterapii. Ponadto przedstawiono dalsze dowody potwierdzające, że biosynteza prostych pterydyn

(np. biopteryny) ma również miejsce w hodowanych *in vitro* niektórych komórkach ssaków (1 referat sympozjalny, 1 komunikat). Obserwacje te są bardzo istotne ze względu na udział prostych pterydyn w szeregu procesach metabolicznych. I tak, uowodorowana pochodna biopteryny, jak wiadomo od szeregu lat, jest kofaktorem w katalizowanej przez hydroksylazę fenyloalaniny syntezie tyrozyny. Na sympozjum zaproponowano dalsze uzupełnienia tej reakcji (S. Kaufman, Ayling). Przedstawiono również szereg dalszych dowodów przemawiających za udziałem prostych pterydyn w transporcie elektronów w komórce (Rembold, Lund, Kwee).

Enzymom folianowym, czyli enzymom przeprowadzającym folian w jego koenzymatyczne pochodne poświęcono 6 doniesień. Omawiano bądź to własności oczyszczonych preparatów reduktazy dihydrofolianowej (Poe, McCormick, Scrimgeour) i syntetazy tymidylanowej (Kisliuk) bądź też referowano wyniki dotyczące występowania oraz poziomu aktywności enzymów folianowych oraz syntetazy metioniny w hodowanych *in vitro* komórkach ssaków (B. Grzelakowska-Sztabert et al., Sauer, Willmans). Z przedstawionych danych wynikało, że spośród badanych enzymów jedynie reduktaza dihydrofolianowa oraz syntetaza metioniny charakteryzują komórki z logarytmicznej fazy wzrostu hodowli.

Transport folianu lub jego analogów do komórek bakteryjnych lub hodowanych *in vitro* komórek ssaków, izolowanie oraz badanie własności białek odpowiedzialnych za wiązanie folianu w płynach ustrojowych, a także w komórkach oraz metabolizm folianu i jego analogów w różnych organach ssaków stanowiły temat 3 referatów sympozjalnych i 12 doniesień. Podkreślano znaczenie białek wiążących folian w regulacji *in vivo* efektywności transportu folianu do komórek (Huenekens, Waxman), którego poziom z kolei pośrednio wpływa na intensywność szeregu przemian komórkowych.

Jak widać tematyka sympozjum objęła szerszy — niż to zapowiadał tytuł sympozjum — wachlarz zagadnień z zakresu biologii i chemii pterydyn i folianu. Było to możliwe ze względu na udział w obradach chemików, biochemików, lekarzy i biologów.

Obrady odbywały się w niezwykle przyjemnej i przyjacielskiej atmosferze, przy niemal 100% frekwencji uczestników, nawet na popołudniowo-wieczornej sesji w ostatnim dniu obrad. Podobne spotkanie „pterydynowe” ma odbyć się za 4 lata, prawdopodobnie w USA.

B. Grzelakowska-Sztabert

**Sympozjum na temat
„Odkrycie i obecny stan wiedzy o cyklu mocznikowym”
Walencja (Hiszpania), 22—24 maja 1975 r.**

W dniach 22—24 maja 1975 r. odbyło się w Uniwersytecie w Walencji (Hiszpania) Sympozjum na temat „Odkrycie i obecny stan wiedzy o cyklu mocznikowym” („Discovery and present status of the urea cycle”) dla uhonorowania odkrywcy tego cyklu — Sir Hansa Krebsa. W czasie Sympozjum odbyła się uroczystość nadania Sir Hansowi Krebsowi stopnia *doctor honoris causa* Uniwersytetu Walencji.

Organizatorem naukowym Sympozjum był dr Santiago Grisolia, profesor biochemii na Uniwersytecie w Kansas City (USA). W obradach wzięło udział 50 osób aktualnie pracujących w zakresie tematyki Sympozjum. Uczestnikami byli głównie Amerykanie, Anglicy i Hiszpanie. Zaproszonych było również po dwóch uczestników ze Szwajcarii i Włoch oraz po jednym uczestniku z Finlandii, Japonii, Kanady, Meksyku, RFN i Polski.

Obrady rozpoczęły się referatem wprowadzającym wygłoszonym przez Sir Hansa Krebsa dotyczącym jego początkowych badań, które doprowadziły do odkrycia cyklu mocznikowego. Tematyka Sympozjum dotyczyła chemii, biochemii i patofizjologii procesu syntezy mocznika i obejmowała następujące zagadnienia:

1. Ewolucyjne i porównawcze aspekty cyklu mocznikowego (podsumowane w referacie P. P. Cohena, USA).
2. Właściwości chemiczne mocznika i jego prekursorów w procesie biosyntezy (zbrane w referacie J. Kennedy'ego, USA).
3. Enzymy cyklu mocznikowego oraz enzymy z nim współdziałające.
4. Regulacja aktywności cyklu mocznikowego.
5. Transport i regulacja na poziomie błon.
6. Dziedziczne wady metaboliczne procesu biosyntezy mocznika.
7. Regulacja metabolizmu amoniaku.

