

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 23 (1)
1-137 (1977)

1977

tom 23 nr 1



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

Układ maszynopisu: strona okładkowa nie numerowana 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), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). Tytułów podrozdziałów nie dzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (I).

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

W. J. J. J.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1977 TOM 23 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 23(1)
(1-137) (1977)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman-Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

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

Adres Redakcji

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

Nakład 2240 (2113+107)
Ark. wyd. 10,5, ark. druk. 8,5
Pap. druk. sat. kl. III, 80 g 70×100
Zam. 1456/76 F-15

Oddano do składania 13.X.1976
Podpisano do druku w marcu 1977
Druk ukończono w marcu 1977
Cena zł 20.--

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej

GRAŻYNA ADLER *)

Tyreoliberyna

Thyrotropin-Releasing Factor

Spis treści

- I. Neurohormonalna funkcja podwzgórza
- II. Metody oznaczania tyreoliberyny
- III. Struktura
- IV. Metabolizm tyreoliberyny
 - IV-1. Biosynteza
 - IV-2. Katabolizm
 - IV-3. Regulacja metabolizmu hormonu
 - V. Aktywność biologiczna tyreoliberyny
 - V-1. Uwalnianie tyreotropiny
 - V-2. Uwalnianie prolaktyny
 - V-3. Uwalnianie hormonu wzrostu
 - V-4. Działanie tyreoliberyny na ośrodkowy układ nerwowy
 - VI. Analogi tyreoliberyny
 - VII. Piśmiennictwo

I. Neurohormonalna funkcja podwzgórza

W roku 1947 Green i Harris (1) sformułowali hipotezę mówiącą o podwzgórzowej regulacji działania przysadki mózgowej. Według tej hipotezy podwzgórze wydziela związki zwane czynnikami albo hormonami, które stymulują lub hamują wydzielanie poszczególnych hormonów przysadki. Hipoteza wskazuje więc na podwzgórze jako miejsce przekształcenia informacji dostarczonej przez układ nerwowy w informację zawartą w hormonach. Te z kolei przenoszone przez układ krwionośny regulują metabolizm całego organizmu. Następne lata przyniosły szereg danych potwierdzających neurohormonalną funkcję podwzgórza.

Tyreoliberyna — czynnik uwalniający tyreotropinę (*thyrotropin-releasing factor*, TRF), nazywany też hormonem uwalniającym tyreotropinę

*) Dr, Zakład Biochemii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: DOPA — 3,4-dwuhydroksyfenyloalanina; BAL — 2,3-dwumerkaptopropanol

(*thyrotropin releasing hormone*, TRH) jest jednym z hormonów podwzgórze. Hormon ten stymuluje wydzielanie tyreotropiny (TSH) przez część gruczołową przysadki mózgowej a poprzez uwalnianie tego hormonu reguluje czynność wydzielniczą tarczycy. Ponadto stwierdzono stymulujący wpływ tyreoliberyny na wydzielanie prolaktyny. Wiadomo też, że jest ona regulatorem określonych procesów zachodzących w samym mózgu.

II. Metody oznaczania tyreoliberyny

Biologiczny test określania poziomu hormonu opracowano na podstawie stymulacji uwalniania tyreotropiny z przysadki i w ten sposób pobudzania czynności wydzielniczej komórek tarczycy. W tekście tym badany roztwór podaje się zwierzęciu drogą dożylną. Poziom tyreoliberyny wylicza się najczęściej na podstawie wzrostu ilości tyreotropiny w surowicy krwi, rzadziej wzrostu ilości hormonów tarczycy lub wzrostu włączenia znakowanego jodu do tych hormonów (2, 3, 4). Ten przyżyciowy test oznaczania tyreoliberyny jest stosunkowo mało czuły. W zależności od warunków doświadczenia tyreoliberynę oznacza się w ilościach nano- lub mikrogramowych.

Drugi, bardzo czuły test biologiczny przeprowadzany jest w warunkach *in vitro*. W tekście tym do zawiesiny przysadek lub hodowli komórek części gruczołowej przysadki dodaje się badany roztwór. Następnie mierzy się przyrost ilości tyreotropiny w komórkach i płynie inkubacyjnym, który jest proporcjonalny do ilości dodanej tyreoliberyny (5, 6). Obie te metody opierają się na badaniu podstawowej aktywności biologicznej hormonu, to jest stymulacji wydzielania tyreotropiny. W pewnych pracach badawczych stosuje się podobne metody polegające jednak na oznaczaniu stymulacji wydzielania prolaktyny przez tyreoliberynę (2).

Następną metodę oznaczania tyreoliberyny opracowano na podstawie badań wiązania hormonu poprzez jego receptory w komórkach przysadki. Dodanie badanego roztworu tyreoliberyny do układu zawierającego receptor i hormon radioaktywny zmniejsza ilość radioaktywności związanej z receptorem. Z różnicy tej można wyliczyć ilość dodanej tyreoliberyny z dokładnością rzędu pikogramów. Ta metoda radioreceptorowa stosowana jest dotychczas jedynie w pracach badawczych (7, 8), ale prawdopodobnie w przyszłości może być standardową metodą oznaczania tyreoliberyny.

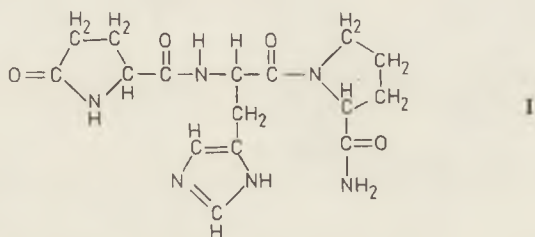
Obok oznaczania aktywności biologicznej tyreoliberyny często oznacza się jej poziom metodą radioimmunologiczną. Metoda ta zbliżona jest do metody radioreceptorowej z tą różnicą, że znakowany hormon wiąże się z przeciwciałem przeciwko tyreoliberynie, a nie z receptorem. Następnie po dodaniu badanego roztworu część hormonu znakowanego zostaje na zasadzie kompetycyjnej wyparta z kompleksu z przeciwciałem. Ilość niezakowanego hormonu wylicza się na podstawie różnicy radioaktywności

związanej z przeciwciałem w nieobecności i obecności związku nieradioaktywnego. Metodą radioimmunologiczną oznacza się pikogramowe ilości tyreoliberyny (9, 10, 11).

III. Struktura

Tyreoliberynę po raz pierwszy wyizolowali w roku 1966 Schally i wsp. (12) z części gruczołowej podwzgórza świni. Następnie otrzymano hormony z podwzgórzy wołu, owcy, świni oraz podwzgórzy człowieka i w latach 1969—1970 ustalono ich strukturę (13, 14, 15, 16, 17). Przeprowadzono więc analizę chemiczną produktów kwasowej hydrolizy tyreoliberyny oraz analizę widma masowego, w podczerwieni (IR) i jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR) zarówno natywnej cząsteczki jak i produktów jej degradacji. Stwierdzono, że hormony wydzielone z podwzgórzy różnych organizmów mają tę samą prostą budowę. Są one trójpeptydem z cyklicznym aminokwasem N-końcowym oraz grupą amidową dołączoną do aminokwasu C-końcowego. Tyreoliberyna jest amidem (Wzór I) L-pirolglutamyl-L-histydylo-L-proliny (pGlu-His-ProNH₂).

Już w 1969 roku Burgess i wsp. zsyntetyzowali tyreoliberynę przez amonolizę estru metylowego peptydu pGlu-His-Pro, a w roku 1970 Gillessen dokonał pierwszej kompletnej syntezy hormonu (17, 18).



Pierwsze badania syntetycznych hormonów i ich chemicznych pochodnych miały na celu stwierdzenie, czy hormon w formie czynnej biologicznie ma tę samą strukturę pierwszorzędową co hormon wyizolowany z tkanek oraz zbadanie jaka jest konformacja natywnej cząsteczki tyreoliberyny. Wykazano, że syntetyczny hormon ma taką samą aktywność biologiczną co hormon natywny (14). Analog niecykliczny Glu-His-ProNH₂ natomiast posiada tylko 1% aktywności tyreoliberyny (19). Preparatyka nie prowadzi więc do zmiany struktury cząsteczki hormonu.

Widmo NMR tyreoliberyny sugeruje możliwość wewnątrzcząsteczkowej stabilizacji struktury trójpeptydu. Również badania stałej dysocjacji pierścienia imidazolowego, tyreoliberyny i jej analogów wskazują na stabilizację cząsteczki poprzez wiązanie wodorowe pomiędzy pierwszo- a trzeciorzędowym azotem histydyny (20). Wydaje się jednak, że chociaż czą-

steżka hormonu po wyizolowaniu ma formę ustabilizowaną, aktywna biologicznie cząsteczka może mieć całkowitą swobodę kątów rotacji. Wskazują na to wyniki doświadczeń Donzela i wsp. (21), którzy stwierdzili, że analog z grupą metylową dołączoną do wiązania peptydowego między kwasem piroglutaminowym i histydyną ($N^{\alpha}\text{Me His}^2$) TRF, w którym nie ma miejsca na wiązanie wodorowe, wykazuje taką samą aktywność biologiczną co cząsteczka natywnego hormonu. Podobnie uważają Severtson i wsp. (22).

Obecnie są syntetyzowane zarówno tyreoliberyna nieradioaktywna (23) jak i radioaktywna. Hormon znakuje się przeprowadzając syntezę chemiczną przy użyciu ^3H -proliny lub ^{14}C -histydyny (17, 24, 25). Drugą metodą otrzymania tyreoliberyny znakowanej jest wprowadzenie ^{125}I metodą chloranaminową do gotowej cząsteczki hormonu (26).

IV. Metabolizm tyreoliberyny

IV-1. Biosynteza

Stężenie tyreoliberyny w podwzgórzu dziesięciokrotnie przewyższa jej stężenie w pozostałych częściach mózgowia (27). Metodą radioimmunologiczną badano rozmieszczenie tyreoliberyny w różnych częściach podwzgórza i stwierdzono, że hormon występuje głównie w wyniosłości pośredkowej, stanowiącej dolną część tak zwanego lejka łączącego podwzgórze z częścią nerwową przysadki. Stężenie tyreoliberyny w tej części wynosi aż 38ng/mg białka (3,6ng/mg tkanki), a obecność hormonu wykrywa się przede wszystkim w zakończeniach nerwów dochodzących do naczyń przysadkowego krążenia wrotnego (28, 29).

Synteza tyreoliberyny zachodzi w komórkach podwzgórza. Bezpośrednim dowodem na to są wyniki doświadczeń ze znakowanymi aminokwasami. I tak ^{14}C -prolina dodana do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej skrawki uzyskane z różnych części mózgu włączana jest do tyreoliberyny jedynie w skrawkach otrzymanych z podwzgórza. W podobnym doświadczeniu stwierdzono, że inne narządy, jak np. wątroba nie syntetyzują w sposób niespecyficzny hormonu (30, 31). McKelvy i wsp. (32, 33, 34) badali w jakiego typu komórkach w podwzgórzu syntetyzowana jest tyreoliberyna. Autorzy hodowali izolowany fragment wyniosłości pośredkowej w ciągu 13 dni. W okresie tym badali zmiany morfologiczne w komórkach, stężenie tyreoliberyny w komórkach i płynie inkubacyjnym oraz biosyntezę hormonu. Biosyntezę określali na podstawie pomiaru włączania ^3H -proliny do tyreoliberyny. Badania morfologiczne wykazały, że podczas 13 dni hodowli zakończenia aksonów stopniowo degenerują się. Natomiast struktura pozostałych komórek, a w szczególności wyściółkowych nie ulega zmianie. W czasie tych 13 dni biosynteza tyreoliberyny znacznie się obniżyła, pomimo stałej szybkości wchłaniania znakowanych aminokwa-

sów przez tkankę. Równolegle do degeneracji elementów nerwowych malał poziom tyreoliberyny początkowo w tkance, następnie zarówno w tkance jak i w środowisku inkubacyjnym. Fakt ten wskazuje na udział elementów neuronalnych w wytwarzaniu tyreoliberyny. Wyniki doświadczeń B e n n e t a i wsp. (35) potwierdziły udział neuronów w biosyntezie hormonu. Autorzy ci izolowali synaptosomy z komórek podwzgórza owiec, lub synaptosomy tylko z komórek wyniosłości pośrodkowej. Stwierdzili, że zawiesina synaptosomów wydziela tyreoliberynę do środowiska inkubacyjnego, przy czym przez synaptosomy otrzymane z całego podwzgórza wydzielana jest niewiele większa ilość hormonu od ilości wydzielanej przez synaptosomy uzyskane z wyniosłości pośrodkowej.

Wzrost wydzielania tyreoliberyny obserwowano po elektrycznej stymulacji zakończeń nerwowych jak również po dodaniu dopaminy do mieszaniny inkubacyjnej. Inhibitorami wydzielania tyreoliberyny są dodane do układu 5-hydroksytryptamina i reserpina (30, 31).

Wydaje się, na podstawie powyższych wyników, że istnieją wystarczające dowody do stwierdzenia, że biosynteza tyreoliberyny zachodzi w zakończeniach włókien nerwowych dochodzących do wyniosłości pośrodkowej podwzgórza i że proces ten jest regulowany przez ośrodkowy układ nerwowy. Jednak obecność stosunkowo dużej ilości tyreoliberyny w różnych częściach mózgu i przechodzenie podanego dokomorowo hormonu z płynu mózgowo-rdzeniowego do wyniosłości pośrodkowej uważane jest przez niektórych autorów za wskazówkę biosyntezy tyreoliberyny poza wyniosłością pośrodkową (36, 37, 38).

Tyreoliberynę można zsyntetyzować w warunkach *in vitro* w układzie zawierającym homogenat podwzgórza, aminokwasy, ATP i jony magnezu. Do cząsteczki hormonu włączane są znakowane aminokwasy ^{14}C -kwas glutaminowy, ^{14}C -prolina i ^{14}C -histydyna, natomiast nie jest włączany ^{14}C -kwas piroglutaminowy. Cyklizacja zachodzi więc już po utworzeniu cząsteczki trójpeptydu. Mechanizm tej cyklizacji nie jest znany, wiadomo jedynie, że w tkance mózgowej występuje cyklaza kwasu glutaminowego (30, 31).

Po jednorazowym podaniu znakowanego aminokwasu maksimum radioaktywności w tyreoliberynie występuje po 40 minutach reakcji w temperaturze 37° i pH 7,7 (30, 31). Znakowane aminokwasy włączane są do tyreoliberyny również w obecności puromycyny, cykloheksomidu lub chloramfenikolu (30, 31, 33). Tak więc tyreoliberyna nie jest syntetyzowana na polirybosomach. R e i c h l i n i wsp. (30, 31) stwierdzili, że enzymy syntetyzujące tyreoliberynę występują w supernatancie po wirowaniu homogenatu podwzgórza przy 100 000xg. Enzymy te są wrażliwe na takie inhibitory jak HgCl_2 i jodoacetamid, a niewrażliwe na działanie RN-azy. Układ enzymów syntetyzujących tyreoliberynę został wydzielony z podwzgórza świni i oczyszczony 3000 razy (31).

Podwzgórze połączone jest z przysadką mózgową bezpośrednio poprzez

układ przysadkowego krążenia wrotnego. Stwierdzono, że poziom tyreoliberyny we krwi tego krążenia jest wyższy niż jej poziom we krwi obwodowej i że właśnie tą drogą tyreoliberyna bardzo szybko przenoszona jest do przysadki (36).

Na podstawie szybkości znikania radioaktywnego hormonu po wstrzyknięciu szczurom znakowanej tyreoliberyny Redding i Schally (40) stwierdzili, że okres półtrwania tyreoliberyny we krwi wynosi około 4 minut. Inaktywacja hormonu jest procesem enzymatycznym, maksymalny rozpad zachodzi w temp. 37° przy obojętnym pH. Pierwszym etapem katabolizmu cząsteczki jest jej deaminacja z wytworzeniem trójpeptydu pGlu-His-Pro. Następnie peptyd jest hydrolizowany z uwolnieniem poszczególnych aminokwasów (17). Podczas oznaczania poziomu hormonu w surowicy degradacji tej, znacznie obniżającej wyniki, zapobiega się poprzez natychmiastowe dodanie odpowiednich inhibitorów enzymów np. 2,3-dwumetylomerkaptopropanolu (BAL) (9, 11). Natychmiastowe zamrożenie i następne rozmrożenie badanej krwi (ale nie samej surowicy) prowadzi do zahamowania degradacji hormonu przez deamidazy (41). Być może w wyniku tej procedury z krwinek uwalnia się czynnik, który uniemożliwia deamidację.

Nadmiar hormonu w samym podwzgórzcu ulega szybko rozpadowi. Proces ten nie zależy od stopnia degeneracji zakończeń nerwowych komórek podwzgórza a reakcja prawdopodobnie zachodzi w komórkach wyściółkowych (34). Po inkubacji frakcji białek rozpuszczalnych otrzymanych z homogenatu podwzgórza szczura z (³H-Pro)-tyreoliberyną w mieszaninie inkubacyjnej wykrywa się pochodną zdeamidowaną, a więc taki sam produkt degradacji jak w surowicy krwi. Deamidaza występująca w podwzgórzcu nie jest jednak identyczna z enzymem z krwi ponieważ inna jest jej wrażliwość na specyficzny inhibitor pGlu-HisOCH₃. Jeżeli znakowaną tyreoliberynę dodaje się do całego homogenatu podwzgórza obok tego trójpeptydu i ³H-proliny, produktu jego hydrolizy pojawia się amid proliny (42, 43). Tak więc w podwzgórzcu występują inne niż w surowicy enzymy degradujące tyreoliberynę.

IV-3. Regulacja metabolizmu hormonu

Biosyntezę tyreoliberyny reguluje ośrodkowy układ nerwowy za pośrednictwem neurotransmiterów — katecholamin. Czynnikiem środowiskowym znacznie stymulującym biosyntezę hormonu jest długotrwałe działanie niskiej temperatury na organizm zwierzęcia. Poza tym biosynteza tyreoliberyny podlega również regulacji hormonalnej. Hormon wzrostu i prolaktyna obniżają ją, a kortyzon podwyższa. Hormony te działają jeżeli poda się je w dawkach farmakologicznych, a więc znacznie przewyższających ilości występujące w organizmie. Nie jest więc pewne, czy w warunkach fizjologicznych są one również regulatorem biosyntezy. Natomiast

hormonami, które w warunkach fizjologicznych regulują biosyntezę tyreoliberyny są hormony tarczycy. Zachodzi tu zjawisko dodatniego sprzężenia zwrotnego. I tak biosynteza tyreoliberyny u zwierząt, które pozbawiono tarczycy obniża się, a u zwierząt ze sztucznie wywołaną hypertyreozą się podwyższa (30, 31, 44).

Aktywność enzymów degradujących tyreoliberynę również jest niższa w surowicy krwi zwierząt w stanie hypotyreozy, w surowicy zaś zwierząt, którym podawano trójiodotyroninę znacznie przewyższa ich aktywność w surowicy zwierząt kontrolnych (45). W chwili obecnej trudno jest jeszcze podać znaczenie fizjologiczne powyższego wpływu hormonów tarczycy na zmiany aktywności obu podstawowych enzymów biorących udział w metabolizmie tyreoliberyny.

V. Aktywność biologiczna tyreoliberyny

V-1. Uwalnianie tyreotropiny

Jeszcze przed ustaleniem struktury tyreoliberyny wiadomo było, że po elektrycznej stymulacji podwzgórza wzrasta wydzielanie tyreotropiny przez komórki przysadki mózgowej. Następnie Martin i Reichlin (46) stwierdzili, że stymulacja podobna do elektrycznej zachodzi po wstrzyknięciu szczerom syntetycznej tyreoliberyny. W doświadczeniach z hodowlą komórek przysadki badano (47) zmiany ilości tyreotropiny w komórkach i w płynie inkubacyjnym po dodaniu tyreoliberyny do układu. Stwierdzono, że tyreoliberyna stymuluje zarówno biosyntezę jak i wydzielanie tyreotropiny i wyliczono, że kilkaset cząsteczek tego hormonu powstaje w odpowiedzi na jedną cząsteczkę egzogennej tyreoliberyny.

Zaledwie 10 μ g tyreoliberyny podane dożylnie człowiekowi powoduje wyraźny przyrost tyreotropiny we krwi (2). Wzrost ten obserwuje się już w 3 minuty po podaniu hormonu, przy czym wzrost ten u kobiet jest silniejszy niż u mężczyzn. Stymulację wydzielania tyreotropiny po dożylnym podaniu hormonu uwalniającego, jak również po podaniu dokomorowym, podskórnym i doustnym wykazali też inni autorzy (48, 49, 50).

Inna reakcja organizmu kobiet i mężczyzn na egzogenną tyreoliberynę wskazuje na pewien udział hormonów płciowych w regulacji procesu uwalniania tyreotropiny. Proces ten regulowany jest głównie przez hormony tarczycy (48, 49, 51, 52) przy czym regulacja odbywa się na zasadzie sprzężenia zwrotnego to znaczy przy wzroście poziomu hormonów tarczycy we krwi, maleje ilość uwalnianej tyreotropiny. W regulacji wydzielania tyreotropiny biorą też udział prostaglandyny (53, 54).

Badanie stymulacji wydzielania tyreotropiny przez tyreoliberynę znalazło bardzo szerokie zastosowanie w endokrynologii jako jeden z podstawowych testów diagnostycznych. W warunkach standardowych (55) test przeprowadza się podając jednorazowo dożylnie 200 μ g tyreoliberyny w 2ml roztworu soli fizjologicznej i mierząc wyjściowy poziom tyreotro-

piny oraz w 20 i 60 minut po podaniu hormonu. Wynik tego testu pomaga w rozpoznaniu i ustaleniu patogenezы poszczególnych chorób tarczycы.

Pierwszym etapem reakcji prowadzących do uwolnienia tyreotropiny jest połączenie się tyreoliberyny z receptorem komórkowym. Receptor jest białkiem posiadającym zdolność wiązania określonego hormonu i przekazywania zawartej w nim informacji biochemicznej enzymom wewnątrzkomórkowym. Badano wiązanie znakowanej tyreoliberyny przez subfrakcje otrzymane z przysadek szczura i stwierdzono, że najwięcej hormonu wiąże się z frakcją, której enzymem markerowym jest 5-nukleotydaza, a więc z frakcją błon komórkowych (56). Oczyszczona przez wirowanie w gradiencie sacharozy frakcja błon z przysadek szczura wiąże hormon 40 razy silniej niż wyjściowy homogenat (57). Poza frakcją błon, frakcja mikrosomalna i jądrowa wiążą niewielkie ilości ^3H -tyreoliberyny. Zwierzęta, którym przez kilkanaście dni podaje się pokarm z dodatkiem propylotiouracylu włączają więcej znakowanego hormonu do komórek przysadki niż zwierzęta kontrolne (56). Badania morfologiczne przysadek pobranych ze zwierząt karmionych propylotiouracylem wykazują specyficzny wzrost komórek tyreotropowych to jest komórek w których zachodzi synteza tyreotropiny (58). Wyniki te wskazują, że receptory tyreoliberyny nie są rozmieszczone równomiernie we wszystkich komórkach przysadki mózgowej lecz występują na powierzchni błon komórkowych komórek tyreotropowych. Wyliczono, że średnio przypada $3,7 \times 10^5$ miejsc wiążących tyreoliberynę w $1\mu\text{g}$ błon otrzymanych z hodowli niezmiennych komórek przysadki i 5×10^6 miejsc wiążących w mikrogramie błon otrzymanych z hodowli nowotworowych komórek tyreotropowych (7).

W wiązaniu tyreoliberyny przez receptor biorą udział fosfolipidy. Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej frakcję błon komórek przysadki fosfolipazy A i C, znacznie zmniejsza zdolność wiązania hormonu przez preparat. W tych samych warunkach fosfolipaza D nie zmniejsza wiązania hormonu. Również dodanie detergentów takich jak digitoniny i lizofosfatydylocholinoy, które niszczą lipidową strukturę błon znacznie obniża stopień wiązania hormonu (59).

Podczas inkubacji frakcji błon komórkowych z komórek przysadki ze znakowaną tyreoliberyną część hormonu wiąże się z receptorami. Jeżeli następnie doda się do mieszaniny inkubacyjnej hormon nieznakowany, to na zasadzie współzawodnictwa wypiera on część hormonu radioaktywnego ze związku z receptorem. Radioaktywność związana z frakcją błon przy podaniu dużego nadmiaru hormonu „zimnego” i nie ulegająca zmianie przy zwiększeniu dawki tego hormonu odpowiada adsorbkcji niespecyficznej. Ze zmian ilości znakowanego hormonu związanego z receptorem przy wzrastających dawkach hormonu nieradioaktywnego można wyliczyć ilość „zimnego” hormonu w badanych próbach i z tego korzysta opisana w rozdziale II radioreceptorowa metoda oznaczania tyreoliberyny. Ponadto na podstawie tych zmian można wykreślić krzywe

Scatcharda częściowo charakteryzujące kinetykę interakcji hormon — receptor. Na podstawie tych krzywych ustalono (8), że w komórkach przysadki istnieją dwa typy receptorów tyreoliberyny różniące się powinowactwem do cząsteczki hormonu. Wykazano że preparat błon otrzymanych z jednej przysadki szczura wiąże 0,023 pikomola tyreoliberyny. W podobnym układzie doświadczalnym inne hormony wiążą się z frakcją błon z komórek przysadki jedynie w sposób niespecyficzny (7, 60). Znaczne rozcieńczenie mieszaniny inkubacyjnej zawierającej kompleks tyreoliberyna — receptor prowadzi do jego szybkiej dysocjacji. Stała dysocjacji kompleksu wynosi $4 \times 10^{-8} \text{M}$ (7).

Dodanie do mieszaniny inkubacyjnej, zawierającej preparat błon, takich związków jak prostaglandyna PGE_1 , jej analog kwas 7-oksy-13-prostynowy oraz tyroksyna nie wpływa na stopień wiązania tyreoliberyny z receptorem (56). Wydaje się więc, że związki te nie regulują tworzenia kompleksu a regulacja wydzielania tyreotropiny przez te związki musi polegać na modyfikacji któregoś z dalszych procesów prowadzących do wydzielania hormonu. Zmiany w aktywności receptorowej obserwuje się podczas badania błon z przysadek szczurów, którym uprzednio podawano tyroksynę lub z przysadek szczurów, które pozbawiono jajników i podawano preparat estradiolu. W pierwszym przypadku ilość miejsc wiążących we frakcji błon maleje, w drugim wzrasta (56, 61). Dane te w odróżnieniu od poprzednich wskazują, że estrogeny i hormony tarczycy mogą zmieniać ilość miejsc wiążących w błonach. Szczegółowy mechanizm regulacji wydzielania tyreotropiny przez hormony tarczycy i estrogeny wymaga końcowego wyjaśnienia.

Aktywność cyklazy adenyłowej wykrywa się w tych subfrakcjach komórkowych komórek przysadki szczura, które wiążą tyreoliberynę (57). Po dodaniu ekstraktu z podwzgórza (62) lub tyreoliberyny (61) do mieszaniny inkubacyjnej zawierającej zawiesinę przysadek szczura zwiększa się ponad dwukrotnie ilość cyklicznego AMP w układzie. Ponadto biosynteza tyreotropiny wzrasta po dodaniu do układu teofiliny — inhibitora hydrolizy cyklicznego AMP lub po dodaniu dwubutyrylowej pochodnej cyklicznego AMP. Labrie i wsp. (63) wykazali, że również po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej aktynomycyny, dwubutyrylo cykliczny AMP stymuluje zarówno biosyntezę jak i wydzielanie białek syntetyzowanych przez część gruczołową przysadki mózgowej. Stymulacja przez cykliczny AMP biosyntezy białek i ich wydzielania zachodzi więc prawdopodobnie na poziomie translacji.

Powyższe dane wskazują na mechanizm działania tyreoliberyny zgodny z mechanizmem Sutherlanda (64) to jest poprzez układ błonowej cyklazy adenyłowej. Wyniki otrzymane przez niektórych autorów wskazują jednak na różnice w działaniu cyklicznego AMP na oba procesy: biosyntezy i wydzielania tyreotropiny (56, 65). Badając wydzielanie tyreotropiny do środowiska inkubacyjnego przez zawiesinę przysadek szczura

Sundberg i wsp. (65) stwierdzili, że ta sama ilość tyreotropiny pojawia się jeżeli przysadki stymuluje się tyreoliberyną jak i jej roztworem wzbogaconym w cykliczny AMP. Również po dodaniu do układu teofiliny lub enterotoksyny cholery poziom tyreoliberyny w środowisku inkubacyjnym nie ulega zmianie pomimo wzrostu poziomu cyklicznego AMP. Możliwe więc, że nie wszystkie efekty działania hormonu uwalniającego tyreotropinę są bezpośrednim wynikiem aktywacji cyklicznej adenylowej.

Po połączeniu się tyreoliberyny z receptorem błonowym jednocześnie ze zmianą metabolizmu w komórkach przysadki zachodzą zmiany morfologiczne. Komórki tyreotropowe i somatotropowe wzbogacają się w system błon szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego. Powiększają się mitochondria i zwiększa się ilość ziaren wydzieliny. Ziarna te często ułożone są obwodowo i można obserwować proces egzocytozy. Pod wpływem dwubutyrylowej pochodnej cyklicznego AMP w komórkach zachodzą zmiany podobnego typu, jednak w komórkach tyreotropowych są one mniej wyraźne niż po stymulacji tyreoliberyną (66). W obecności tyreoliberyny wzrasta wartość indeksu mitotycznego komórek przysadki (67).

V-2. Uwalnianie prolaktyny

W 1971 roku Tashjian i wsp. (68) stwierdzili wzrost wydzielania prolaktyny przez hodowle somatotropowych komórek nowotworowych przysadki (klony GH₃ i GH₁) po dodaniu tyreoliberyny do środowiska inkubacyjnego. Wykazano następnie (17), że również normalne komórki przysadek wyizolowane ze zdrowych zwierząt w odpowiedzi na dodaną tyreoliberynę zwiększają wydzielanie prolaktyny. Stymulacja komórek zdrowych jest jednak słabsza niż komórek nowotworowych.

Wzrost wydzielania prolaktyny w odpowiedzi na podaną tyreoliberynę stwierdzono również w warunkach *in vivo*. Tyreoliberyna podana dożylnie w ilości 10 μg już po 5 minutach powoduje wzrost stężenia prolaktyny w surowicy krwi. Zwiększenie dawki hormonu uwalniającego zwiększa przyrost ilości prolaktyny w surowicy. Ta stymulacja wydzielania prolaktyny jest silniejsza u kobiet niż u mężczyzn i w niektórych przypadkach u kobiet można zaobserwować efekt już po podaniu 3 μg tyreoliberyny (2, 69).

Tak szybki, bo obserwowany już po 5 minutach wzrost stężenia prolaktyny w surowicy krwi może być wyłącznie wynikiem zwiększonego uwalniania do krwi prolaktyny uprzednio zmagazynowanej w komórkach przysadki. Na podstawie zawartości prolaktyny w przysadce i jej przyrostu w surowicy Bowers i wsp. (2) wyliczyli, że po dłuższym czasie przyrost ten musi być wywołany również zwiększoną syntezą nowych cząsteczek hormonu. Wyniki doświadczeń prowadzonych w warunkach przyżyciowych wskazują więc na regulowanie przez tyreoliberynę zarówno procesu

biosyntezy jak i wydzielania prolaktyny. Doświadczenia z hodowlami komórek przysadki potwierdzają obie funkcje regulatorowe tyreoliberyny. D a n n i e s i T a s h j i a n (70) prowadzili hodowlę komórkową w środowisku ^3H -leucyny i badali ilość znakowanej prolaktyny wydzielonej do środowiska. Stwierdzili, że w hodowlach stymulowanych przez tyreoliberynę wydziela się do środowiska cztery razy więcej prolaktyny niż w hodowlach kontrolnych. Stymulacja wydzielania prolaktyny do środowiska w hodowli somatotropowych komórek nowotworowych (klon SD_1) nie jest hamowana przez cykloheksomid (71).

Powyższe dane z doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* wskazują na stymulację przez tyreoliberynę procesu uwalniania prolaktyny. Dowodem jej zwiększonej biosyntezy jest wzrost w obecności tyreoliberyny włączania ^{14}C -proliny do prolaktyny w hodowli komórek SD_1 (71) i ^3H -leucyny w hodowli komórek GH_3 (70). Wzrost włączania izotopu jest równoległy do wzrostu poziomu hormonu, zachodzi tu więc stymulacja biosyntezy, a nie hamowanie rozpadu prolaktyny (70).

Znakowana tyreoliberyna wiązana jest przez błony komórkowe uzyskane z komórek typu GH_3 (72, 73, 74). Ze wzrostem ilości znakowanego hormonu dodanego do zawiesiny komórek wzrasta ilość hormonu związanego przez komórki i równoległe wzrasta ilość wydzielanej prolaktyny. Tak więc odpowiedź biologiczna wynika bezpośrednio z przyłączenia tyreoliberyny do błonowych receptorów. Wyliczono, że jedna komórka wiąże do 130 000 cząsteczek tyreoliberyny. Inhibitorami wiązania hormonu są enzymy proteolityczne trypsyna i pronaza, fosfolipazy A i C oraz detergenty zarówno jonowe jak i niejonowe (73).

Przedstawione powyżej dane wskazują na podobieństwo receptorów wiążących tyreoliberynę w komórkach tyreotropowych i w komórkach wydzielających prolaktynę. W obu typach komórek są to receptory błonowe, wykazujące to samo powinowactwo do tyreoliberyny, a w wiązaniu hormonu biorą udział fosfolipidy. Dokładna charakterystyka białka receptorowego z komórek obu typów jest bardzo trudna, ponieważ receptory tracą zdolność wiązania tyreoliberyny w momencie przeprowadzania ich w formę rozpuszczalną z użyciem detergentów lub enzymów proteolitycznych. Podobnie jak w komórkach tyreotropowych, wiązanie tyreoliberyny przez komórki GH_3 powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP. Wzrost ten jest wyraźny już w 5 minut po dodaniu hormonu, może więc wyprzedzać jego efekt biologiczny, jakim jest wydzielanie prolaktyny. Wzrost stężenia cyklicznego AMP jest proporcjonalny do ilości tyreoliberyny dodanej do środowiska inkubacyjnego, a dwubutyrylowa pochodna cyklicznego AMP dodana do zawiesiny komórek zwiększa ilość wydzielanej prolaktyny (73). Powyższe wyniki wskazują na udział cyklazy adenylowej w przenoszeniu informacji zawartej w tyreoliberynie do wnętrza komórek GH_3 . Jednak nie jest ostatecznie wyjaśnione, czy hipotezę cyklicznego AMP jako przekaźnika informacji niesio-

nej przez hormon można zastosować do wszystkich zmian w komórkach wydzielających prolaktynę w odpowiedzi na działanie tyreoliberyny. Stwierdzono bowiem również, że w pewnych warunkach tyreoliberyna stymuluje wydzielanie prolaktyny mimo, że nie zachodzi wzrost poziomu cyklicznego AMP (73).

V-3. Uwalnianie hormonu wzrostu

Badania wpływu tyreoliberyny na wydzielanie hormonu wzrostu przez komórki somatotropowe przysadki dają kontrowersyjne wyniki. W doświadczeniach przeprowadzanych w warunkach *in vivo* stwierdzono, że tyreoliberyna nie wpływa lub wpływa stymulująco na wydzielanie hormonu wzrostu (73). Natomiast w doświadczeniach przeprowadzanych w warunkach *in vitro* wykazano (73, 75), że dodanie tyreoliberyny do płynu inkubacyjnego z zawiesiną komórek GH, powoduje ponad dwukrotne zmniejszenie produkcji hormonu wzrostu. Redukcja ta jest proporcjonalna do stężenia tyreoliberyny i stymulacji uwalniania prolaktyny. Jednocześnie wykazano, że cykliczny AMP nie wpływa na ten efekt ponieważ ilość hormonu wzrostu po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej dwubutyrylowej pochodnej cyklicznego AMP nie ulega zmianie.

Wpływ tyreoliberyny na wydzielanie hormonu wzrostu zależy od bezpośredniej kontroli ośrodkowego układu nerwowego. Stwierdzono bowiem, że szczury, którym usunięto przysadkę a następnie przeszczepiono ją do torebki nerkowej, a więc w warunkach, gdy usunięto wpływ ośrodkowego układu nerwowego na metabolizm przysadki — po dodaniu tyreoliberyny mają zwiększony poziom hormonu wzrostu we krwi. Natomiast szczury kontrolne w tych samych warunkach mają normalny poziom hormonu (76). Być może również i obserwowaną u człowieka w pewnych stanach patologicznych stymulację wydzielania hormonu wzrostu można wytłumaczyć brakiem kontroli działania przysadki przez ośrodkowy układ nerwowy.

V-4. Działanie tyreoliberyny na ośrodkowy układ nerwowy

W 1972 roku P r a n g e i wsp. (77) stwierdzili, że tyreoliberyna podana dożylnie w ilości 0,5mg wykazuje działanie antydepresyjne. Podobny wynik otrzymano u wielu pacjentów, zarówno kobiet jak i mężczyzn jednak nie przy wszystkich schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego (78, 79, 80). W warunkach laboratoryjnych działanie tyreoliberyny na ośrodkowy układ nerwowy bada się testem ruchowym. Polega on na badaniu ruchliwości myszy kontrolnych i myszy, którym podaje się kolejno: inhibitor oksydazy monoamin — pargylinę i stymulator: 3,4-dwuhydroksyfenyloalaninę (DOPA). Łączne podanie DOPA i tyreoliberyny bardziej zwiększa ruchliwość myszy niż podanie samej DOPA (81). Obserwowano, że efekt stymulujący tyreoliberyny występuje również u myszy pozbawionych

przysadki mózgowej lub pozbawionych tarczycy. Tak więc działanie tyreoliberyny na mózg jest niezależne od jej działania na układ podwzgórze—tarczyca. Czynnikiem hormonalnym, który reguluje działanie tyreoliberyny na mózg mogą być hormony płciowe i ewentualnie parathormon. Plotnikoff (82) stwierdził bowiem, że stymulacja testu ruchowego przez tyreoliberynę obniża się po usunięciu jajników, a podwyższa w wyniku kastracji lub usunięcia przytarczyc badanym myszom.

Powyższe wyniki wskazują na związek behawioralnego działania tyreoliberyny z metabolizmem katecholamin. Po dodaniu myszom tyreoliberyny w ilości wystarczającej do stymulacji w teście ruchowym nie obserwuje się jednak zmian w ilości dopaminy, noradrenaliny i serotoniny w mózgu (82). Szczegółowsze badania wykazały, że w warunkach tych jednak wzrasta poziom 3-metoksy-4-hydroksyfenyloglikolu, głównego mózgowego produktu katabolizmu noradrenaliny (83). Ponadto stwierdzono (84), że w móście mózgu szczurów, którym wstrzyknięto tyreoliberynę i ^3H -dopaminę wykrywa się mniej radioaktywnej dopaminy niż w móście mózgu zwierząt kontrolnych, którym podano tylko ^3H -dopaminę. To obniżenie poziomu znakowanej noradrenaliny może wynikać z jej przyspieszonego katabolizmu. Tyreoliberyna w doświadczeniach *in vitro* znacznie hamuje aktywność enzymu β -hydroksylazy dopaminy (84), a więc enzymu katalizującego biosyntezę noradrenaliny. Powyższe wyniki wskazują wyraźnie, że działanie tyreoliberyny na ośrodkowy układ nerwowy zachodzi poprzez regulację metabolizmu katecholamin przy czym szczegółowy mechanizm tych zmian wymaga dalszego wyjaśnienia (85). Nie wyjaśniono również dlaczego, pomimo obniżenia aktywności β -hydroksylazy dopaminy i jednocześnie zwiększonego katabolizmu noradrenaliny, w obecności tyreoliberyny ilość noradrenaliny w mózgu nie ulega zmianie.

VI. Analogi tyreoliberyny

Cząsteczka tyreoliberyny ma prostą budowę. Dzięki temu możliwe było, bezpośrednio po ustaleniu budowy natywnego hormonu otrzymanie go drogą syntezy chemicznej. Następnym etapem było zsyntetyzowanie cząsteczek hormonu zmodyfikowanych w określony sposób, to jest analogów tyreoliberyny. Do chwili obecnej zsyntetyzowano w wielu pracowniach kilkadziesiąt analogów, a badanie aktywności tych pochodnych pomaga odpowiedzieć na wiele pytań dotyczących mechanizmu działania hormonu. Ponadto badanie aktywności biologicznej analogów ma wyraźny aspekt praktyczny. Poszukiwane są analogi, które można by było stosować w testach diagnostycznych i w leczeniu schorzeń osi podwzgórzowo-przysadkowej a także chorób psychicznych. Tak więc poszukiwane są analogi o wyższej aktywności biologicznej niż hormon natywny oraz takie, które obniżają efekt biologiczny wywołany przez natywną tyreoliberynę.