Zasadniczą część obrad stanowiły referaty i dyskusja dotyczące przede wszystkim mechanizmu działania enzymów cyklu mocznikowego i enzymów z nim współdziałających oraz regulacji procesu biosyntezy mocznika. Spośród enzymów cyklu mocznikowego dokładnie zostały omówione: syntaza N-acetyloglutaminianowa (M. Tatibana, Japonia), syntaza karbamoilofosforanowa (M. E. Jones i M. E. Marshall, USA oraz K. R. F. Elliott, Anglia), fosfataza karbamoilofosforanowa (G. Ramponi, Włochy), karbamoilotransferaza ornitynowa (M. E. Marshall, USA), syntetaza argininobursztynianowa i liaza argininobursztynianowa (S. Ratner, USA) oraz arginaza (G. Soberon, Meksyk).

Podczas omawiania aspektów regulacyjnych cyklu dużo uwagi poświęcono roli dehydrogenazy glutaminianowej w procesie wytwarzania amoniaku dla syntezy karbamoilofosforanu. Wyniki badań pracowni J. B. Chappella (Anglia) nad wpływem leucyny na aktywność dehydrogenazy glutaminianowej wątroby szczura wskazują, że enzym ten w warunkach *in vivo* działa w kierunku syntezy glutaminianu, a nie w kierunku deaminacji tego aminokwasu. Ponieważ w obecności leucyny obserwowano stymulację dezaminazy AMP uważa się, że amoniak wymagany dla syntezy karbamoilofosforanu jest wytwarzany głównie w reakcji katalizowanej przez dezaminazę AMP i glutaminazę.

Ważną rolę regulacyjną w procesie biosyntezy mocznika mają również wewnątrzkomórkowe stężenia substratów (J. T. Brosnan, Kanada i G. Sainsbury, Anglia) oraz pośredników i enzymów cyklu mocznikowego (L. Rajman, USA), których poziom zmienia się w zależności od warunków dietetycznych (H. Aebi, Szwajcaria). Analizując aktywność cyklu mocznikowego wykazano duże znaczenie N-acetyloglutaminianu dla aktywacji syntazy karbamoilofosforanowej oraz argininy dla aktywacji syntazy N-acetyloglutaminianowej (M. Tatibana, Japonia). Podkreślano również zależność szybkości wytwarzania mocznika od stężeń lizyny i ornityny w izolowanych komórkach wątroby (J. Bryła, Polska), które znajdują coraz większe zastosowanie w badaniach metabolizmu azotowego u zwierząt (R. Hems, M. Stubbs-Spry, P. Lund, Anglia).

Kilka referatów dotyczyło dziedzicznych wad metabolicznych procesu biosyntezy mocznika, omówionych szczegółowo przez V. E. Shih, USA. Dokładniej przedstawiono wyniki badań dotyczące argininemii (J. P. Colombo, Szwajcaria) i bloku metabolicznego na poziomie syntazy karbamoilofosforanowej (M. Walser, USA).

Wiele czasu zajęła dyskusja nad metodyką oznaczania poszczególnych pośredników cyklu mocznikowego oraz aktywności enzymów biorących udział w biosyntezie mocznika. Postulowano opracowanie handlowych zestawów do oznaczania metabolitów i enzymów cyklu mocznikowego.

Materiały Sympozjum zawierające zarówno referaty jak i dyskusję zostaną opublikowane przez wydawnictwo John Wiley & Sons, Inc.

J. Bryła

RECENZJE

Ergebnisse der Experimentellen Medizin
vol. 18 Carbohydrate Metabolism in Animal Tissues and its Regulation
red. Dietrich Dettmer, VEB Volk und Gesundheit, Berlin, 1974

Omawiana książka jest zbiorem referatów wygłoszonych na drugim wspólnym sympozjum Wszechzwiązkowego Towarzystwa Biochemicznego ZSRR i Towarzystwa Biochemicznego Niemieckiej Republiki Demokratycznej, które odbyło się w Leningradzie w maju 1973 roku. Książka wydana jest techniką małej poligrafii i zawiera przeglądowe artykuły, dotyczące w większości regulacji metabolizmu węglowodanów. Do książki dołączono kliszę z mikrofilmami komunikatów wygłoszonych na sympozjum; do odczytania ich niezbędny jest jednak odpowiedni czytnik.