Aktywność biologiczną analogów tyreoliberyny badano w warunkach *in vivo* mierząc poziom tyreoliberyny we krwi po dożylnym podaniu analogu. *In vitro* badano wypieranie tyreoliberyny z kompleksu z receptorem przez jej analog oraz stymulację wydzielania tyreotropiny lub prolaktyny do środowiska inkubacyjnego (21, 87). Rzadziej badano stymulację wydzielania tyreotropiny w układzie zawierającym zarówno tyreoliberynę jak i jej analog (88). Określono również reakcję krzyżową tyreoliberyny i jej analogów z przeciwciałem przeciwko tyreoliberynie (9, 89). Nie stosowano natomiast dotychczas analogów w badaniach behawioralnych.

Aktywności biologiczne analogów tyreoliberyny podali Vale i wsp. w swojej pracy przeglądowej (17).

Przebadane związki można podzielić na kilka grup:

a. dwupeptydy stanowiące część cząsteczki hormonu. Żaden z przebadanych dwupeptydów nie wykazuje aktywności hormonalnej (5);

b. stereoisomery optyczne. Jedynie pochodna L-D-L wykazuje aktywność biologiczną (86);

c. modyfikacja reszty N-końcowej. Dołączenie do pierścienia piroglutaminowego grupy metylowej tworzy pochodną o aktywności wynoszącej zaledwie 1,7 procent aktywności natywnego hormonu. Zastąpienie histydyny innymi aminokwasami daje analogi nieaktywne (17);

d. modyfikacja cząsteczki histydyny. Pochodna z grupą metylową w pozycji 3 pierścienia histydyny jest jedynym analogiem, którego aktywność biologiczna jest ośmiokrotnie wyższa niż aktywność natywnej tyreoliberyny. Natomiast dołączenie grupy metylowej w pozycji 1 tworzy analog nieaktywny (17, 87);

e. zmiany aminokwasu C-końcowego. Podstawienie zamiast pierścienia 5-cioczłonowego proliny analogu z pierścieniem 4-roczłonowym powoduje spadek aktywności do 1,6% aktywności. Zamiana zaś aminokwasu nawet z pozostawieniem reszty amidowej tworzy pochodne nieaktywne (17, 19, 87);

g. zmiana podstawnika przy grupie karboksylowej. Zastąpienie reszty amidowej resztą metylową pozostawia 10% aktywności. Również przedłużenie podstawnika przy grupie karboksylowej przez dołączenie reszty, na przykład etylowej pozostawia cząsteczce kilkanaście procent aktywności (17, 19, 87);

h. modyfikacja wiązania peptydowego. Dołączenie reszty metylowej do wiązania peptydowego pomiędzy resztą kwasu piroglutaminowego i histydyny nie zmienia aktywności hormonu (21);

i. niewielka zmiana budowy całej cząsteczki. Badanie tych analogów doprowadziło do wykrycia inhibitora tyreoliberyny. Stwierdzono, bowiem, że łączne podanie amidu cyklopentenylokarbonylo- β -2-tienylo-L-alanylopirolidyny z tyreoliberyną znosi stymulację wydzielania tyreotropiny (88).

Przeważająca większość pochodnych, których aktywność badano kilkoma metodami przejawia taką samą aktywność biologiczną *in vivo* jak i *in vitro*.

Również porównywalne jest działanie analogów tyreoliberyny w stymulacji obu regulowanych przez nią procesów, to jest wydzielania tyreotropiny i prolaktyny. Ponadto pochodne o niższej aktywności biologicznej są słabiej wiązane przez receptory błonowe jak również słabiej wiązane przez przeciwciało przeciwko tyreoliberynie (9, 17, 21, 87, 89). Jedynymi analogami o wyraźnie innej charakterystyce w badaniach *in vivo* i *in vitro* są analogi opisane przez Sievertssona i wsp. (22, 88). Ich struktura różni się od tyreoliberyny w ten sposób, że są rozpoznawane przez receptor, ale nie przekazują informacji o działaniu biologicznym.

Badania analogów wskazują, że aktywność biologiczna tyreoliberyny zależy od określonej konformacji całej cząsteczki hormonu. Aktywna cząsteczka ma charakter hydrofobowy dzięki obecności pierścienia aromatycznego (17). Jediną resztą, która prawdopodobnie nie bierze udziału w reakcji z receptorem jest grupa aminowa amidu proliny (Wzór I).

Od 1969 roku to jest od momentu ustalenia struktury tyreoliberyny uzyskano wiele wyników wyjaśniających metabolizm i działanie biologiczne tego hormonu. Tyreoliberyna jest obecnie powszechnie syntetyzowana na drodze chemicznej, a test TRF stał się standardową metodą diagnostyczną w endokrynologii. To szerokie zainteresowanie tyreoliberyną wynika z podstawowej funkcji regulatorowej jaką hormon ten pełni w organizmie człowieka. Uzyskane dane nie pozwalają jednak dotychczas stosować tyreoliberyny w terapii rutynowej. Tak więc dalsze badanie tyreoliberyny obok wartości poznawczych może przynieść wskazówki w jakich warunkach hormon lub jego analogi mogłyby znaleźć zastosowanie podczas leczenia chorób pionu podwzgórza—tarczyca i chorób umysłowych.

Artykuł nadszedł 18.8.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 8.9.1976

PISMIENICTWO

1. Green J. D., Harris G. W., (1947), *J. Endocrinol.*, **5**, 136—146.
2. Bowers C. Y., Friesen H. G., Hwang P., Guyda H. I., Folkers K., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1033—1041.
3. Knigge K. M., Joseph S. A., Silverman A. J., Vaala S., (1973), *Prog. Brain Res.*, **39**, 7—20.
4. Virkkunen P., (1974), *Acta Endocrinol.*, **75**, 452—460.
5. Guillemin R., Burgus R., Vale W., (1971), *Vitam. Horm.*, **29**, 1—39.
6. Joseph S. A., Scott D. E., Vaala S. S., Knigge K. M., Krobisch-Dudley G., (1973), *Acta Endocrinol.*, **74**, 215—225.
7. Grant G., Vale W., Guillemin R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 28—34.
8. Juneja H. S., Celotti F., Martini L., (1975), w *Hypothalamic Hormones*, str. 75—87, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.
9. Utiger R. D., Bassiri R. M., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic*

- Hormones, str. 146—153, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
10. Visser T. J., Docter R., Hennemann G., (1974), *Acta Endocrinol.*, **77**, 417—421.
 11. Saito S., Musa K., Yamamoto S., Oshima I., Funato T., (1975), *Endocrinol. Jap.*, **22**, 303—309.
 12. Schally A. V., Bowers C. Y., Redding T. W., Berret J. F., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 165—169.
 13. Schally A. V., Bowers C. Y., Redding T. W., (1966), *Endocrinology*, **78**, 726—732.
 14. Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Guillemin R., (1969), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **269**, 1870—1873.
 15. Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Ward D. N., Vale W., Guillemin R., (1970), *Nature*, **226**, 321—325.
 16. Nair R. M. G., Barret J. F., Bowers C. Y., Schally A. V., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1103—1106.
 17. Vale W., Grant G., Guillemin R., (1973), w *Frontiers in Neuroendocrinology*, str. 375—413, wyd. Ganong W. F., Martini L., University Press, Oxford New York.
 18. Gillesen D., Felix A. M., Lergier W., Studer R. O., (1970), *Helv. Chim. Acta*, **53**, 63—72.
 19. Bowers C. Y., Weil A., Chang J. K., Sievertsson H., Enzmann F., Folkers K., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 683—691.
 20. Grant G., Ling N., Rivier J., Vale W., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3070—3073.
 21. Donzel B., Goodman M., Rivier J., Ling N., Vale W., (1975), *Nature*, **256**, 750—751.
 22. Sievertsson H., Castensson S., Bowers C. Y., (1974), *FEBS Letters*, **42**, 340—342.
 23. Hatanaka Ch., Obayashi M., Nishimura O., Toukai N., Fujino M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1345—1350.
 24. Schally A. V., Arimura A., Debeljuk L., Redding T. W., Reeves J. J., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones*, str. 3—11, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
 25. Mc Kelvy J. F., (1975), *Anal. Biochem.*, **64**, 609—614.
 26. Birk J., Rothenbuchner G., Loos U., Raptis S., Fletcher S., Pfeiffer E. F., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones*, str. 141—145, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
 27. Winkour A., Utiger R. D., (1974), *Science*, **185**, 265—267.
 28. Jackson I. M. D., Reichlin S., (1974), *Life Sci.*, **14**, 2259—2266.
 29. Brownstein M. J., Palkovits M., Saavedra J. M., Bassiri R. M., Utiger R. D., (1974), *Science*, **185**, 267—269.
 30. Reichlin S., Mitnick M., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones*, str. 124—135, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
 31. Reichlin S., Mitnick M., (1973), w *Frontiers in Neuroendocrinology*, str. 61—88, red. Ganong W. F., Martini L., University Press, New York Oxford.
 32. Mc Kelvy J. F., (1974), *Brain Res.*, **65**, 489—502.
 33. Mc Kelvy J. F., Grimm-Jorgensen Y., (1975), w *Hypothalamic Hormones*, str. 13—25, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.
 34. Mc Kelvy J. F., Sheridan M., Joseph S., Phelps C. H., Perrie S., (1975), *Endocrinology*, **97**, 908—918.

35. Bennett G. W., Edwardson J. A., Holland D., Jeffcoate S. L., White N., (1975), *Nature* **257**, 323—325.
36. Knigge K. M., Joseph S. A., (1974), *Acta Endocrinol.*, **76**, 209—213.
37. Oliver C., Charvet J. P., Codaccioni J. L., Vague J., Porter J. C., (1974), *Lancet*, **1**, 873.
38. Oliver C., Ben-Jonathan N., Mical R. S., Porter J. C., (1975), *Endocrinology*, **97**, 1138—1143.
39. Eskay R. L., Oliver C., Ben-Jonathan N., Porter J. C., (1975), w *Hypothalamic Hormones*, str. 125—137, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.
40. Redding T. W., Schally A. V., (1972), *Neuroendocrinol.*, **9**, 250—256.
41. Eskay R. L., Oliver C., Warberg J., Porter J. C., (1976), *Endocrinology*, **98**, 269—277.
42. Bauer K., Sy J., Lipmann F., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, streszczenie 489.
43. Bauer K., (1974), w *Lipman Symposium: Energy, Regulation and Biosynthesis in Molecular Biology*, str. 53—62, red. Richter D., Walter de Gruyter, Berlin.
44. Montoya E., Jo Seibel M., Wilber J. F., (1975), *Endocrinology*, **96**, 1413—1418.
45. Bauer K., (1976), *Nature*, **259**, 591—593.
46. Martin J. B., Reichlin S., (1970), *Science*, **168**, 1366—1368.
47. Mittler J. C., Redding T. W., Schally A., (1969), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **130**, 406—409.
48. Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J., (1973), *Science* **179**, 341—350.
49. Gual C., (1973), w *Frontiers in Neuroendocrinology*, str. 89—131, red. Ganong W. F., Martini L., University Press, New York Oxford.
50. Shenkman L., Mitsuma T., Shopsin B., Hollander C. S., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones*, str. 338—347, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
51. Seif F. J., Klingler W., Zech K., Voelter W., (1975), *Experientia*, **31**, 992.
52. Wenzel K. W., Meinhold H., Schleusener H., (1975), *Acta Endocrinol.*, **80**, 42—48.
53. Brown M. R., Hedge G. H., (1974), *Endocrinology*, **95**, 1392—1394.
54. Thompson M. E., Hedge G. A., (1976), *Endocrinology*, **98**, 787—793.
55. Hall R., Besser G. M., (1975), w *Hypothalamic Hormones*, str. 299—302, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.
56. Wilber J. F., Seibel M. J., (1973), w *Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones*, str. 182—188, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
57. Poirier G., Labrie F., Barden N., Lemaire S., (1972), *FEBS Letters*, **20**, 283—286.
58. Stratmann I. E., Ezrin C., Sellers E. A., Simon G. T., (1972), *Endocrinology*, **90**, 728—734.
59. Barden N., Labrie F., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7601—7696.
60. Labrie F., Barden N., Poirier G., De Lean A., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 283—287.
61. Labrie F., Borgeat P., Ferland L., Lemay A., Dupont A., Lemaire S., Pelletier G., Barden N., Drouin J., De Lean A., Belanger A., Jolicoeur P., (1975), w *Hypothalamic Hormones*, str. 109—123, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.

62. Steiner A. L., Peake G. T., Utiger R. D., Karl I. E., Kipnis D. M., (1970), *Endocrinology*, **86**, 1354—1360.
63. Labrie F., Beraud G., Gauthier M., Lemay A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1902—1908.
64. Sutherland E. W., (1972), *Science*, **177**, 401—408.
65. Sundberg D. K., Fawcett C. P., Mccann S. M., (1976), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 149—154.
66. Pawlikowski M., Karasek M., Kunert-Radek J., (1975), *Endocrinologie*, **66**, 306—312.
67. Kunert-Radek J., (1974), *Endokrynol. Pol.*, **25**, 21—24.
68. Tashjian A. H., Barowsky N. J., Jensen O. K., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 516—523.
69. Bowers C. Y., Friesen H. G., Folkers K., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 512—521.
70. Dannies P. S., Tashjian A. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6174—6179.
71. Morin A., Tixier-Vidal A., Gourджи D., Kerdelhue B., Grousselle D., (1975), *Mol. Cell. Endocrinol.*, **3**, 351—373.
72. Hinkle P. M., Tashjian A. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6180—6186.
73. Hinkle P. M., Tashjian A. H., (1974), w Hormones and Cancer str. 203—227, red. McKerns K. W., Academic Press, New York London.
74. Hinkle P. M., Tashjian A. H., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3845—3851.
75. Hinkle P. M., Woroch E. L., Tashjian A. H., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 3085—3090.
76. Udeschini G., Cocchi D., Panerai A. E., Gil-ad I., Rossi G. L., Chiodini P. G., Luizzi A., Müller E. E., (1976), *Endocrinology*, **98**, 807—814.
77. Prange A. J., Wilson I. C., Lara P. P., Alltop L. B., Breese G. R., (1972), *Lancet*, **2**, 999—102.
78. Kastin A. J., Plotnikoff N. P., Hall R., Schally A. V., (1975), w Hypothalamic Hormones, str. 261—268, red. Motta M., Crosignani P. G., Martini L., Academic Press, London New York San Francisco.
79. Prange A. J., Wilson I. C., Breese G. R., Lipton M. A., (1975), *Prog. Brain Res.*, **42**, 1—9.
80. Bigelow L. B., Gillin J. C., Semal C., Wyatt R. J., (1975), *Lancet*, **2**, 869—870.
81. Plotnikoff N. P., Prange A. J., Breese G. R., Anderson M. S., Wilson I. C., (1972), *Science*, **178**, 417—418.
82. Plotnikoff N. P., (1975), *Prog. Brain Res.*, **42**, 11—23.
83. Keller H. H., Bartholini G., Pletscher A., (1974), *Nature*, **248**, 528—529.
84. Stolk J. M., Nisula B. C., (1975), *Prog. Brain Res.*, **42**, 47—56.
85. Horst W. D., Spirt N., (1974), *Life Sci.*, **15**, 1073—1082.
86. Puttkamer K., Klemm W., Gupta D., Zech K., Fuchs S., Voelter W., (1975), *J. Endocrin.*, **65**, 16P.
87. Burgus R., Monahan M., Rivier J., Vale W., Ling N., Grant G., Amoss M., Guillemin R., (1973), w Hypothalamic Hypophysiotropic Hormones, str. 12—19, red. Gual C., Rosemberg E., Excerpta Medica, Amsterdam.
88. Sievertsson H., Castensson S., Andersson K., Bjorhman S., Bowers C. Y., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1401—1407.
89. Bassiri R. M., Utiger R. D., (1972), *Endocrinology*, **90**, 722—727.

WITOLD FILIPOWICZ *)

Inicjacja translacji mRNA u organizmów eukariotycznych

Initiation of mRNA Translation in Eukaryotes

Spis treści

I. Eukariotyczny mRNA

I-1. Modyfikacja końca 5' eukariotycznego mRNA

I-2. Sekwencja poli(A) w mRNA

I-3. Połączenia mRNA z białkami

II. Inicjatorowy tRNA

III. Białkowe czynniki inicjujące i ich rola w powstawaniu kompleksu inicjującego

III-1. Powstawanie kompleksu inicjującego w obecności kodonu AUG

III-2. Powstawanie kompleksu inicjującego w obecności naturalnego mRNA

IV. Mechanizm rozpoznawania miejsca inicjującego w mRNA

IV-1. Rola zmodyfikowanego końca 5' mRNA

IV-2. Rola struktury mRNA w pobliżu kodonu inicjującego

Translacja informacyjnego RNA jest końcowym etapem w procesie ekspresji informacji genetycznej zawartej w sekwencji nukleotydów kwasów nukleinowych. Pierwszym a jednocześnie najbardziej złożonym eta-

*) Dr, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: HnRNA — heterogenny jądrowy kwas rybonukleinowy; mRNP — kompleksy rybonukleoproteidowe mRNA; tRNA^{fMet} i tRNA^{mMet} — transportujące RNA specyficzne dla metioniny, odpowiednio inicjatorowy i włączający metioninę w pozycje wewnątrz polipeptydów; poli(X, Y) — polirybonukleotydy zawierające zasady wyszczególnione w nawiasach; poli(A)(+) mRNA i poli(A)(-) mRNA — informacyjne RNA zawierające i nie zawierające sekwencji poli(A); wirus EMC — wirus zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (*encephalomyocarditis*); CPV — wirus cytoplazmatycznej poliedrozy owadów (z ang. *cytoplasmic polyhedrosis virus*); VSV — wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (*vesicular stomatitis virus*); STNV — satelitarny wirus nekrozy tytoniu (z ang. *satellite tobacco necrosis virus*); BMV — wirus mozaiki stokłosa (z ang. *brome mosaic virus*); TMV — wirus mozaiki tytoniowej (z ang. *tobacco mosaic virus*).

Skróty używane przez różnych autorów dla oznaczenia eukariotycznych czynników inicjujących: IF-M1, IF-M2 itd. — z ang. *initiation factor — mammalian*; IF-E1, IF-E2, itd. — z ang. *initiation factor — eukaryotic*; EIF-1 itd. — z ang. *eukaryotic initiation factor*.

pem translacji jest inicjacja biosyntezy polipeptydu. Etap ten decyduje o prawidłowym odczycaniu informacji zawartej w mRNA. Na poziomie inicjacji działa również większość znanych mechanizmów regulujących wydajność translacji różnych mRNA lub różnych cistronów obecnych w jednej cząsteczce policistronowego mRNA (1).

Tak u prokariotów jak i u eukariotów inicjacja biosyntezy białka przebiega w dwóch zasadniczych etapach. Najpierw powstaje kompleks inicjujący składający się z inicjatorowego tRNA, mniejszej podjednostki rybosomowej (30S u prokariotów, 40S u eukariotów) oraz mRNA. Do tego kompleksu przyłącza się następnie większa podjednostka rybosomowa (50S u prokariotów, 60S u eukariotów) i powstaje kompleks inicjujący 70S w przypadku prokariotów lub 80S w przypadku eukariotów. W reakcji powstawania kompleksu inicjującego uczestniczy cały szereg białkowych czynników (faktorów) inicjujących, GTP oraz — w przypadku eukariotów — ATP (2, 3, 4). Do kompleksu 70S (80S) przyłączyć się może aminoacylo-tRNA. Powstanie pierwszego wiązania peptydowego rozpoczyna etap wydłużania (elongacji) nowo powstającego łańcucha polipeptydowego.

Mechanizm inicjacji translacji informacyjnego RNA u bakterii został dość dokładnie poznany. Problemowi temu poświęcony jest cały szereg artykułów przeglądowych (2, 4, 5—9). Chociaż w ogólnym zarysie przebieg inicjacji u prokariotów i eukariotów wygląda podobnie, to wyniki dotychczasowych badań świadczą o tym, że proces ten w komórkach organizmów wyższych jest o wiele bardziej skomplikowany (2—4, 10, 11). Wskazuje na to, na przykład, porównanie składu białkowego prokariotycznego i eukariotycznego rybosomu — organellum komórkowego uczestniczącego w biosyntezie białka. Podczas gdy bakteryjne podjednostki rybosomowe 30S i 50S zawierają odpowiednio 21 i 34 białka (12, 13), to podjednostki rybosomowe 40S i 60S *Eukariota* posiadają ich odpowiednio 32 i 39 (13, 14). Inicjacja translacji u eukariotów zawiera również wiele elementów zupełnie nieznanymi u bakterii. Należą do nich m.in.: udział ATP w inicjacji (3), modyfikacja końca 5' w mRNA (15), istnienie dużej ilości czynników białkowych — w tym czynnika EIF-3 o bardzo złożonej budowie — potrzebnych dla przyłączenia mRNA do rybosomu (3, 10).

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w badaniach nad inicjacją translacji mRNA eukariotów. Między innymi: 1). Oczyszczono i scharakteryzowano wiele informacyjnych RNA, tak komórkowych jak i wirusowych. Na końcach 5' i 3' mRNA eukariotów stwierdzono obecność struktur nie występujących w informacyjnych RNA bakterii; 2). Wyizolowano szereg białkowych czynników inicjujących i poznano ich rolę w tworzeniu się kompleksu inicjującego 80S; 3). Wyjaśniono niektóre problemy związane z rozpoznawaniem sekwencji inicjującej mRNA przez rybosomy. Wspomniane wyżej trzy zagadnienia są głównym przedmiotem tego artykułu.

Istotne znaczenie miało również opracowanie aktywnych bezkomórkowych układów biosyntezy białka. Szczególnie przydatne w badaniach inicjacji u eukariontów okazały się systemy z retikulocytów królika (16, 17), z zarodków pszenicy (16, 18), z komórek raków wysiękowych myszy (16, 17) oraz układ łączący składniki pochodzące z różnych organizmów opisany przez Schreiera i Staehelina (19). Opracowano również układy bezkomórkowe z komórek ludzkich HeLa oraz z mysich komórek L (16, 17), ze skorupiaka *Artemia salina* (20) oraz szereg innych (16, 17).

Artykuł ten omawia jedynie problemy dotyczące inicjacji biosyntezy białek w cytoplazmie komórek. Translację mRNA w mitochondriach i chloroplastach, posiadającą wiele cech wspólnych z biosyntezą białek prokariotów, omawiają inne prace przeglądowe (21, 22).

I. Eukariotyczny mRNA

Istnieje szereg podstawowych różnic zarówno w strukturze jak i funkcjonowaniu mRNA prokariotów i eukariotów. Wszystkie poznane mRNA prokariotów to mRNA policistronowe, czyli zawierające informację wystarczającą dla syntezy kilku polipeptydów. Inicjacja syntezy tych polipeptydów odbywa się w różnych miejscach na nici jednej cząsteczki mRNA (1, 23, 24). Wszystkie poznane dotychczas komórkowe mRNA eukariotów należą do klasy monocistronowych mRNA. Posiadają one informację wystarczającą dla syntezy tylko jednego polipeptydu (1, 25—27). W przypadku niektórych mRNA wirusowych (np. RNA wirusów Polio, Mengo i EMC) kodowany przez nie natywny polipeptyd jest bardzo długi i ulega wtórnej fragmentacji na kilka różnych aktywnych biologicznie białek (16, 28—32). Tak więc, choć RNA tych wirusów programują syntezę wielu białek to zawierają one, podobnie jak komórkowe informacyjne RNA, tylko jedno miejsce inicjujące, w którym rozpocząć się może synteza polipeptydu.

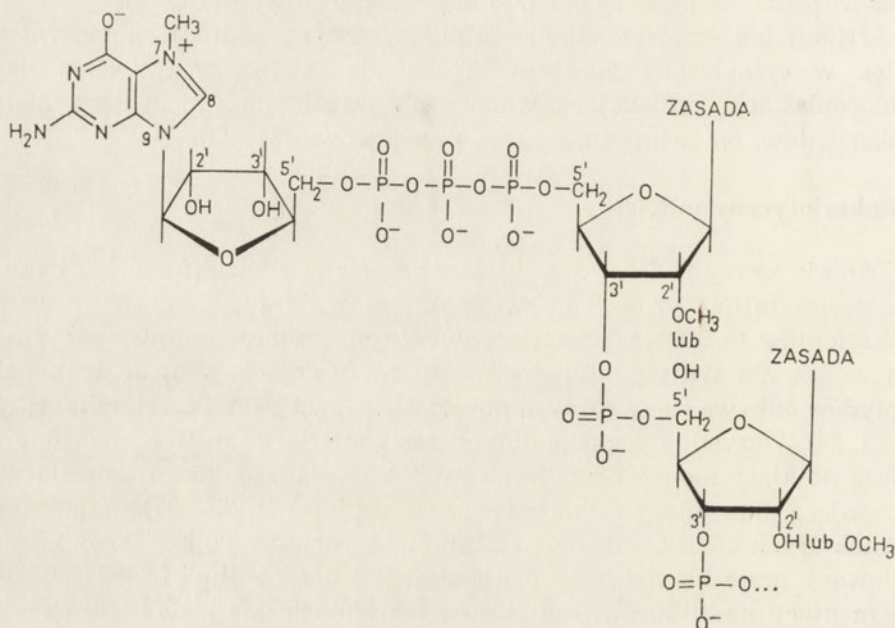
W przeciwieństwie do mRNA prokariotów, które mają okres półtrwania ($T_{1/2}$) rzędu kilku minut (2, 33—35), mRNA eukariotów jest bardzo stabilny. Stwierdzono np., że w komórkach HeLa okres półtrwania, zależnie od klasy mRNA, wynosi 7 lub 24 godz. (36). Okres półtrwania 1 dzień lub dłuższy cechuje globinowy mRNA w retikulocytach królika (37, 38) oraz owoalbuminowy mRNA w jajowodach kury (39, 40).

Dalsze cechy charakteryzujące informacyjne RNA u eukariotów to, omówione poniżej: obecność zablokowanego, zmetylowanego końca 5', poliadenylacja końca 3' oraz występowanie mRNA w połączeniach z białkami.

I-1. Modyfikacja końca 5' eukariotycznego mRNA

W 1974 r. Perry i Kelley (41) oraz Desrosiers i wsp. (42) stwierdzili, że mRNA z mysich komórek L oraz z hepatomy szczura zawiera zmetylowane nukleozydy. W następnym roku jednocześnie w labo-

ratoriach Miury i Furuichi (43, 44), Shatkina (45) oraz Mossa (46) wykryto, że syntetyzowane *in vitro* mRNA wirusów Reo, Vaccinia, CPV i VSV zawierają zablokowany, zmetylowany koniec 5' o strukturze $m^7G/5'/ppp/5'/N$, gdzie N oznacza nukleozyd lub 2'-0-metylonukleozyd. Podobną strukturę końca 5' RNA stwierdzono następnie w wielu innych tak wirusowych jak i komórkowych mRNA eukariontów (15, 47). Budowę zablokowanego, metylowanego końca 5' w mRNA przedstawia schemat 1.



Schemat 1. Struktura 5'-końcowego $m^7GpppN^{(m)}pN^{(m)}p$.

Następujące cechy stanowią o wyjątkowości 5'-końcowego fragmentu mRNA:

- końcowym blokującym nukleozydem jest zawsze 7-metyloguanozyna (m^7G). Jest ona dołączona do reszty cząsteczki RNA poprzez 5' hydroksyl rybozy. Powoduje to, że tak zwany koniec „5'” mRNA zawiera wolną niezestryfikowaną grupę 3'—OH w końcowej rybozie. Faktycznie cząsteczka zablokowanego mRNA ma więc dwa końce z wolnymi grupami hydroksylowymi 2' i 3' w pozycjach *cis*.
- końcowa 7-metyloguanozyna łączy się mostkiem trójfosforanowym, wiązaniem 5'—5' z następnym nukleozydem łańcucha RNA. Ujemny ładunek fosforanów neutralizuje częściowo dodatni ładunek 7-metyloguanozyny.
- sąsiadujące z 7-metyloguanozyną nukleozydy (pierwszy lub pierwszy i drugi) również mogą być zmetylowane, najczęściej w pozycji 2' rybozy. Przedostatnim nukleozydem od końca 5' w niektórych komórkowych i wirusowych mRNA jest również N⁶,2'-0-dwumetyloadenozyna.

Wszystkie przebadane dotychczas komórkowe mRNA różnych *Eukariota* posiadają zablokowany, zmetylowany koniec 5' (Tabela 1). Dotyczy to zarówno mRNA prymitywnych eukariontów jak drożdże i *Dictyostelium discoideum*, jak i wyższych jak ptaki i ssaki. Zablokowany koniec 5' zawierają również specyficzne mRNA wszystkich przebadanych dotychczas wirusów zawierających DNA oraz większości zwierzęcych i roślinnych wirusów zawierających RNA (Tabela 1). Jedynymi wirusami, których RNA

Tabela 1

Komórkowe i wirusowe mRNA zawierające 5'-końcówką sekwencję m⁷GpppN

Rodzaj mRNA	N	Piśmiennictwo
A. Komórkowe mRNA		
(rodzaj komórek)		
Ludzkie, linia HeLa	A ^m , mA ^m , G ^m , C ^m , U ^m	57, 58, 67
Małpie, linia BSC-1	A ^m , mA ^m , G ^m , C ^m , U ^m	59
Ciełca soczewka oka (krystalinowy mRNA)	?	60
Retikulocyty królika	?	61
Chomicze, linia BHK-21	A ^m , mA ^m , G ^m , C ^m , U ^m	62, 63
Mysie, linia L lub myeloma	A ^m , mA ^m , G ^m , C ^m , U ^m	64—66, 68
Szczurza hepatoma	A ^m , G ^m , C ^m , U ^m	69
Kacze erytroblasty (globinowy mRNA)	?	70
<i>Bombyx mori</i> (jedwabnik) (fibroinowy mRNA)	A ^m	71
<i>Artemia salina</i>	?	72
<i>Dictyostelium discoideum</i>	A, G, A ^m	73
Drożdże	?	251
B. Wirusowe mRNA		
DNA wirusy:		
SV 40	A ^m , mA ^m , G ^m	59
Adeno, typ 2	A ^m , mA ^m	53, 65
Vaccinia	A ^m , G ^m	43, 46
RNA wirusy:		
Sindbis	A	74
VSV	A ^m , mA ^m	63, 75
Reo	G ^m	45
CPV	A ^m	44
Mięsaka Rousa (RSV)	G ^m	76
Mięsaka ptasiego (ASV-B77)	G ^m	77
Mozaiki lucerny (AMV)	G	78
Mozaiki tytoniu (TMV)	G	79, 80
Mozaiki stokłosa (BMV)	G	81

nie posiadają zmetylowanego końca 5' są zwierzęce RNA-wirusy grupy Picorna (wirusy Polio, EMC i Mengo) (48—50) oraz roślinny wirus STNV (51, 52). W przypadku wirusa Polio stwierdzono, że zarówno RNA izolowany z oczyszczonego wirusa, jak również specyficzny wirusowy mRNA

izolowany z funkcjonujących w zakażonych komórkach polisomów nie mają końcowej 7-metyloguanozyny (48, 49).

Stwierdzono, że również heterogeny jądrowy RNA (HnRNA) izolowany z jąder komórek HeLa lub L zawiera zablokowany zmetylowany koniec 5' (53—55). Grupa Buscha jeszcze przed wykryciem zablokowanego końca 5' w mRNA wykazała obecność struktury $m_3^{2,2,7}G/5'/pp/5'/N$ na końcu 5' niektórych niskocząsteczkowych RNA izolowanych z jąder komórek hepatomy Novikoffa (56).

Poza obecnością grup metylowych na końcu 5' cząsteczki eukariotycznego mRNA stwierdzono również występowanie zmetylowanych nukleozydów, głównie N⁶-metyloadenozyny, wewnątrz łańcuchów mRNA (42, 54, 57, 66—69). W przypadku mRNA z komórek HeLa ustalono, że jedna cząsteczka mRNA zawiera średnio 2—3 N⁶-metyloadenozyny i że występują one zawsze w sekwencji .. (G lub A)pmApC.. wewnątrz łańcucha RNA (67). Nie wiadomo czy metyloadenozyny występują w odcinkach mRNA tłumaczonych w procesie translacji, czy też we fragmentach mRNA nie niosących informacji genetycznej. Istnieją mRNA, jak globinowy mRNA kaczki, mRNA z *Dictyostelium discoideum*, oraz niektóre mRNA wirusowe, które nie zawierają wewnątrzłańcuchowych metylonukleozydów (15, 70, 73). Ostatnio doniesiono, że zawierające poli(A) mRNA izolowane z mitochondriów chemicznych komórek BHK-21 prawdopodobnie nie są zmetylowane. Wydaje się, że nie posiadają one ani zmetylowanego końca 5', ani nie zawierają metyloowanych nukleozydów wewnątrz łańcucha mRNA (86).

Modyfikacja końca 5' mRNA odbywa się po rozpoczęciu lub nawet po ukończeniu transkrypcji (15). Niewiele wiadomo o biogenezie końca 5' komórkowych informacyjnych RNA. Wyjaśniono natomiast mechanizm dołączania guanozyny i metylacji 5'-końcowych nukleozydów dla mRNA wirusów Reo, Vaccinia i VSV (15, 82—85). Modyfikację tych mRNA katalizują enzymy będące składnikami oczyszczonych cząstek wirusowych. Ponieważ wiriony Reo, Vaccinia i VSV zawierają również polimerazę RNA, stanowią one prosty, naturalnie oczyszczony układ, umożliwiający badanie syntezy i modyfikacji mRNA *in vitro* (15, 82—85). W przypadku syntezy mRNA wirusów Reo i Vaccinia stwierdzono, że specyficzna fosfohydrolaza odcina najpierw γ -fosforan z 5'-końcowego trójfosfonukleozydu w nowosyntetyzowanym RNA. Do końca cząsteczki RNA, ppNpN..., dołączony zostaje następnie GMP. Jego donorem jest GTP, a reakcję katalizuje enzym guanylotransferaza, zwana także enzymem blokującym (ang. *capping enzyme*). Zablokowany koniec mRNA o strukturze GpppGpNp... jest następnie metylowany przez dwie różne transferazy, kolejno w pozycjach N⁷ guanozyny oraz 2' rybozy drugiego nukleozydu (82—84). Donorem grup metylowych w tych reakcjach jest S-adenozylometionina. Dodając do mieszaniny reakcyjnej jej analog, S-adenozylhomocysteinę, będącą inhibitorem metylacji, można otrzymać niezmetylowane RNA

o strukturze 5' końca GpppN... lub (p)ppN... (15, 82). Informacyjne RNA tego typu są bardzo przydatne w badaniach roli zmienionego końca 5' w translacji (patrz rozdział IV). Enzymy uczestniczące w modyfikacji mRNA wyizolowano ostatnio z cząstek wirusa Vaccinia (83, 84).

I-2. Sekwencja poli(A) w mRNA

Większość poznanych mRNA organizmów eukariotycznych zawiera sekwencję poli(A) przyłączoną kowalencyjnie do końca 3' mRNA (87—91). Również heterogenny jądrowy RNA (HnRNA) uważany za prekursora cytoplazmatycznego mRNA, zawiera poli(A). (92, 93). Sekwencje poli(A) znajdujące się na końcu 3' w HnRNA lub mRNA nie są kodowane przez DNA komórki; są one dołączane do łańcuchów RNA po ukończeniu transkrypcji. Proces ten odbywać się może zarówno w jądrze (92) jak i cytoplazmie komórki (94—96). Długość sekwencji poli(A) komórkowych mRNA waha się od 50 nukleotydów u niższych eukariontów jak drożdże (97) do około 150—200 w mRNA ssaków (98, 99). mRNA pleśni *Dictyostelium discoideum* zawiera dwa typy sekwencji poli(A) (100). Jedna z nich o długości około 25 nukleotydów kodowana jest przez DNA, druga o długości około 100 nukleotydów dodawana jest do końca 3' mRNA po ukończeniu transkrypcji, podobnie jak w innych organizmach. Te segmenty poli(A) oddziela od siebie odcinek 10—40 nukleotydów. Wirusowe RNA pełniące po zakażeniu komórki rolę mRNA kodujących białka wirusowe, jak również specyficzne wirusowe mRNA syntetyzowane w komórkach po zainfekowaniu ich różnymi wirusami, również posiadają sekwencje poli(A) (81, 101, 102). Przegląd komórkowych i wirusowych mRNA, w których wykazano obecność poli(A) przedstawiony jest w pracy Greenberga (103), oraz w artykule Brysch w *Postęпах Biochemii* (104).

Do niedawna przyjmowano, że jedynymi informacyjnymi RNA nie posiadającymi sekwencji poli(A) są mRNA kodujące histony (105) oraz białka reowirusa (106). Ostatnio Milcarek i wsp. (107) oraz Nemer i wsp. (108) wykazali jednak, że w komórkach zarodków jeżowca morskiego oraz w komórkach HeLa około 30—40% komórkowego mRNA, różnego od histonowych mRNA, nie zawiera segmentu poli(A). Wyniki badań hybrydyzacji poli(A)(+) i poli(A)(-) mRNA z DNA komplementarnym do poli(A)(+) mRNA świadczą o tym, że obie klasy mRNA posiadają różne sekwencje nukleotydowe (107, 108). Stwierdzono również, że aż 70% aktywnego w układzie *in vitro* mRNA skorupiaka *Artemia salina* nie zawiera poli(A) (109). Ostatnio doniesiono, że również u *Escherichia coli* około 30% szybko znakującego się RNA o cechach mRNA zawiera sekwencje poli(A) o długości 25—30 nukleotydów (110). Stwierdzono ponadto, że mRNA izolowany z mitochondriów drożdży, owadów i ssaków posiada krótkie sekwencje poli(A) (111, 112).

Istnieją sugestie, że poli(A) odgrywa rolę w przekształcaniu hetero-

gennego jądrowego RNA (HnRNA) w mRNA oraz w transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy (92, 103, 113). Nie wyjaśniono jednak dotąd w pełni roli jaką pełni fragment poli(A) w translacji mRNA. Globinowy mRNA, któremu metodami enzymatycznymi usunięto segment poli(A) jest nadal aktywną matrycą zarówno w układach bezkomórkowych z wątroby szczura, komórek raka wysiękowego Krebsa i zarodków pszenicy (114, 115) jak i po wstrzyknięciu do oocytu ropuchy *Xenopus laevis* (116). Obecność segmentu poli(A) może jednak wpływać na stabilność mRNA. Huez i wsp. (116) stwierdzili, że globinowy mRNA nie zawierający poli(A) wstrzyknięty do oocytu *Xenopus laevis* krócej zachowuje aktywność w stymulowaniu syntezy globiny niż poliadenylowany mRNA. Autorzy ci przebadali następnie stabilność preparatów globinowego mRNA, zawierających odcinki poli(A) o różnej długości. Okazało się, że mRNA zawierający 30 nukleotydowy segment poli(A) jest odporny na degradację na równi z natywnym mRNA posiadającym segment poli(A) o długości około 150 nukleotydów. Dalsze skracanie segmentu poli(A) obniżało drastycznie stabilność mRNA w oocytach *Xenopus laevis* (117). Obecność poli(A) może zwiększać stabilność mRNA poprzez hamowanie aktywności rybonukleaz w komórce (118). Stwierdzono, że długość 3'-końcowego odcinka poli(A) zmniejsza się w miarę „starzenia się” mRNA w komórce (98, 119, 120). Zjawisko to może mieć związek z opisanymi powyżej zmianami w stabilności mRNA w zależności od długości segmentu poli(A). Być może w komórce istnieją mechanizmy regulujące szybkość trawienia poli(A) związanego z mRNA. Za tą możliwością przemawia doniesienie o wyizolowaniu z popłuczyn rybosomów nadnerczy świnki morskiej inhibitora hamującego degradację poli(A) (121).

Badając zawartość poli(A)(+) i poli(A)(-) mRNA w różnych klasach polisomów jeżowca morskiego, Nemer i wsp. (122) stwierdzili, że poliadenylowany mRNA jest silniej wysycony rybosomami niż mRNA nie zawierający poli(A). Świadczyć to może o tym, że inicjacja syntezy białek na poli(A)(-) mRNA odbywa się mniej wydajnie niż na mRNA poliadenylowanym. Do podobnego wniosku doszli Doel i Carey (123) badając translację natywnego i deadenylowego owoalbuminowego mRNA w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika. Autorzy ci nie dostrzegli jednakże różnicy w aktywności obu preparatów mRNA w układzie z zarodków pszenicy, który jest znacznie mniej aktywnym systemem bezkomórkowym niż układ z retikulocytów (1, 16). Tak więc, dla właściwej oceny efektu poli(A) na proces translacji istotne jest stosowanie systemu bezkomórkowego, w którym inicjacja syntezy polipeptydów odbywa się z wydajnością zbliżoną do wydajności tego procesu w całych komórkach. Niedawno stwierdzono, że mRNA obecny w jajach jeżowca morskiego jest dodatkowo poliadenylowany po zapłodnieniu jaja (95, 96, 124). Poliadenylacji ulega prawdopodobnie również część mRNA obecnego w kryptobiotycznych cystach skorupiaka *Artemia salina*, w okresie gdy dochodzi do

dalszego rozwoju jaja (109). Znaczenie tego procesu nie jest znane. Poliadenylicacja mRNA nie wpływa prawdopodobnie na poziom syntezy białka w rozwijających się zarodkach ponieważ kordycepina (3'-dezoksyadenozyna), hamująca dołączanie poli(A) do mRNA, nie hamuje biosyntezy białek (125, 126).