Tematyka artykułów napisanych przez znanych autorów jest aktualna, odzwierciedlająca tematy przedstawiane ostatnio w innych przeglądowych wydawnictwach zajmujących się regulacją metaboliczną na poziomie molekularnym. Znajdujemy tam referat o mikro- i makromolekularnej strukturze glikogenu, o hydrolitycznym rozkładzie glikogenu, kilka artykułów dotyczy różnych aspektów regulacji glikolizy, jeden roli erytrozo-4-fosforanu w regulacji cyklu pentozowego w mięśniu serca; przez wiele artykułów przewija się sprawa hormonalnej regulacji metabolizmu węglowodanów. Wśród tych ostatnich należy wymienić przede wszystkim pierwszy referat, wygłoszony przez G. Webera z USA na temat integracyjnego działania insuliny na przemianę węglowodanów. Jako ostatni zamieszczono referat H. Frundera i współpracowników przedstawiający ciekawe rozważania kinetyczne o znaczeniu kompleksów metali z metabolitami w regulacji sekwencji reakcji enzymatycznych.

Niewątpliwie każdy biochemik zainteresowany regulacją enzymów i kontrolą metabolizmu węglowodanów, weźmie chętnie do ręki omawianą książkę. Chociaż nie jest ona zbiorem najnowszych oryginalnych prac z dziedziny regulacji metabolizmu węglowodanów, to jednak posiada niewątpliwą wartość dydaktyczną i będzie zapewne pożyteczną lekturą dla nauczycieli akademickich pracujących dydaktycznie we wszystkich typach szkół.

M. Żydowo

Armin Braun, 1974 — „The biology of Cancer”
Addison-Wesley Publishing Company, Advanced Book Program, Reading,
Massachusetts — London — Amsterdam — Don Mills — Ontario — Sygney — Tokyo

Autor książki, profesor Armin Braun jest kierownikiem Laboratorium Biologii Roślin na Uniwersytecie Rockefellera w Nowym Jorku, członkiem Amerykańskiej Akademii Nauk oraz honorowym członkiem The Harvey Society. W roku 1969 ukazała się jego książka pt. „The Cancer Problem: a critical analysis and modern synthesis”.

Recenzowana książka przedstawia w sposób popularny a kompetentny aktualne poglądy na temat biologii zarówno nowotworów jak i komórek prawidłowych. Liczy ona 169 stron łącznie ze 159 odnośnikami literaturowymi oraz ułożonym alfabetycznie indeksem rzeczowym. Autor zakłada, że czytelnik posiada podstawowe wykształcenie biologiczne, nie mniej jednak przejrzyste i ciekawe ujęcie problemów sprawia, że książka stanowi ciekawą i pożyteczną lekturę dla wszystkich interesujących się problemami nowotworowymi.

Początkowe rozdziały książki poświęcone są omówieniu dotychczas poznanych przyczyn powstawania nowotworów, następne zaś zreferowaniu poglądów na temat prawdopodobnych mechanizmów regulacji przebiegu cyklu komórkowego w komórkach prawidłowych i nowotworowych. Autor podkreśla regulacyjną rolę chalonów, tkankowych inhibitorów podziałów komórkowych. Omawia także działanie szeregu czynników (najprawdopodobniej białek) syntetyzowanych specyficznie przez komórki nowotworowe i charakteryzujących się zdolnością stymulacji podziałów komórkowych. Dużo uwagi poświęca również strukturze i własnościom błon powierzchniowych komórek. W kolejnych rozdziałach czytelnik znajduje aktualne poglądy na rolę wirusów onkogennych (zarówno wirusów DNA jak i RNA) w procesie transformacji nowotworowej.

Przedstawione w książce dane stanowią podstawę do krytycznego ustosunkowania się autora do licznych hipotez na temat powstawania nowotworów (*protein deletion hypothesis, oncogenic theory of cancer, chromosomal imbalance theory, provirus theory of oncogenesis* itp.). Zrozumienie mechanizmów powstawania nowotworów jest zagadnieniem o znaczeniu nie tylko akademickim. Związane jest bowiem z koniecznością wyjaśnienia roli w procesie transformacji nowotworowej materiału genetycznego komórek oraz czynników epigenetycznych, dzięki którym może dojść do zmian w ujawnianiu się informacji genetycznej. Jedynie dokładna znajomość biologii nowotworów, a w szczególności tych wszystkich cech komórek nowotworowych, które powodują ich odmienność od komórek prawidłowych, pozwolić może na opracowanie skutecznego, biologicznego kontrolowania wzrostu nowotworów.