Obecność segmentu poli(A) ułatwiła znacznie identyfikację i izolację czystych preparatów mRNA dzięki zastosowaniu do jego oczyszczania różnych rodzajów chromatografii powinowactwa, m.in. chromatografii na oligo(dT)-celulozie i poli(U)-Sephariozie (87, 104, 113, 127—129).

Problem sekwencji poli(A) w mRNA omawiają obszernie inne prace przeglądowe (92, 103, 104, 113).

I-3. Połączenia mRNA z białkami

Cytoplazmatyczny mRNA nie związany z rybosomami, jak również mRNA uwolniony z polisomów działaniem albo EDTA (130), albo puromycyny i wysokiego stężenia soli (131), połączony jest z białkami (103, 113, 132—134). Kompleksy mRNA z białkami — zwane informosomami lub cząstkami rybonukleoproteidowymi mRNP (z ang. *messenger ribonucleoprotein particles*) — opisali po raz pierwszy Spirin i wsp. (133, 135) u zarodków ryby *Misgurnus fossilis*. Najlepiej scharakteryzowane zostały dotychczas polisomalne mRNP z retikulocytów królika i kaczki, zawierające globinowy mRNA (131, 136, 137). Są to cząstki o stałej sedimentacji około 14—15S i łatwo jej oczyścić i oddzielić od podjednostek rybosomowych i wolnych białek metodą wirowania w gradiencie sacharozy. Blobel (131) wykazał, że globinowy mRNP z retikulocytów królika, podobnie jak mRNP izolowane z polisomów mysich komórek L oraz hepatocytów szczura, zawierają głównie dwa białka o masach cząsteczkowych 78 000 i 52 000. Inni autorzy stwierdzili występowanie białek o identycznych lub zbliżonych ciężarach cząsteczkowych w polisomalnych mRNP ludzkich rakowych komórek KB (138) i HeLa (139, 140), raka wysiękowego Ehrlicha (141), mózgu zarodka kurczęcia (142) oraz w mRNP zawierających mRNA kodujące krystaliny soczewki oka (143). Białka takie stwierdzono również w izolowanym z retikulocytów królika wolnym, nie związanym z polisomami globinowym mRNP (144). Blobel (145) oraz Brawerman i Kwan (146) stwierdzili, że jedno z białek występujących w mRNP — to o masie cząsteczkowej 78 000 — przyłączone jest specyficznie do sekwencji poli(A) w mRNA. Oprócz dwóch głównych białek, w większości omawianych powyżej preparatów mRNP znajdowano również inne białka występujące jednak w mniejszych ilościach. Nie rozstrzygnięto jeszcze czy połączenia mRNA z białkami występują *in vivo*, czy też są one tylko artektami powstającymi podczas izolacji (147). Niewielka ilość białek związanych z mRNP, jak również stabilność tych kompleksów w obecności stosunkowo wysokich stężeń soli (138) przemawiają za ich specyficznością.

Istnieją różnice w poglądach dotyczących funkcji białek związanych z mRNA. Nie ustalono również ostatecznie czy białka te są potrzebne do translacji mRNA. Cashion i Stanley (148) wykazali, że w częściowo oczyszczonym układzie bezkomórkowym z retikulocytów kompleks inicjujący 80S wydajniej tworzy się w obecności globinowego mRNP niż w obecności odbiałczonego globinowego mRNA. Badania innych autorów sugerują, że wśród białek związanych z mRNA obecne są czynniki inicjujące potrzebne do translacji mRNA (130, 149). Ostatnio stwierdzono, że z globinowym mRNP z retikulocytów królika związany jest czynnik inicjujący IF—MP oraz, że związane z mRNA białko o masie cząsteczkowej 52 000 może odpowiadać jednej z podjednostek tego czynnika (150). Z drugiej strony wiadomo jednak, że w układach bezkomórkowych globinowy (151, 156) lub krystalinowy (143) mRNP stymulują syntezę białek z tą samą wydajnością co odpowiednie odbiałczone mRNA. Choć wyniki te przemawiają przeciwko udziałowi białek związanych z mRNP w procesie translacji, to nie eliminują one tej możliwości ostatecznie. Używane we wspomnianych wyżej doświadczeniach układy bezkomórkowe zawierają bowiem mogą w swoim składzie białka potrzebne do odtworzenia funkcjonalnych kompleksów mRNP.

Istnieją również sugestie, że połączenia mRNA z białkami obecne w cytoplazmie komórek są formą przechowywania tych informacyjnych RNA, których translacja ma nastąpić z pewnym opóźnieniem w stosunku do czasu ich syntezy (133—135, 153). Dotyczy to w szczególności mRNA obecnych w nie zapłodnionych komórkach jajowych różnych organizmów lub w nasionach roślin (133, 134, 152, 154, 155). Wiadomo, że takie mRNA powstają w czasie oogenezy i są wykorzystywane dopiero w początkowych stadiach rozwoju zarodków. Białka związane z RNA miałyby zapobiegać przedwczesnej translacji mRNA oraz, być może, jednocześnie chronić go przed działaniem komórkowych rybonukleaz (133, 135, 153). Problem ten omówiony jest obszernie w artykule J a c h y m c z y k a w *Postęпах Biochemii* (134).

II. Inicjatorowy tRNA

W cytoplazmie komórek organizmów wyższych znajdują się dwa typy tRNA specyficznego dla metioniny (157—160). Jeden z nich, metionyl-tRNA_f^{Met}, pełni rolę inicjatorowego tRNA (161—163). W odróżnieniu od prokariotów gdzie inicjatorowym tRNA jest N-formylometionyl-tRNA_f^{Met} (2, 71), jego odpowiednik w komórkach eukariotów nie zawiera zablokowanej grupy aminowej metioniny. Przyczyną tego jest brak odpowiedniej transformylazy w cytoplazmie komórek organizmów wyższych (157). *In vitro*, w obecności transformylazy z *Escherichia coli* oraz donora reszty formylowej, inicjatorowy Met-tRNA_f większości eukariotów ulega jednak formylacji; nie formylują się w tych warunkach jedynie Met-tRNA_f,

z wyższych roślin (164—168) oraz skorupiaka *Artemia salina* (169). Taki „niefizjologiczny” eukariotyczny N-formylometionyl-tRNA_f może również inicjować, choć mniej wydajnie, syntezę łańcucha polipeptydowego w układach bezkomórkowych z organizmów wyższych (28, 29, 158, 170—172).

W cytoplazmie komórek eukariontów występuje również Met-tRNA_m^{Met} odpowiedzialny za wbudowywanie metioniny w pozycjach wewnątrz łańcuchów polipeptydowych (158, 161, 163). Obydwa typy Met-tRNA rozpoznają kodon AUG, który podobnie jak u prokariotów, jest zarówno kodonem inicjującym jak i kodonem dla wewnątrzłańcuchowej metioniny (158, 162, 163). Wyniki badań *in vitro* wskazują, że kodon GUG może być kodonem inicjującym również u eukariontów (162).

Różnice w strukturze między Met-tRNA_f i Met-tRNA_m decydują o ich właściwym wykorzystaniu w translacji. Met-tRNA_f rozpoznawany jest przez białkowe czynniki inicjujące i przenoszony do miejsca inicjatorowego (P) na rybosomie (4, 10). Faktor elongacyjny EF—I oddziałuje z Met-tRNA_m i przenosi go do miejsca akceptorowego (A) rybosomu (10, 167). Badania sekwencji nukleotydu inicjatorowego tRNA różnych ssaków włącznie z człowiekiem (174—176), łososia (177), drożdży (173), oraz zarodków pszenicy (178) wykazały, że zamiast sekwencji GTΨC obecnej w pętli IV (według modelu liścia koniczyny) wszystkich innych tRNA biorących udział w syntezie białka, zawiera on sekwencję GAUC lub GAU*C (179—183). U prokariotów (*Escherichia coli*, sinica *Anacystis nidulans*, *Mycoplasma mycoides*) cechą odróżniającą inicjatorowy tRNA_f^{Met} od innych tRNA jest brak komplementacji siłami wiązań wodorowych między pierwszym nukleotydem od końca 5' i piątym nukleotydem od końca 3' w ramieniu akceptorowym (aminokwasowym) tRNA (183—186). Zablockowanie grupy NH₂ metioniny grupą formylową w inicjatorowym tRNA prokariotów dodatkowo uniemożliwia jego udział w elongacji.

Ze względów praktycznych interesujące jest spostrzeżenie, że metionylowa aminoacylo-tRNA syntetaza z *Escherichia coli* może acylować eukariotyczny inicjatorowy tRNA_f^{Met}, nie przenosi natomiast reszty metionylowej na eukariotyczny tRNA_m^{Met} (187). Jedynym wyjątkiem jest tRNA_m^{Met} z drożdży, który w pewnych warunkach może być acylowany przez enzym bakteryjny (159, 160).

III. Białkowe czynniki inicjujące i ich rola w powstawaniu kompleksu inicjującego

W 1968 r. Miller i Schweet (188) stwierdzili, że płukanie rybosomów retikulocytów królika 0,5M KCl usuwa z nich białkowe czynniki niezbędne do translacji naturalnego mRNA w układzie *in vitro*. W na-

*) Pochodna U o nieznanym budowie.

Tabela 2.

Czynniki inicjujące wyizolowane z retikulocytów królika oraz ze skorupiaka *Artemia salina*

Nazwa czynnika inicjującego oraz materiał i laboratorium, w którym czynnik zidentyfikowano		Retikulocyty królika		Retikulocyty królika		Funkcja czynnika w procesie inicjacji	Piśmiennictwo
		<i>A. salina</i>					
Anderson i Merrick	Staehelein			Ochoa			
IF—M1	—	EIF—1	EIF—1			Katalizuje przyłączanie inicjatorowego Met-tRNA _i do podjednostki 40S w obecności AUG	190, 195—197
IF—MP	IF—E2	IF—MP	IF—MP			Tworzy kompleks potrójny z eukariotycznym Met-tRNA _i i GTP, katalizuje przyłączanie Met-tRNA _i do podj. 40S w nieobecności mRNA i AUG	3, 20, 191, 194, 196, 198, 220
IF—M2B*	—	—	—			Stymuluje powstawanie kompleksu 40S utworzonego w obecności czynnika IF—M1. Potrzebny dla przyłączenia podj. 60S do kompleksu inicj. 40S	197, 198, 214
—	IF—E1*	—	—			Stymuluje ok. 2-krotnie przyłączanie Met-tRNA _i i mRNA do podjednostki 40S w obecności innych czynników	3
IF—M2A	IF—E5	—	—			Katalizuje przyłączanie podjednostki 60S do kompleksu inicjującego 40S.	3, 192, 198
IF—M5	IF—E3	EIF—3	EIF—3			Possada aktywność GTP-azy	3, 10, 193, 194
IF—M3**	IF—E6	—	—			Czynnik złożony z ok. 10 polipeptydów (m.c.z. 500 000), końcowy obok IF—E4 i —E6 dla przyłączenia mRNA do kompleksu inicjującego 40S	3, 193
IF—M4	IF—E4	—	—			Katalizuje wraz z IF—E3, —E4 i ATP przyłączanie mRNA do kompleksu inicjującego 40S. Posiada aktywność ATP-azy	3, 193
—	—	CBP	CBP			Katalizuje wraz z czynnikami IF—E3 i IF—E6 przyłączanie mRNA do kompleksu inicj. 40S	60
						Rozpoznaje 5'-końcowy fragment m ⁷ GpppN w mRNA. Stymuluje transkrypcję mRNA w obecności innych czynników inicjujących	

* Pomimo że ciężary cząsteczkowe czynników IF—M2B i IF—E1 są zbliżone (15 000—17 000) to czynniki te omówione są osobno, ponieważ brak jest danych o funkcjonalnym podobieństwie tych białek.

** Do niedawna czynnik IF—M3 wg nomenklatury Andersona i wsp. uchodził za odpowiednik czynnika inicjującego IF—E3 i innych podobnych czynników o m.c.z. > 500 000. Ostatnio ustalono, że czynnik IF—M3 jest pojedynczym polipeptydem o m.c.z. 80 000 i że odpowiada on czynnikowi IF—E6 (193). Jednocześnie wyizolowano czynnik IF—M5, który jest białkiem złożonym z kilku polipeptydów (193) i przypomina czynnik IF—E3 Staeheleina i wsp. (3).

stępnym latach w kilku laboratoriach udało się zidentyfikować, a w niektórych przypadkach oczyścić i scharakteryzować, szereg eukariotycznych czynników inicjujących biorących udział w tworzeniu się kompleksu [rybosom. Met-tRNA_f. mRNA]. Podczas gdy u bakterii w procesie tym uczestniczą tylko trzy białkowe czynniki inicjujące (IF—1, IF—2, IF—3) (2, 5, 6), u eukariontów ich liczbę ocenia się na co najmniej 5—7 (3, 10, 170, 189). Większa złożoność procesu inicjacji w komórkach eukariontów wynika z faktu, że na tym etapie ekspresji informacji genetycznej działa wiele mechanizmów regulacyjnych. Nie znany jest dokładny mechanizm działania wszystkich czynników białkowych uczestniczących w procesie inicjacji. Zrozumienie tego procesu utrudnia dodatkowo brak jednolitej nomenklatury czynników inicjujących oraz dokładnie określonych kryteriów jakie białko należy uznawać za czynnik inicjujący a nie za np. białko rybosomalne wypłukane z rybosomów działaniem wysokiego stężenia soli.

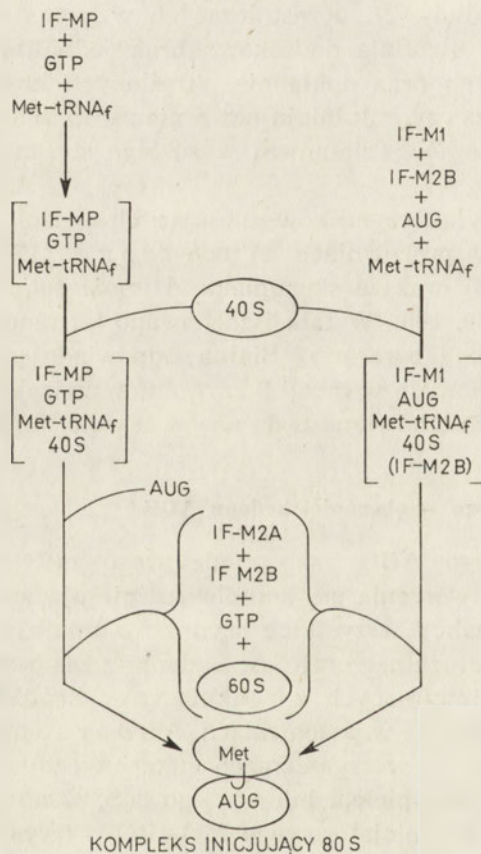
W Tabeli 2 przedstawiony jest wykaz czynników inicjujących wyizolowanych z retikulocytów królika w pracowniach Andersona (170, 190—193) i Staehelina (3, 194) oraz ze skorupiaka *Artemia salina* w pracowni Ochoa (10, 20, 60, 169, 195). W tabeli zachowano terminologię stosowaną przez poszczególne laboratoria. Białka odpowiadające własnościami niektórym z przedstawionych w tabeli 2 czynników wyizolowano również w innych pracowniach; omówione będą one w tekście.

III-1. Powstawanie kompleksu inicjującego w obecności kodonu AUG

Zastosowanie kodonu inicjującego AUG jako modelowego mRNA upraszcza badanie *in vitro* etapów tworzenia się kompleksu inicjującego ze względu na wyeliminowanie z reakcji wszystkich czynników inicjujących potrzebnych dla rozpoznania naturalnego mRNA. Badania z zastosowaniem oczyszczonych czynników inicjujących z retikulocytów królika oraz z *Artemia salina*, prowadzone głównie w pracowniach Andersona i Ochoa (120, 196—198) wykazały, że w organizmach eukariotycznych występują dwie drogi tworzenia się kompleksu inicjującego 80S, składającego się z rybosomu, kodonu AUG i inicjatorowego Met-tRNA_f (Schemat 2). Mechanizm pierwszy przebiega poprzez przyłączenie inicjatorowego Met-tRNA_f do podjednostki 40S w obecności kodonu AUG oraz czynnika IF—M1 z retikulocytów, lub odpowiadającego mu czynnika EIF—1 z *Artemia salina*. Retikulocytowy czynnik inicjujący IF—M2B stymuluje reakcję w obecności czynnika IF—M1 około 2-krotnie (196).

Białko o własnościach czynnika IF—M1 wyizolowano z wątroby szczura (199—202) i królika (203), z komórek raka wysiękowego Krebsa (204), z retikulocytów królika (190, 205, 206) z *Artemia salina* (169, 195) oraz z drożdży (207). Oczyszczony czynnik z retikulocytów królika jest zdaniem Merricka i Andersona (190) pojedynczym zasadowym polipep-

tydem o masie cząsteczkowej 65 000. Białko o podobnych właściwościach wyizolowane z tego samego materiału przez Cimadevilla i Hardesty'ego (206) posiada masę cząsteczkową 50 000 i złożone jest z dwóch podjednostek o masach cząsteczkowych 30 000 i 20 000. Aktywny homogeny czynnik EIF—1 z *Artemia salina* jest dimerem złożonym z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej 74 000 (195). Mimo tych różnic w budowie, biologiczne właściwości czynników izolowanych z różnych organizmów są bardzo zbliżone. Białka te stymulują przyłączanie inicjato-



Schemat 2. Dwie drogi tworzenia kompleksu inicjującego w obecności kodonu AUG (196).

rowego — prokariotycznego lub eukariotycznego — Met-tRNA lub fMet-tRNA, jak również fenyloalanylo-tRNA lub N-acetylofenyloalanylo-tRNA do podjednostki rybosomowej 40S. Przyłączanie to zależy od obecności odpowiedniej matrycy (AUG lub poli(U)), nie zależy zaś od obecności GTP (190, 195, 200, 204, 206). O podobieństwie czynnika IF—M1 z retikulocytów oraz EIF—1 z *Artemia salina* świadczy dodatkowo spostrzeżenie, że przeciwciała przeciwko czynnikowi EIF—1 inaktywuje również czynnik z retikulocytów (208).

Kompleks inicjujący [40S. AUG. Met-tRNA. IF—M1] w obecności podjednostki 60S, czynników IF—M2A i IF—M2B z retikulocytów oraz GTP ulega przekształceniu w kompleks 80S (Schemat 2) zawierający Met-tRNA w miejscu P rybosomu, czyli w pozycji w której może on reagować z puromycyną lub innym aminoacylo-tRNA przyłączonym do rybosomu (196, 197). Czynniki IF—M2A oraz odpowiadający mu czynnik IF—E5 zostały wyizolowane z retikulocytów królika i oczyszczone do homogenności (3, 192). Według Merricka i wsp. (192) czynnik IF—M2A jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 125 000. W obecności rybosomów posiada on aktywność GTP-azy (3, 192). Frakcja białkowa o własnościach czynnika IF—M2A została wyizolowana również w innych laboratoriach z retikulocytów królika (209—211), komórek L (212) oraz wątroby szczura (213) i królika (203). Jest ona — osobno lub w połączeniu z czynnikiem IF—M2B — określana często jak „czynnik łączący”, potrzebny do połączenia podjednostek 40S i 60S w procesie inicjacji (3, 192, 203, 211).

Czynnik IF—M2B z retikulocytów królika, potrzebny również dla przekształcenia kompleksu inicjującego 40S w kompleks 80S (196, 197) został rozdzielony na dwie frakcje: IF—M2B- α i IF—M2B- β o masach cząsteczkowych odpowiednio 15 000 i 17 500 (214). Nie poznano jeszcze dokładnie ich roli w procesie inicjacji. Jak wspomniano wyżej, czynnik IF—M2B stymuluje również tworzenie się kompleksu inicjującego 40S w obecności czynnika IF—M1 z retikulocytów (196). Czynniki IF—E1 oczyszczone do homogenności przez Staehelina i wsp. (3) posiadają masę cząsteczkową 15 000 i odpowiadają prawdopodobnie jednej z frakcji czynnika IF—M2B.

Druga droga tworzenia się kompleksu inicjującego przebiega w trzech etapach (Schemat 2). Etap pierwszy to utworzenie kompleksu potrójnego [Met-tRNA. czynnik IF—MP. GTP]. Dodatek podjednostki rybosomowej 40S prowadzi następnie do powstania kompleksu inicjującego 40S (etap drugi). Proces ten, w odróżnieniu od mechanizmu przebiegającego z udziałem czynnika IF—M1, nie wymaga obecności kodonu AUG. Dodatek AUG, czynników IF—M2A i IF—M2B oraz podjednostki 60S konieczny jest do powstania kompleksu inicjującego 80S (etap trzeci) (196, 198).

Białko o własnościach czynnika IF—MP (IF—E2) wyizolowano m.in. z retikulocytów królika (3, 191, 194, 209, 210, 215, 216), z komórek L (217), z zarodków pszenicy (218), z *Artemia salina* (20) oraz z komórek raka wąsików Krebsa (219). Oczyszczony czynnik IF—MP z retikulocytów królika zbudowany jest według Safera i wsp. (191) z dwóch podjednostek o masach cząsteczkowych 34 000 i 52 000. Funkcjonuje on jako monomer o masie cząsteczkowej 90 000 lub jako dimer o masie cząsteczkowej 180 000. Według Staehelina i wsp. (3) retikulocytowy czynnik jest białkiem złożonym z trzech podjednostek o masach cząsteczkowych 32 000, 47 000 i 50 000. Kompleks potrójny [Met-tRNA. IF—MP. GTP] zatrzymywany jest na sączkach miliporowych; stwierdzenie tego bardzo ułatwiło

identyfikację i oczyszczanie czynnika IF—MP (3, 20, 191, 209, 216, 217). Specyficzność reakcji czynnika IF—MP z *Artemia salina* z różnymi aminoacylo-tRNA oraz wpływ GTP na ten proces przedstawiono w tabeli 3. Kompleks potrójny tworzy się wydajnie jedynie z eukariotycznym inicjatorowym Met-tRNA_f. Bakteryjny fMet-tRNA_f lub Met-tRNA_f, jak również

Tabela 3

Aktywność czynnika IF—MP w tworzeniu kompleksu potrójnego z Met-tRNA_f i GTP (20).

Aminoacylo-tRNA		Źródło czynnika IF—MP	Aminoacylo-tRNA związany w kompleksie (pmole)		
Rodzaj	Źródło		-GTP	+GTP	Różnica
[³⁵ S]Met-tRNA _f	<i>A. salina</i>	<i>A. salina</i>	0,17	1,26	1,09
[¹⁴ C]Met-tRNA _f	<i>A. salina</i>	<i>A. salina</i>	0,12	1,10	0,98
[³⁵ S]Met-tRNA _f	Retikulocyty królika	<i>A. salina</i>	0,12	1,00	0,88
f[³⁵ S]Met-tRNA _f	Retikulocyty królika	<i>A. salina</i>	0,05	0,52	0,47
[¹⁴ C]Met-tRNA _m	Wątroba królika	<i>A. salina</i>	0,10	0,11	0,01
[¹⁴ C]Met-tRNA _f	<i>E. coli</i>	<i>A. salina</i>	0,15	0,16	0,01
f[³⁵ S]Met-tRNA _f	<i>E. coli</i>	<i>A. salina</i>	0,21	0,18	0
[¹⁴ C]Fen-tRNA	<i>E. coli</i>	<i>A. salina</i>	0,10	0,11	0,01
[³⁵ S]Met-tRNA _f	<i>A. salina</i>	Retikulocyty królika	0,01	0,92	0,91

różne nieinicjatorowe aminoacylo-tRNA nie tworzą kompleksu z czynnikiem IF—MP. Formylacja eukariotycznego Met-tRNA_f obniża około dwukrotnie jego aktywność w tworzeniu kompleksu potrójnego. Czynniki z *Artemia salina* rozpoznaje wydajnie Met-tRNA_f z retikulocytów. Podobnie czynniki IF—MP z retikulocytów królika oddziałuje z Met-tRNA_f z *Artemia salina*. GTP stymuluje powstawanie kompleksu białka z inicjatorowym tRNA około 10-krotnie w przypadku czynnika z *Artemia salina* oraz prawie 100-krotnie w przypadku czynnika z retikulocytów (20). Podobną specyficzność czynnika IF—MP w stosunku do eukariotycznego inicjatorowego Met-tRNA oraz zależność powstawania kompleksu od obecności GTP opisano również w innych pracach (209, 217, 219, 220).

Walton i Gill (221) donieśli ostatnio, że w obecności częściowo oczyszczonego czynnika IF—MP z retikulocytów królika również ATP i inne trójfosforany nukleozydów stymulują tworzenie się kompleksu potrójnego. Podobne wyniki otrzymano również z czynnikiem IF—MP z zarodków pszenicy (218) i z *Artemia salina* (20). Trójfosforany nukleozydów inne niż GTP nie uczestniczą jednakże bezpośrednio w powstawaniu kompleksu potrójnego. Są one jedynie donorem fosforanu dla GDP w reakcji katalizowanej przez kinazę dwufosfonukleozydów (E.C. 2.7.4.6.) obecną w częściowo oczyszczonych preparatach czynnika IF—MP (20, 221). Stwierdzono, że nawet oczyszczony do homogenności czynniki IF—MP

z retikulocytów królika zawiera związany z białkiem GDP (222). Świadczy o tym m.in. spostrzeżenie, że w reakcji tworzenia się kompleksu potrójnego GTP można zastąpić przez jednoczesny dodatek fosfoenolopirogronianu i kinazy fosfoenolopirogronianu (222). Obecność kinazy dwufosfonukleozydów w popłuczku rybosomalnym oraz wysokie — około 100-krotnie wyższe od GTP — powinowactwo GDP do faktuora IF—MP (221) przemawiają za możliwością, że fosforylacja kompleksu [IF—MP. GDP] do [IF—MP. GTP] przez kinazę dwufosfonukleozydów jest naturalną drogą regeneracji aktywnego czynnika w procesie inicjacji.

W obecności podjednostki rybosomowej 40S kompleks [Met-tRNA. IF—MP. GTP] ulega przekształceniu w kompleks inicjujący [40S. Met-tRNA. IF—MP. GTP] (schemat 2) (20, 194, 196, 220). Zarówno na etapie tworzenia się kompleksu potrójnego jak i podczas powstawania kompleksu 40S nie zachodzi hydroliza GTP, gdyż GTP może być zastąpiony w tych reakcjach przez niehydrolizujący analog GMPPCP (20, 196, 212, 216, 220). S a f e r i wsp. (220) stwierdzili, że czynnik IF—MP z retikulocytów królika oddziałuje z Met-tRNA również w nieobecności GTP oraz, że kompleks [IF—MP. Met-tRNA] może reagować z podjednostką 40S z tą samą wydajnością co kompleks potrójny. Możliwość utworzenia kompleksu podwójnego [IF—MP. Met-tRNA] zależała m.in. od świeżości preparatu czynnika IF—MP oraz od stopnia oczyszczenia inicjatorowego tRNA (220).

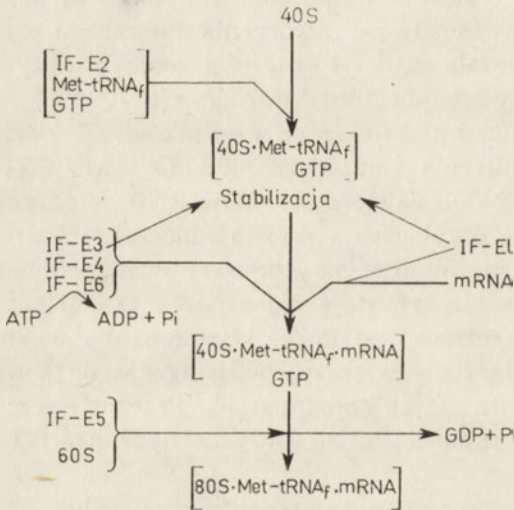
Dodatek podjednostki 60S, kodonu AUG oraz czynników IF—M2A i IF—M2B prowadzi do przekształcenia kompleksu [40S. IF—MP. GTP. Met-tRNA] w kompleks inicjujący 80S zawierający Met-tRNA w pozycji P rybosomu (196, 198). Mechanizm przyłączania się podjednostki 60S z retikulocytów królika do kompleksu inicjującego 40S jest więc podobny niezależnie od tego czy kompleks 40S powstaje *via* czynnik IF—M1 czy też *via* czynnik IF—MP. Jediną różnicą jest to, że w przypadku wykorzystania czynnika IF—MP przyłączenie większej podjednostki do kompleksu 40S wymaga dodania na tym etapie kodonu AUG. Przekształceniu kompleksu inicjującego 40S w kompleks 80S towarzyszy hydroliza GTP (3, 10, 198).

Interesujące wyniki dało porównanie aktywności podjednostek 60S z retikulocytów królika i *Artemia salina* (197). Dla przekształcenia kompleksu [40S. IF—M1. AUG. Met-tRNA] w funkcjonalny kompleks 80S konieczne jest dodanie, obok podjednostki 60S z retikulocytów, również czynników IF—M2A i IF—M2B (Schemat 2). Zastosowanie podjednostki rybosomowej 60S z *Artemia salina* eliminuje jednakże konieczność dodawania tych dwóch czynników; aktywny kompleks 80S powstaje w tych warunkach w obecności tylko jednego czynnika inicjującego — IF—M1 (197). Z opisanych eksperymentów wyciągnięto wniosek, że czynniki IF—M2A i IF—M2B są, być może, białkami rybosomowymi usuniętymi z podjednostki 60S retikulocytów podczas preparatyki (197). Gdy porównano jednak tworzenie się kompleksu inicjującego *via* czynnik IF—MP,

okazało się, że niezależnie od rodzaju stosowanej podjednostki 60S, dla powstania funkcjonalnego kompleksu 80S potrzebne są czynniki IF—M2A i IF—M2B (197, 198).

III-2. Powstawanie kompleksu inicjującego w obecności naturalnego mRNA

Tworzenie się kompleksu inicjującego w obecności naturalnego mRNA jest procesem bardziej złożonym od omówionych powyżej mechanizmów inicjacji w obecności AUG. Staehelin i wsp. (3) twierdzą, że w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika w procesie tym poza podjednostkami rybosomowymi, globinowym mRNA oraz Met-tRNA, uczestniczy aż sześć białkowych czynników inicjujących oraz ATP. Według tych autorów pierwsze etapy procesu inicjacji przebiegają podobnie jak w przypadku opisanego AUG — zależnego mechanizmu *via* czynnik IF—MP (Schemat 3). Kompleks potrójny oddziałuje z podjednostką rybosomową 40S w nieobecności mRNA. Prowadzi to do powstania kompleksu ini-



Schemat 3. Powstawanie kompleksu inicjującego 80S w obecności naturalnego mRNA (3).

jującego 40S zawierającego przyłączony do mniejszej podjednostki metionyno-tRNA (Schemat 3). Kolejnym etapem jest dołączenie mRNA do kompleksu [Met-tRNA·40S]. Reakcja ta przebiega w obecności czynników IF—E3, IF—E4, i IF—E6 oraz ATP (3). Dodatkowo stymuluje ją około dwukrotnie czynnik IF—E1 (3). Staehelin i wsp. (3, 194) stwierdzili, że czynnik IF—E3, konieczny dla przyłączenia mRNA do podjednostki 40S, ma również stabilizujący wpływ na sam kompleks [40S·Met-tRNA]. Przyłączenie podjednostki 60S do kompleksu [40S·mRNA·Met-tRNA] katalizowane jest przez czynnik IF—E5 (3). Na tym etapie odbywa się również hydroliza GTP (3).

Trzy z czynników (IF—E1, IF—E2 i IF—E5) biorących udział w tworzeniu się kompleksu inicjującego w obecności globinowego mRNA odpowiadają omówionym już czynnikom IF—M2B, IF—MP i IF—M2A (patrz Tabela 2). Z pozostałych na szczególną uwagę zasługuje czynnik IF—E3 uznawany za odpowiednik bakteryjnego czynnika IF—3 koniecznego do translacji naturalnych mRNA u bakterii (2, 5, 6). W przeciwieństwie do czynnika bakteryjnego, który jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 25 000 (2, 5, 6) czynnik eukariotyczny jest dużym kompleksem białkowym o stałej sedymentacji około 17S i masie cząsteczkowej ponad 500 000 daltonów (3, 194). Analiza oczyszczonego czynnika IF—E3 z retikulocytów królika metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS wykazała, że składa się on z 9—10 podjednostek białkowych (193). W związku ze złożonością budowy tego czynnika Staehelin i wsp. (3) określają go nawet jako rodzaj „organelum” komórkowego biorącego, być może, udział w regulacji translacji mRNA u eukariontów. Nie udało się niestety do chwili obecnej oczyścić podjednostek czynnika IF—E3 ani ustalić ich roli w procesie inicjacji.

Czynniki o własnościach podobnych do czynnika IF—E3 wyizolowano również w innych pracowniach (193, 203, 223—226). Heywood i wsp. (225—227) stwierdzili, że czynniki te wykazują specyficzność w stosunku do mRNA. Autorzy ci wyizolowali czynnik IF—E3 z mięśni zarodków kurcząt oraz z kurzych retikulocytów. W układzie *in vitro* synteza miozyny w obecności miozynowego mRNA stymulowana była tylko przez czynnik otrzymany z homologicznej tkanki mięśniowej; globinowy mRNA tłumaczony był tylko w obecności czynnika z retikulocytów. Podobnie Heywood i wsp. (225, 226) wykazali występowanie w mięśniach zarodków kurczęcia czynników specyficznych dla translacji miozynowego i mioglobinowego mRNA. Obecność czynników inicjujących stymulujących translację określonego rodzaju lub klasy mRNA stwierdzono również w tkankach owada *Tenebrio molitor* (228), w retikulocytach królika (229) oraz w komórkach raka wosłkowego Krebsa (230). Z drugiej strony wiadomo jednak, że w procesie translacji RNA wirusa EMC czynniki typu IF—E3 z retikulocytów lub wątroby królika mogą zastępować homologiczny czynnik z komórek raka wosłkowego Krebsa (223). W układzie bezkomórkowym z komórek raka wosłkowego Krebsa ten sam czynnik stymuluje zarówno translację RNA wirusa EMC jak i globinowego mRNA z retikulocytów (223). Przeciwno występowaniu białkowych czynników inicjujących rozpoznających specyficznie określone mRNA świadczą również liczne przykłady translacji różnych mRNA w heterologicznych układach bezkomórkowych (27, 231—236) lub w oocytach *Xenopus laevis* (237, 238). Osiągnięcie wydajnej translacji nie wymagało dodania żadnych białek pochodzących z materiału, z którego izolowany był badany mRNA. Wyniki te oczywiście nie wykluczają ostatecznie możliwości występowania czynników białkowych specyficznych dla różnych klas mRNA. Być może,

świadczą one jedynie o tym, że wspomniane wyżej układy do translacji mRNA zawierają cały komplet tego typu czynników i nie można w nich wykazać różnic w translacji poszczególnych mRNA. Pozostałe dwa czynniki inicjujące potrzebne dla przyłączenia globinowego mRNA do podjednostki 40S retikulocytów to IF—E4 i IF—E6. Według Staehelina i wsp. (3) czynnik IF—E4 retikulocytów królika i komórek raka wsiękowego Krebsa jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej 50 000. Białko to jest identyczne z oczyszczonym uprzednio przez Weigle i Smitha (230, 239) czynnikiem inicjującym IF_{EMC}. Autorzy ci stwierdzili, że w układzie bezkomórkowym z raka wsiękowego Krebsa czynnik IF_{EMC} konieczny jest dla translacji RNA wirusa EMC, podczas gdy translacja globinowego mRNA stymulowana jest przez niego tylko nieznacznie (230). Wyniki ostatnich doświadczeń Staehelina i wsp. (3) świadczą jednak o tym, że translacja obu tych mRNA zależna jest całkowicie od obecności czynnika IF—E4; translacja RNA wirusa EMC wymaga jedynie wyższego stężenia tego białka. Oczyszczony do homogenności czynnik IF—E6 z retikulocytów królika posiada masę cząsteczkową 80 000 (3). Jego rola w przyłączaniu mRNA do podjednostki 40S łączy się, być może, z udziałem w tym procesie ATP. Czynnik ten posiada bowiem aktywność ATP-azy. W nieobecności rybosomów hydrolizuje on ATP do ADP i fosforanu nieorganicznego. Udział ATP w procesie inicjacji syntezy łańcucha polipeptydowego u eukariontów wykazano po raz pierwszy w układzie bezkomórkowym z zarodków pszenicy (240, 241). W przypadku inicjacji w układzie z retikulocytów królika ATP potrzebny jest obok czynników IF—E3, IF—E4 i IF—E6 dla przyłączenia mRNA do kompleksu inicjującego [40S. Met-tRNA] (3). Reakcji tej towarzyszy zapewne hydroliza ATP gdyż nie hydrolizujący analog AMPPCP nie posiada aktywności ATP (3). Udział ATP w przyłączaniu mRNA do rybosomu jest jedną z podstawowych cech różniących proces inicjacji biosyntezy białka u eukariontów i prokariontów. Czynnik inicjujący IF—E6 bierze, być może, również udział w rozpoznawaniu zmodyfikowanego końca 5' w mRNA (242) (patrz rozdział IV-1).

Nie wyjaśniony jest ciągle ostatecznie problem czy czynnik IF—M1 (EIF—1) uczestniczy w translacji naturalnego mRNA, a jeśli tak to jaka jest jego rzeczywista rola w tym procesie. Coraz więcej faktów przemawia za tym, że z dwóch omówionych, zależnych od AUG, mechanizmów inicjacji tylko drugi — *via* czynnik IF—MP — wykorzystywany jest podczas translacji naturalnego mRNA w układzie *in vitro*:

— W układach bezkomórkowych z *Artemia salina* (189) oraz z retikulocytów królika (3) udało się wykazać zależność syntezy globiny od obecności egzogenego, oczyszczonego do homogenności czynnika IF—MP z retikulocytów. Osiągnięcie aktywnej translacji globinowego mRNA nie wymagało dodatku egzogenego czynnika IF—M1. Co więcej, preinkubacja układu bezkomórkowego z *Artemia salina* z przeciwciałem

przeciwko oczyszczonemu czynnikowi EIF—1 nie obniżała poziomu syntezy globiny, podczas gdy przeciwciało to hamowało reakcję przyłączenia Met-tRNA do podjednostki 40S katalizowaną przez czynnik EIF—1 obecny w układzie (189).

- Z dwóch czynników stymulujących przyłączenie Met-tRNA do podjednostki 40S jedynie czynnik IF—MP wykazuje dużą specyficzność w stosunku do eukariotycznego metionyno-tRNA_i. Czynnik IF—M1 jest również aktywny z bakteryjnym formylowanym lub nieformylowanym metionyno-tRNA_i. Istnieją sugestie, nie poparte do chwili obecnej żadnymi dowodami, że czynnik IF—M1 uczestniczy, być może, w mitochondrialnej biosyntezie białka lub też jest niewyeliminowaną w czasie ewolucji „pozostałością” po bakteryjnym czynniku IF—2 (189).
- Podstawową cechą różniącą dwa mechanizmy przyłączania inicjatorowego tRNA do podjednostki 40S jest wpływ AUG na ten proces. Przyłączanie katalizowane przez czynnik IF—M1 wymaga obecności kodonu AUG, podczas gdy przyłączanie *via* czynnik IF—MP jest od matrycy całkowicie niezależne. Stwierdzono, że w lizacie retikulocytów królika 30—50% natywnych podjednostek rybosomowych 40S związanych jest z inicjatorowym metionyno-tRNA. Tylko niewielki procent tych kompleksów zawiera również dołączony mRNA (243). Wyniki te świadczą o tym, że w lizacie retikulocytów, podobnie jak w przypadku opisanego wyżej mechanizmu inicjacji *via* czynnik IF—MP, przyłączenie Met-tRNA do podjednostki 40S następuje przed przyłączeniem do niej informacyjnego RNA.

Do niedawna przyjmowano powszechnie, że w procesie inicjacji u prokariotów (*Escherichia coli*) przyłączenie fMet-tRNA do podjednostki 30S wymaga obecności mRNA (2, 5, 6), analogicznie do inicjacji *via* czynnik IF—M1 u eukariotów. Obecnie pojawiło się jednak szereg doniesień, że również u prokariotów przyłączenie inicjatorowego tRNA do mniejszej podjednostki następuje przed przyłączeniem do niej mRNA (244—246). W układzie bezkomórkowym z *Escherichia coli* udało się m.in. wykazać tworzenie się kompleksu inicjującego [30S. fMet-tRNA], analogicznego z kompleksem [40S. Met-tRNA. IF—MP] u eukariotów (245, 246). Wykazano ponadto, że bakteryjny czynnik IF—2 tworzy z inicjatorowym tRNA kompleks podobny do kompleksu potrójnego powstającego w obecności czynnika IF—MP (247—250). Wspomniane podobieństwa między inicjacją u prokariotów oraz inicjacją *via* czynnik IF—MP u eukariotów są dodatkowym argumentem, że właśnie ten mechanizm funkcjonuje u organizmów wyższych.