B. Grzelakowska-Sztabert

SPIS TREŚCI

K. Staroń, A. Jerzmanowski — <i>Physarum polycephalum</i> jako model do badań biochemicznych cyklu komórkowego	359
K. Kamiński, W. Matuszewski — Różnorodne formy monoaminooksydazy	369
J. Kwast-Welfeld — Regulacja aktywności kinaz białkowych	383
R. Farbiszewski, K. Worowski — Enzymy proteolityczne tkanek nowotworowych	407
G. Raczyński — Katabolizm lizyny w tkankach ssaków	425
S. Poznański, J. Kowalewska, W. Bednarski, A. Reps — β -galaktozydaza, własności i zastosowanie w technologii żywności	437
Sprawozdania:	
I Środowiskowa Konferencja Naukowa Chemików, Piła 20—22.3.1975 (<i>J. Chmiel</i>)	445
V Międzynarodowe Sympozjum nt. Flawin i flawoproteidów, San Francisco 31.3—3.4.1975 (<i>Z. Kaniuga</i>)	447
V Międzynarodowe Sympozjum Pterydynowe, Konstanz 14—18.4.1975 (<i>B. Grzelakowska-Sztabert</i>)	449
Symposium nt. Odkrycie i obecny stan wiedzy o cyklu mocznikowym, Walencja 22—24.5.1975 (<i>J. Bryła</i>)	450
Recenzje:	453

POSTĘPY BIOCHEMII

December 1975

ARTICLES IN POLISH

Volume 21	Number 4
K. Staroń, A. Jerzmanowski— <i>Physarum polycephalum</i> —the Model for Biochemical Investigations of the Cell Cycle (Inst. Biochem., University of Warsaw, Warszawa)	359
K. Kamiński, W. Matuszewski—Multiple Forms of Monoamine Oxidase (Dept. Biochem., Inst. Biol. Physiol.; Inst. Obstrics Gyneacol., Silesian Medical Academy, Zabrze)	369
J. Kwast-Welfeld—Regulation of the Activity of Protein Kinases (Dept. Enzymol., Inst. Biochem., University of Warsaw, Warszawa)	383
R. Farbiszewski, K. Worowski—Proteolytic Enzymes of Malignant Tissues (Dept. Biochem., Inst. Physiol.—Biochem., Medical School, Białystok)	407
G. Raczyński—Catabolism of Lysine in Mammalian Tissues (Dept. Physiol. Nutrit., Inst. Physiol. Nutrition Animals, Pol. Acad. Sci., Jabłonna near Warszawa)	425
S. Poznański, J. Kowalewska, W. Bednarski, A. Reps—Obtaining, Properties and Application of β -galactosidase in Food Technology, Inst. Food Engineer. Biotechnol. Agriculture Academy, Olsztyn)	438
Meeting Reports	445
Book reviews	653

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 przedstawianej 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. Acta*, (1972), 276, (1) np.

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

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

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

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

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk winny jasno opisywać ich treść 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: \triangle \square \circ \blacktriangle \blacksquare \bullet . Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku podejmuje wydawca.

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

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

SPIS TREŚCI

K. Staroń, A. Jerzmanowski— <i>Physarum polycephalum</i> jako model do badań biochemicznych cyklu komórkowego	359
K. Kamiński, W. Matuszewski—Różnorodne formy monoaminooksydazy	369
J. Kwast-Welfeld—Regulacja aktywności kinaz białkowych	383
R. Farbiszewski, K. Worowski—Enzymy proteolityczne tkanek nowotworowych	407
G. Raczyński—Katabolizm lizyny w tkankach ssaków	425
S. Poznański, J. Kowalewska, W. Bednarski, A. Reps— β -galaktozydaza, własności i zastosowanie w technologii żywności	437
Sprawozdania:	
I Środowiskowa Konferencja Naukowa Chemików, Piła 20—22.3.1975 (J. Chmiel)	445
V Międzynarodowe Sympozjum nt. Flawin i flawoproteidów, San Francisco 31.3—3.4.1975 (Z. Kaniuga)	447
V Międzynarodowe Sympozjum Pterydynowe, Konstanz 14—18.4.1975 (B. Grzelakowska-Sztabert)	448
Sympozjum nt. Odkrycie i obecny stan wiedzy o cyklu mocznikowym, Walencja 22—24.5.1975 (J. Bryła)	450
Recenzje:	453