IV. Mechanizm rozpoznawania miejsca inicjującego w mRNA

Jednym z podstawowych problemów w inicjacji biosyntezy białka jest rozpoznanie przez rybosom i czynniki inicjujące miejsca w mRNA, w któ-

rym rozpocząć się ma synteza polipeptydu. Aby informacja zawarta w mRNA była właściwie odczytana, translacja musi rozpocząć się od tego trypletu AUG (lub GUG), który jest rzeczywistym kodonem inicjującym. Muszą istnieć mechanizmy zabezpieczające przed inicjacją syntezy od sekwencji AUG kodujących wewnątrzbiałkowe metioniny, lub niezgodnych z właściwą „fazą” odczytywania mRNA. Z badań nad translacją mRNA u bakterii wiadomo, że głównym czynnikiem zapobiegającym inicjacji w niewłaściwym miejscu jest rozbudowana struktura przestrzenna samego mRNA (1, 23, 252, 253, 254, 255). Istotną rolę w przyłączaniu mRNA do rybosomu odgrywa również sekwencja nukleotydów w pobliżu kodonu inicjującego. Badania struktury pierwszorzędowej bakteryjnych i bakteriofagowych mRNA wykazały, że w bliskim sąsiedztwie kodonów inicjujących, w kierunku końca 5' cząsteczki mRNA znajdują się sekwencje złożone z 3—8 nukleotydów purynowych (1, 2, 256, 257). *Shine i Dalgarno* (258, 259) zaproponowali, że podczas inicjacji syntezy polipeptydu, bogaty w puryny fragment mRNA łączy się wiązaniami wodorowymi z komplementarnym do niego, bogatym w nukleotydy pirymidynowe, końcem 3' rRNA 16S mniejszej podjednostki rybosomowej. Tego typu oddziaływanie między końcem 3' rRNA 16S *Escherichia coli* oraz tym fragmentem RNA bakteriofaga R17, w którym odbywa się inicjacja syntezy fagowego białka A, zostało ostatnio udokumentowane przez *Steitz i Jakes* (256). Nie poznano jeszcze w pełni mechanizmu rozpoznawania mRNA przez rybosom eukariontów. Obecnie można już jednak stwierdzić, że proces ten jest w komórkach organizmów wyższych bardziej złożony i że, obok wielu cech wspólnych z prokariotami, istotną rolę odgrywają w nim również reakcje nieznanne u bakterii.

IV-1. Rola zmodyfikowanego końca 5' mRNA

Istotną rolę w inicjacji translacji eukariotycznego mRNA odgrywa struktura m⁷GpppN znajdująca się na jego końcu 5'. Istnieją dane, że ten fragment mRNA jest częścią sekwencji rozpoznawanej w czasie inicjacji przez rybosom lub czynniki inicjujące. Wpływ obecności końcowej 7-metyloguanozyny na translację mRNA wykazano po raz pierwszy dla mRNA wirusów Reo i VSV, oraz dla mRNA z retikulocytów królika (61, 260). *Both i wsp.* (260) stwierdzili, że w układzie bezkomórkowym z zarodków pszenicy wydajna translacja niezmetrylowanego reowirusowego mRNA o 5'-końcowej strukturze typu GpppN... lub (p)ppN... może odbywać się tylko po uprzednim zablokowaniu i zmetylowaniu końca 5' mRNA. Sama obecność guanozyny przyłączonej wiązaniem 5'—5' do reszty cząsteczki mRNA nie wystarcza dla osiągnięcia wydajnej translacji; guanozyna musi być w tym celu zmetylowana w pozycji N⁷. Zgodnie z tym, dodatek inhibitora metylacji, S-adenozylhomocysteiny, do układu bezkomórkowego zawierającego niezmetrylowany mRNA hamuje proces translacji, podczas

gdy nie ma on wpływu na translację zmetylowanego mRNA (260, 264). Podobne wyniki osiągnięto w przypadku translacji reowirusowego mRNA w układzie bezkomórkowym z *Artemia salina* (72). Rezultaty te świadczą również o tym, że używane do badania translacji układy bezkomórkowe z *Artemia salina* i z zarodków pszenicy zawierają enzymy specyficznie blokujące i metylujące koniec 5' mRNA (61, 72, 260).

Wykorzystując obecność w końcowej 7-metyloguanozynie dwóch wolnych grup hydroksylowych w pozycjach 2' i 3', działaniem kolejno nadjodanu i aniliny (reakcja β -eliminacji) można usunąć 7-metyloguanozynę z końca cząsteczki mRNA (15, 61, 72, 260, 261). Poddane tej procedurze mRNA wirusa Reo oraz mRNA z retikulocytów królika i *Artemia salina* tracą zdolność do wydajnego stymulowania syntezy białek w układach bezkomórkowych z zarodków pszenicy i *Artemia salina* (61, 72). W przypadku RNA wirusa BMV stwierdzono ostatnio, że usunięcie 7-metyloguanozyny z RNA obniża jego aktywność w układzie bezkomórkowym z zarodków pszenicy, nie hamuje jej jednak całkowicie (263). Translacja BMV RNA poddanej β -eliminacji obniżona była, w porównaniu z natywnym RNA, około 8-krotnie przy niskim stężeniu RNA w układzie bezkomórkowym (10 μ g/ml) i tylko około 30% przy wysokim stężeniu RNA (100 μ g/ml). M u t h u k r i s h n a n i wsp. (263) zbadali wpływ β -eliminacji różnych wirusowych mRNA na ich aktywność w tworzeniu kompleksów inicjujących 80S w układach bezkomórkowych z retikulocytów królika oraz z zarodków pszenicy. Autorzy ci stwierdzili, że podczas gdy usunięcie 7-metyloguanozyny z mRNA wirusów Reo i VSV uniemożliwia prawie całkowicie przyłączenie mRNA do rybosomów zarodków pszenicy, to efekt ten jest znacznie mniej wyraźny w przypadku rybosomów retikulocytów. Poddane procedurze β -eliminacji mRNA wirusów Reo i VSV przyłączają się do rybosomów w układzie z retikulocytów z wydajnością odpowiednio 17% i 35% w porównaniu z kontrolnymi mRNA zawierającymi końcową 7-metyloguanozynę. Również R o s e i L o d i s h (26) stwierdzili ostatnio, że usunięcie 7-metyloguanozyny z mRNA wirusa VSV ma tylko nieznaczny wpływ na jego aktywność w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika. Wszystkie te wyniki świadczą o tym, że translacja poszczególnych mRNA zależy w różnym stopniu od obecności 7-metyloguanozyny na końcu 5' mRNA. Efekt 7-metyloguanozyny jest również uzależniony od rodzaju układu bezkomórkowego. Translacja mRNA w układach z zarodków pszenicy i z *Artemia salina* wydaje się być bardziej zależna od obecności 7-metyloguanozyny w mRNA, niż translacja w układzie z retikulocytów królika. Omówione wyżej wyniki przemawiają również za tym, że w informacyjnym RNA eukariontów koniec m⁷GpppN nie jest jedynym fragmentem odpowiedzialnym za rozpoznanie miejsca inicjującego w mRNA przez aparat biosyntezy białka.

B o t h i wsp. (264) ustalili, że w układzie z zarodków pszenicy zablokowanie i metylacja końca 5' mRNA reowirusa potrzebne są by mRNA

mógł wydajnie przyłączyć się do kompleksu inicjującego 40S. Stwierdzono również, że w kompleksach inicjujących 40S i 80S zawierających reowirusowe mRNA, struktura rybosomu chroni przed strawieniem przez rybonukleazę 30—50-nukleotydomowe fragmenty RNA zawierające 5'-końcową 7-metyloguanozynę (264, 265). Wyizolowane 5'-końcowe fragmenty o długości 30—50 nukleotydów mogą ponownie wydajnie przyłączać się do rybosomów (264). Jednakże krótsze fragmenty mRNA, zawierające tylko 8—10 nukleotydów z 7-metyloguanozyną na końcu 5', nie oddziałują z rybosomami zarodków pszenicy (264). Wyniki te potwierdzają przypuszczenia, że zablokowany koniec reowirusowego mRNA jest tylko częścią dłuższej sekwencji rozpoznawanej w czasie inicjacji przez rybosom lub czynnik inicjujący.

Z popłucz rybosomów *Artemia salina* wyizolowano ostatnio frakcję białkową, która może odgrywać rolę w rozpoznawaniu zmetylowanego końca 5' mRNA w procesie translacji (60). Frakcja ta, nazwana czynnikiem CBP (z ang. *cap binding protein*) oddziałuje z wyizolowanym fragmentem m⁷GpppGpC, tworząc kompleks zatrzymywany na sączkach nitrocelulozowych. Białko CBP nie tworzy kompleksu ani z GpppGpC ani z analogiem zawierającym otwarty pierścień 7-metyloguaniny, m⁷G^ApppGpC. Badania kompetycyjnego wpływu różnych RNA na powstawanie kompleksu znakowanego [³H]-m⁷GpppGpC z białkiem wykazały, że czynnik CBP przyłącza się również do sekwencji m⁷GpppN obecnej w strukturze naturalnego informacyjnego mRNA. I tak np., stwierdzono powstawanie kompleksu czynnika CBP z globinowym, reowirusowym oraz krystalinowym mRNA (60). mRNA nie zawierające zablokowanego końca 5', jak RNA wirusów EMC i STNV, podobnie jak rybosomowe RNA z *Artemia salina* i *Escherichia coli*, nie tworzą kompleksu z białkiem CBP (60). Żaden ze znanych czynników inicjujących wyizolowanych z retikulocytów królika i wyszczególnionych w tabeli 2 nie tworzy specyficznego kompleksu z m⁷GpppGpC (60, 273). Być może, białko CBP jest więc dodatkowym czynnikiem inicjującym, zaangażowanym w przyłączanie zmodyfikowanego mRNA do rybosomu w czasie inicjacji. Za tą możliwością przemawia również spostrzeżenie, że dodatek frakcji CBP do układu bezkomórkowego zawierającego inne czynniki inicjujące stymuluje dodatkowo translację globinowego i reowirusowego mRNA (60).

O roli końcowej 7-metyloguanozyny w inicjacji biosyntezy białka świadczą również doniesienia o hamującym wpływie analogów końca 5' mRNA na translację. 5'-monofosforan 7-metyloguanozyny (m⁷G^{5'}p), w stężeniu 0,5—1mM, hamuje prawie całkowicie translację mRNA z komórek HeLa oraz mRNA reowirusowego i globinowego, w układach bezkomórkowych z zarodków pszenicy i z *Artemia salina* (60, 266). m⁷G^{5'}p nie jest natomiast inhibitorem translacji *in vitro* RNA wirusów STNV i EMC, nie zawierających zmetylowanego końca 5' (266, 267). Silniejszymi od m⁷G^{5'}p inhibitorami translacji w układach z zarodków pszenicy i z *Artemia*

są m^7GTP oraz m^7GpppA^m i m^7GpppG^m (60), podczas gdy 2'(3')-monofosforan 7-metyloguanozyny, 5'-monofosforan guanozyny, $GpppG$ i $GpppA$ nie hamują lub też hamują tylko nieznacznie biosyntezę białka (60, 266). Tak więc, obok grupy metylowej w pozycji N^7 guanozyny, obecność grup fosforanowych połączonych wiązaniem estrowym z grupą 5'-OH jest również istotna dla aktywności inhibitorowej związku.

Ustalono, że $m^7G^{5'}p$ hamuje translację na etapie inicjacji. W obecności tego związku obserwuje się znaczne obniżenie przyłączania mRNA do rybosomów (242, 266—268). Efekt ten jest specyficzny dla mRNA zawierających zablokowany koniec 5'; $m^7G^{5'}p$ nie ma wpływu na przyłączanie RNA wirusa STNV do kompleksu inicjującego 80S (266, 268). Ostatnio Shafritz i wsp. (242) stwierdzili, że $m^7G^{5'}p$ hamuje również przyłączanie retikulocytowego czynnika inicjującego IF—M3 do mRNA. Podobnie jak w przypadku kompleksu mRNA — rybosom, $m^7G^{5'}p$ hamuje oddziaływanie czynnika IF—M3 tylko z mRNA zawierającym zmetylowany koniec 5' (242). Choć spostrzeżenie to przemawia za udziałem czynnika IF—M3 w rozpoznawaniu zmodyfikowanego końca 5' mRNA, inne dane mogą świadczyć przeciwko takiej możliwości. Wiadomo na przykład, że czynnik IF—M3 lub odpowiadający mu czynnik IF—E6 konieczny jest dla translacji *in vitro* zarówno zmetylowanego, globinowego mRNA jak i niezmetylowanego RNA wirusa EMC (3). Ponadto, jak wspomniano wyżej, czynnik IF—M3 nie tworzy, w przeciwieństwie do omówionego już białka CBP, kompleksu z wyizolowanym końcem reowirusowego mRNA o strukturze $m^7GpppGpC$ (60). W chwili obecnej trudno ustalić czy istnieje jakaś relacja między oddziaływaniem czynnika IF—M3 z mRNA a aktywnością białka CBP w rozpoznawaniu zablokowanego końca 5' eukariotycznego mRNA.

IV-2. Rola struktury mRNA w pobliżu kodonu inicjującego

Interesujących wyników dostarczyły badania Botha i wsp. (269) nad oddziaływaniem z rybosomami polirybonukleotydów zawierających różne końce 5'. Autorzy badali jednocześnie wpływ składu nukleotydowego polimerów na ich aktywność w przyłączaniu się do podjednostki rybosomowej 40S i rybosomu 80S z zarodków pszenicy. Do syntezy polirybonukleotydów o różnych 5' końcach użyli oni fosforylasy polinukleotydowej, stosując jako „primery” szereg analogów końca 5' reowirusowego mRNA, m.in. $m^7GpppG^m pC$, $GpppGpC$ i $ppGpC$. Okazało się, że sama obecność $m^7GpppG^m pC$ na końcu rybopolimeru o długości około 100 nukleotydów nie jest wystarczającym warunkiem dla przyłączenia się takiego modelowego mRNA do kompleksów inicjujących biosyntezę białka (Tabela 4). Aby zmodyfikowany, metylowany na końcu 5' polinukleotyd przyłączył się do podjednostki 40S, zawierać on musi sekwencję poli(U), poli(U,C) lub poli(A,C). Dla utworzenia kompleksu inicjującego 80S wy-

magana jest obecność fragmentów bogatych w A i U (Tabela 4). Porównanie aktywności poli(A,U) lub poli(A₂,U₂,G) zawierających i nie zawierających 5'-końców sekwencję m⁷GpppGpC świadczy, że obecność zmetylowanego końca stymuluje przyłączanie polimeru do rybosomów około 3—4-krotnie. Wyniki te wskazują, że dla wydajnego utworzenia kompleksu inicjującego 80S, modelowy mRNA musi posiadać strukturę m⁷GpppGpC na końcu 5' oraz sekwencję bogatą w nukleotydy A i U.

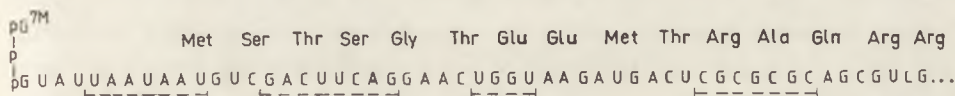
Tabela 4.

Wpływ modyfikacji końca 5' oraz składu zasad polirybonukleotydów na ich oddziaływanie z rybosomami zarodków pszenicy (269).

Rodzaj polirybonukleotydu			Procent polinukleotydu związany w kompleksie				
Struktura końca 5'	Dołączony polimer	Skład zasad (stosunki molowe)				40S	80S
		A:	C:	U:	G		
m ⁷ GpppGmpC	C	—	1	—	—	1	<1
	A	1	—	—	—	<1	3
	A·G	1	—	—	1.5	<1	<1
	C·G	—	1	—	1.1	<1	<1
	U·G	—	—	1	1.2	3	3
	A·U·G	0.8	—	1	1.2	<1	6
	A·U·C·G	0.74	1.3	1	1.26	<1	5
	U	—	—	1	—	38	7
	A·C	1	1.6	—	—	21	3
	U·C	—	1.2	1	—	48	4
	A·U	0.82	—	1	—	1	58
	A ₂ ·U	1.5	—	1	—	<1	46
	A·U ₂	1	—	2.6	—	<1	68
	A ₂ ·U ₂ ·G	0.8	—	1	0.6	7	43
A ₃ ·U ₃ ·G	2.34	—	3	1	7	64	
GpppGpC	U					5	<1
	A·U					<1	17
	A ₂ ·U ₂ ·G					3	20
ppGpC	U					<1	<1
	U·C					3	<1
	A·U					<1	13
	A ₂ ·U ₂ ·G					2	17

Wniosek ten potwierdzają badania Dasgupty i wsp. (81). Autorzy ci wyizolowali z RNA 4 wirusa BMV fragment odpowiedzialny za oddziaływanie tego mRNA z rybosomami z zarodków pszenicy. RNA 4 jest najmniejszą z czterech cząsteczek RNA obecnych w wirionach BMV. Jest on monocystronowym mRNA i w układzie bezkomórkowym z zarodków pszenicy stymuluje bardzo wydajnie syntezę wirusowego białka kapsydu. Analiza struktury pierwszorzędowej 53-nukleotydowego fragmentu RNA

przedstawionego na schemacie 4, dostarcza wielu interesujących informacji. Obecność zablokowanego zmetylowanego końca 5' w sekwencji inicjującej RNA 4 jest kolejnym bezpośrednim dowodem na rolę m⁷GpppN w inicjacji translacji. Kodon AUG od którego rozpoczyna się synteza białka kapsydu, oddalony jest tylko o 10 nukleotydów od końca 5' cząsteczki RNA. W mRNA prokariotów pierwszy funkcjonalny kodon inicjujący dzieli zwykle od końca 5' dystans od kilkudziesięciu do ponad stu nukleo-



Schemat 4. Fragment RNA 4 wirusa BMV rozpoznawany przez rybosom (81).

Nad sekwencją nukleotydów przedstawiona jest sekwencja aminokwasów N-końcowego odcinka białka kapsydu wirusa BMV. Linia przerywaną podkreślone są palindromalne sekwencje nukleotydów.

tydów (255, 270). Krótka sekwencja łącząca koniec 5' z kodonem AUG w RNA 4 zawiera jako zasady wyłącznie adeninę i uracyl. Sekwencja ta jest prawdopodobnie dodatkowym „sygnałem” rozpoznawanym przez rybosom lub czynnik białkowy w czasie inicjacji. Potwierdza to spostrzeżenia Botha i wsp. (269), dotyczące roli A i U w dołączaniu polirybonukleotydów do rybosomów 80S. Należy również podkreślić, że oligonukleotydy UAAUAAUA, znajdujący się blisko końca 5' RNA 4, zawiera aż sześć zasad komplementarnych do sekwencji AUCAUUA_{OH}, obecność której stwierdzono na końcu 3' rRNA 18S z mniejszej podjednostki rybosomowej eukariotów (271, 272). Być może więc, podobnie jak u prokariotów (258, 259) do oddziaływania rRNA—mRNA, dochodzi również podczas przyłączania się mRNA do rybosomów eukariotycznych. Nieznana jest rola licznych sekwencji palindromalnych występujących w okolicy kodonu inicjującego AUG (Schemat 4). Tego typu oligonukleotydy, o sekwencji niezależnej od kierunku odczytywania, występują również w miejscach inicjujących w prokariotycznych mRNA (274).

Dodatkowym elementem odgrywającym rolę w przyłączaniu rybosomów do mRNA w procesie inicjacji u eukariotów jest zapewne, podobnie jak w przypadku translacji bakteriofagowych RNA (23, 252, 253, 255), struktura uporządkowana samego RNA. Świadczą o tym wyniki badań nad translacją *in vitro* RNA izolowanych z cząstek niektórych wirusów roślinnych i zwierzęcych (275—280). I tak, na przykład stwierdzono, że RNA wirusa TMV stymuluje w układach *in vitro* lub w oocytach *Xenopus laevis* translację dwóch polipeptydów o masach cząsteczkowych 165 000 i 145 000, które być może, odpowiadają wirusowym replikazom RNA lub ich podjednostkom (275, 281). RNA wirusa TMV nie stymuluje jednakże w tych warunkach syntezy wirusowego białka kapsydu, chociaż wiadomo,

że RNA ten zawiera sekwencje nukleotydowe kodujące to białko. Hunter i wsp. (275) stwierdzili ostatnio, że aktywną matrycą dla syntezy białka kapsydu jest wyizolowany z zainfekowanych wirusem liści tytoniu niskocząsteczkowy RNA 9S, pochodzący z końca 3' wielkocząsteczkowego RNA obecnego w wirionach TMV. Mechanizm tworzenia się RNA 9S w zainfekowanych komórkach nie jest znany. Być może, powstaje on w wyniku fragmentacji TMV, RNA przez nukleazy.

Podobne uzależnienie ekspresji informacji zawartej w RNA od struktury cząsteczki zaobserwowano w przypadku wirusa BMV (276, 277). Oprócz opisanego powyżej RNA 4, wirus ten zawiera również cząsteczki większego RNA 3, które posiadają informację dla syntezy dwóch polipeptydów. Jednym z tych polipeptydów jest białko kapsydu, kodowane również przez cząsteczkę RNA 4. Jednakże, w przeciwieństwie do RNA 4, który bardzo wydajnie stymuluje tworzenie się białka kapsydu, w obecności RNA 3 syntetyzują się tylko nieznaczne ilości tego białka, a głównym produktem translacji *in vitro* jest drugi polipeptyd.

Tak więc, choć TMV RNA i BMV RNA 3 przypominają strukturalnie policistronowe mRNA występujące u bakterii, to zachowują się one jak mRNA o jednym aktywnym miejscu inicjującym biosyntezę polipeptydu. Wyniki świadczące o tym, że cistrony dla niektórych polipeptydów mogą być „zamaskowane” w strukturze cząsteczki wirusowych RNA, osiągnięto również w przypadku zwierzęcych wirusów Sindbis i Semliki (SFV) (278—280, 282).

Wydaje się, że przyczyną zablokowania części miejsc inicjujących w wirusowych RNA jest rozbudowana struktura przestrzenna RNA; wycięcie zablokowanego cistronu z całej cząsteczki RNA umożliwia jego wydajną translację. Istnieje również możliwość, że cistrony położone blisko końca 3' omówionych wirusowych RNA nie są tłumaczone z powodu ich zbyt dużego oddalenia od zmodyfikowanego końca 5' cząsteczki RNA. Przeciwno temu mogą jednakże przemawiać doniesienia, że bliskie sąsiedztwo końca 5' i kodonu inicjującego AUG nie jest bezwzględnie warunkiem dla inicjacji biosyntezy białka u eukariontów. W kilku laboratoriach (283—285) stwierdzono na przykład, że w eukariotycznych układach bezkomórkowych rybosomy wydajnie inicjują translację cistronu bakteriofagowego białka kapsydu oddalonego o ponad tysiąc nukleotydów od końca 5' RNA małych fagów *Escherichia coli* (Q_{β} , R17). Doświadczenia te wykazują jednocześnie, że fagowe RNA, które są policistronowymi mRNA i nie zawierają zmodyfikowanego końca 5', mogą być aktywnie i wiernie tłumaczone również w układach bezkomórkowych pochodzenia eukariotycznego.

Chociaż dane o mechanizmie przyłączania się rybosomów do mRNA w procesie inicjacji są ciągle fragmentaryczne i dotyczą tylko niewielkiej ilości różnych mRNA, można już w chwili obecnej stwierdzić, że za końcowy efekt w tej reakcji odpowiedzialny jest cały szereg rozmaitych od-

działywać. Jak wspomniano wyżej, istnieją na przykład mRNA, których translacja zależy niemal całkowicie od obecności 7-metyloguanozyny na końcu 5', podczas gdy translacja innych RNA (RNA wirusów EMC, Polio, STNV) nie wymaga modyfikacji końca cząsteczki RNA. O przyłączeniu niezmetylowanych RNA do rybosomu decydują prawdopodobnie: obecność odpowiedniej sekwencji nukleotydów obok kodonu inicjującego AUG, komplementarność tego fragmentu do rybosomalnego RNA 18S, łatwa dostępność miejsca inicjującego dla rybosomu lub wszystkie te czynniki łącznie. Podobnie, translacja różnych RNA może zależeć w różnym stopniu od bliskiego sąsiedztwa kodonu inicjującego i zmodyfikowanego lub niezmodyfikowanego końca 5' cząsteczki mRNA.

W ostatnim okresie pojawiło się również szereg prac postulujących rolę niskocząsteczkowego tcrRNA (ang. *translational control RNA*) w inicjacji translacji eukariotycznych mRNA (295—299). Tego typu RNA o masie cząsteczkowej 6000—11 000 wyizolowano między innymi z mięśni kurczęcia (296, 297), z retikulocytów królika (295) oraz z *Artemia salina* (299). He y w o o d i wsp. (296, 297) twierdzą, że tcrRNA specyficznie stymuluje translację homologicznego mRNA, podczas gdy hamuje inicjację syntezy białka w obecności mRNA pochodzącego z tkanek innych niż stosowany tcrRNA. W innych laboratoriach nie stwierdzono jednakże żadnej specyficzności w działaniu tcrRNA (298, 299). Dalsze badania potrzebne są dla rozstrzygnięcia, jaka jest rola tcrRNA w translacji.

Konsekwencją istnienia szeregu różnych elementów w oddziaływaniu mRNA—rybosom oraz tego, że niektóre mRNA mogą prawdopodobnie wykorzystywać tylko jeden z nich podczas gdy inne nawet kilka elementów jednocześnie, są różnice w sile oddziaływania różnych mRNA z rybosomami. Większe powinowactwo określonego mRNA do rybosomu może z kolei decydować o jego preferencyjnej translacji w stosunku do innych informacyjnych RNA obecnych w komórce. Problem istnienia informacyjnych RNA o różnym stopniu powinowactwa do rybosomów oraz rola tego zjawiska w regulacji translacji mRNA u eukariontów omówione są szeroko w pracach Lodisha (286—289). Według tego autora, każde niespecyficzne zahamowanie procesu inicjacji w układzie bezkomórkowym lub w całych komórkach prowadzić będzie do obniżenia translacji przede wszystkim tych mRNA, które słabo oddziałują ze składnikami aparatu biosyntezy białka. Zmiany w intensywności procesu biosyntezy białka w komórce mogą w ten sposób prowadzić do zmian jakościowych w profilu wytwarzanych przez komórkę białek. L o d i s h i wsp. (286—288) wykazali między innymi, że w układzie bezkomórkowym z retikulocytów królika translacja mRNA kodującego łańcuch β -globiny jest przez rybosomy inicjowana znacznie wydajniej niż translacja α -globinowego mRNA. Badacze ci przedstawiają szereg dowodów, że przyczyną tego zjawiska są cechy strukturalne samych informacyjnych RNA. Ostatnio pojawiło się wiele doniesień (290—294) dotyczących wydajności translacji różnych wi-

rusowych i komórkowych mRNA, potwierdzających słuszość założeń Lodisha. W swoich pracach (1, 286) Lodish poddaje również krytyce koncepcję istnienia białkowych czynników inicjujących, specyficznymi rozpoznających określone rodzaje lub klasy mRNA podczas translacji (patrz rozdz. III-2.). Twierdzi on, że zmiany w translacji różnych mRNA, podobne do obserwowanych przez badaczy postulujących istnienie specyficznych czynników, można wytłumaczyć również opierając się na hipotezie o decydującej roli oddziaływania mRNA—rybosom w regulacji translacji. Zgodnie z nią, dodatek czynnika białkowego stymulującego w sposób niespecyficzny proces translacji prowadziłby do zwiększonej translacji mRNA o słabym powinowactwie do rybosomu, nie mając wpływu na translację mRNA tłumaczonego wydajnie nawet w suboptymalnych warunkach.

Artykuł nadszedł 20.8.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 30.9.1976.

PISMIENICTWO

1. Lodish H. F., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 39—72.
2. Lengyel P., (1974), *Ribosomes*, red. Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., str. 13—52, Cold Spring Harbor Publishers, Cold Spring Harbor, Nowy York.
3. Staehelin T., Trachsel H., Erni B., Boschetti A., Schreier M. H., (1975) w *Proceedings of 10th FEBS Meeting 1975*, str. 309—323, North Holland Publ. Comp., Amsterdam.
4. Jackson R. J., (1975), w *Synthesis of Amino Acids and Proteins*, red. Arnstein H. R. V., str. 89—135, Butterworths, London.
5. Haselkorn R., Rothman-Denes L. B., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 397—438.
6. Ochoa S., Mazumder R., (1974), *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 10, str. 1—51, Academic Press, New York.
7. Lucas-Lenard J., Lipmann F., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 409—448.
8. Grankowski N., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 173—193.
9. Szafranski P., (1974), w *Molekularne podstawy biosyntezy białka*, red. Bober B., str. 1—73, Ossolineum Wrocław.
10. Weissbach H., Ochoa S., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 191—216.
11. Gąsior E., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 515—524.
12. Kaltschmidt E., Wittman H. G., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1276—1282.
13. Wool I. G., Stoffler G., (1974), *Ribosomes*, red. Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., str. 417—460, Cold Spring Harbor Publishers, Cold Spring Harbor, Nowy York.
14. Howard G. A., Traugh J. A., Croser E. A., Traut R. R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 391—404.
15. Shatkin A. J., (1976), *Cell*, **9**, 645—657.
16. Shatkin A. J., Banerjee A. K., Both G. W., (1976), *Comprehensive Virology*, red. Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R., (w druku), Plenum Press, New York.

17. Villa-Komaroff L., McDowell M., Baltimore D., Lodish H. F., (1974), *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. 30, str. 709—723, Academic Press, New York.
18. Roberts B. E., Paterson B. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2330—2334.
19. Schreier M., Staehelin T., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 329—349.
20. Filipowicz W., Sierra J. M., Ochoa S., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3947—3951.
21. Schatz G., Mason T. L., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 51—87.
22. Boulter D., Ellis R. J., Yarwood A., (1972), *Biol. Rev.*, **47**, 113—175.
23. Filipowicz W., Zagórski W., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 593—617.
24. Zalkin H., Yanofsky C., Squires C. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 465—475.
25. Palmiter R. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6779—6787.
26. Swan D., Aviv H., Leder P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1967—1971.
27. Lingrel J., (1975), „Synthesis of Amino Acids and Proteins”, red. Arnstein H. R. V., str. 295—327 Butterworths, London.
28. Smith A. E., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 301—313.
29. Oberg B. F., Shatkin A. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3589—3593.
30. Villa-Komaroff L., Guttman N., Baltimore D., Lodish H. F., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4157—4161.
31. Esteban M., Kerr I. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **45**, 567—576.
32. Oberg B. F., Shatkin A. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1186—1191.
33. Kennel D., Simmons C., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 451—464.
34. Mosteller R. D., Rose J. K., Yanofsky C., (1970), *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, **35**, 461—466.
35. Bay P. N., Pearson M. L., (1975), *Nature*, **253**, 647—650.
36. Singer R. H., Penman S., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 321—334.
37. Schulman H. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **155**, 253—261.
38. Hunt J. A., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 487—498.
39. Palmiter R. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8260—8270.
40. Palmiter R. D., (1975), *Cell*, **4**, 189—197.
41. Perry R. P., Kelley D. E., (1974), *Cell*, **1**, 37—42.
42. Desrosiers R., Friderici K., Rottman F., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3971—3975.
43. Urushibara T., Furuichi Y., Nishimura C., Miura K.-I., (1975), *FEBS Letters*, **49**, 385—389.
44. Furuichi Y., Miura K.-I., (1975), *Nature*, **253**, 374—375.
45. Furuichi Y., Morgan M., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 362—366.
46. Wei C. M., Moss B., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 318—322.
47. Rottman F., Shatkin A. J., Perry R. P., (1974), *Cell*, **3**, 197—199.
48. Hewlett M. J., Rose J. K., Baltimore D., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 327—330.
49. Nomoto A., Lee Y. F., Wimmer E., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 375—380.
50. Nuss D. L., Furuichi Y., Koch G., Shatkin A. J., (1975), *Cell*, **6**, 21—27.

51. Lesnaw J. A., Reichmann M. E., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 140—145.
52. Roman R., Brooker J. E., Seal S. N., Marcus A., (1976), *Nature*, **260**, 359—360.
53. Sommer S., Salditt-Georgieff M., Bachenheimer S., Darnell J. E., Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A. J., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 749—765.
54. Salditt-Georgieff M., Jelinek W., Darnell J. E., Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A. J., (1976), *Cell*, **7**, 227—237.
55. Perry R. P., Kelley D. E., Friderici K. H., (1975), *Cell*, **6**, 13—19.
56. Shibata H., Ro-Choi T. S., Reddy R., Choi Y. C., Henning D., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3909—3920.
57. Wei C. M., Gershowitz A., Moss B., (1975), *Cell*, **4**, 379—386.
58. Furuichi Y., Morgan M., Shatkin A. J., Jelinek W., Salditt-Georgieff M., Darnell J. E., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1904—1908.
59. Lavi S., Shatkin A. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2012—2016.
60. Filipowicz W., Furuichi Y., Sierra J. M., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., Ochoa S., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1559—1563.
61. Muthukrishnan S., Both G. W., Furuichi Y., Shatkin A. J., (1975), *Nature*, **255**, 33—37.
62. Dubin D. T., Taylor R. H., (1975), *Nucl. Acid. Res.*, **2**, 1653—1668.
63. Moyer S. A., Banerjee A. K., (1976), *Virology* **70**, 339—351.
64. Perry R. P., Kelley D. E., (1975), *Cell*, **4**, 387—394.
65. Wei C. M., Gershowitz A., Moss B., (1975), *Nature*, **257**, 251—253.
66. Perry R. P., Kelley D. E., (1975), *Cell*, **6**, 13—19.
67. Wei C. M., Gershowitz A., Moss B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 387—401.
68. Adams J. M., Cory S., (1975), *Nature*, **255**, 28—33.
69. Desrosiers R. C., Friderici K. H., Rottman F. M., (1975), *Biochem.*, **14**, 4267—4374.
70. Perry R. P., Scherer K., (1975), *FEBS Letters* **57**, 73—78.
71. Yang N. S., Manner R. F., Gage P., (1976), *Cell*, **7**, 339—347.
72. Muthukrishnan S., Filipowicz W., Sierra J. M., Both G. W., Shatkin A. J., Ochoa S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9336—9341.
73. Dottin R. P., Weiner A. M., Lodish H. F., (1976), *Cell*, **8**, 233—244.
74. Dubin D. T., Stollar V., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1373—1379.
75. Rose J. K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8098—8104.
76. Keith J., Fraenkel-Conrat H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3374—3350.
77. Furuichi Y., Shatkin A. J., Stavnezer E., Bishop J. M., (1975), *Nature*, **257**, 618—620.
78. Pinck L., (1975), *FEBS Letters*, **59**, 24—28.
79. Zimmermann D., (1975), *Nucl. Acids Res.*, **2**, 1189—1200.
80. Keith J., Fraenkel-Conrat H., (1975), *FEBS Letters*, **57**, 31—33.
81. Dasgupta R., Shih D. S., Saris C., Kaesberg P., (1975), *Nature*, **256**, 624—628.
82. Furuichi Y., Muthukrishnan S., Tomasz J., Shatkin A. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, (w druku).
83. Martin S. A., Paoletti E., Moss B., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9322—9329.
84. Martin S. A., Moss B., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9330—9335.
85. Abraham G., Rhodes D. P., Banerjee A. K., (1975), *Cell*, **5**, 51—58.

86. Taylor R. H., Dubin D. T., (1975), *J. Cell Biol.*, **67**, 428a.
87. Kates J., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 743—752.
88. Lim L., Canellakis E. S., (1970), *Nature*, **227**, 710—712.
89. Darnell J. E., Wall R., Tushinski R. J., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1321—1325.
90. Edmonds M., Vaughan M. H. Jr., Nakazoto H., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1336—1340.
91. Lee S. Y., Mendecki J., Brawerman G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1331—1335.
92. Darnell J. E., Jelinek W. R., Molloy G. R., (1973), *Science*, **181**, 1215—1221.
93. Weinberg R. A., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 329—354.
94. Galet H., Prevec L., (1973), *Nature, New Biology*, **243**, 200—203.
95. Slater I., Gillespie D., Slater D. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 406—411.
96. Wilt F. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2345—2349.
97. Reed J., Wintersberger E., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 213—217.
98. Mendecki J., Lee S. Y., Brawerman G., (1972), *Biochemistry*, **11**, 792—798.
99. Nakazoto H., Kopp D. W., Edmonds M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1472—1476.
100. Lodish H. F., Jacobson A., Firtel R., Alton T., Tuchman J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 5103—5108.
101. Gillespie D., Marshall S., Gallo R. C., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 227—231.
102. Yogo Y., Wimmer E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1877—1882.
103. Greenberg J. R., (1975), *J. Cell Biol.*, **64**, 269—288.
104. Brysch B., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 377—391.
105. Adesnik M., Darnell J. E., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 396—406.
106. Stoltzfus C. M., Shatkin A. J., Banerjee A. K., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7993—7998.
107. Milcarek C., Price R., Penman S., (1974), *Cell*, **3**, 1—10.
108. Nemer M., Graham M., Dubroff L. M., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 435—454.
109. Sierra J. M., Filipowicz W., Ochoa S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 181—189.
110. Nakazoto H., Venkatesan S., Edmonds M., (1975), *Nature*, **256**, 144—146.
111. Hirsch M., Spradling A., Penman S., (1973), *Cell*, **1**, 31—36.
112. Hendler F. J., Padmanaban G., Patzer J., Ryan R., Rabino-witz M., (1975), *Nature*, **258**, 357—359.
113. Brawerman G., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 621—642.
114. Sippel A. E., Stavrianopoulos J. G., Schutz G., Feigelson P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4635—4639.
115. Soreq H., Nudel U., Salomon R., Revel M., Littauer U. Z., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 233—245.
116. Huez G., Marbaix G., Hubert E., LeClercq M., Nudel U., Soreq H., Salomon R., Lebleu B., Revel M., Litauer U. Z., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3143—3146.
117. Nudel U., Soreq H., Littauer U. Z., Marbaix G., Huez G., LeClercq M., Hubert E., Chantrenne H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **64**, 115—121.

118. Jevett P. B., Hieter P. A., LeGendre S. M., Dorr R. G., (1975), *Nature*, **256**, 340—341.
119. Greenberg J. R., Perry R. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 361—366.
120. Sheiness D., Darnell J. E., (1973), *Nature, New Biology*, **241**, 265—268.
121. Perkins L. A., Abrass I. B., Miller H. I., Rosenfeld M. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **240**, 6990—7005.
122. Nemer M., Dubroff L. M., Graham M., (1975), *Cell*, **6**, 171—178.
123. Doel M. T., Carey N. H., (1976), *Cell*, **8**, 51—58.
124. Slater D. W., Slater I., Gillespie D., (1972), *Nature*, **240**, 333—337.
125. Mescher A., Humphreys T., (1974), *Nature*, **249**, 138—139.
126. Fromson D., Duchastel A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 394—404.
127. Morrison M. R., Gorski J., Lingrel J. B., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 775—781.
128. Aviv H., Leder P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1408—1412.
129. Schechter I., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2256—2260.
130. Lebleu B., Marbaix G., Temmerman J., Burny A., Chantrenne H., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 264—269.
131. Blobel G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 88—95.
132. Williamson R., (1973), *FEBS Letters*, **37**, 1—6.
133. Spirin A. S., (1972), w *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch, str. 515—531. North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, London.
134. Jachymczyk W., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 119—147.
135. Spirin A. S., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **10**, 20—35.
136. Jacobs-Lorena M., Baglioni C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1425—1428.
137. Gander E. S., Stewart A. G., Morel C., Scherrer K., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 443—452.
138. Kumar A., Lindberg U., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 681—685.
139. Kumar A., Pederson T., (1975), *J. Mol. Biol.*, **96**, 353—365.
140. Liautard J. P., Setyono B., Spindler E., Köhler K., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **425**, 373—383.
141. Barrieux A., Ingraham H. A., David D. N., Rosenfeld M. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1815—1821.
142. Bryan R. N., Hayashi M., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 271—274.
143. Chen J. H., Lavers G. C., Spector A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **418**, 39—51.
144. Baglioni C., (1974), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **241**, 183—190.
145. Blobel G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 924—938.
146. Kwan S., Brawerman G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3247—3250.
147. Baltimore D., Huang A. S., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 263—273.
148. Cashion L. M., Stanley W. M. Jr., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 436—440.
149. Ilan J., Ilan J., (1973), *Nature, New Biology*, **241**, 176—180.
150. Hellerman J. G., Shafritz D. A., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1021—1025.
151. Freistenstein C., Blobel G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3435—3439.
152. Raff R. A., Colot H. V., Selvig S. E., Gross P. R., (1972), *Nature*, **235**, 211—214.

153. Gross P. R., (1967), *Curr. Topics in Dev. Biol.*, red. Moscona A., Monroy A., 2, str. 1—14, Academic Press, New York and London.
154. Gross K. W., Ruderman J., Jacobs-Lorena M., Baglioni C., Gross P. R., (1973), *Nature, New Biology*, **241**, 272—274.
155. Schutz G. A., Chen D., Katchalski E., (1972), *J. Mol. Biol.* **66**, 379—390.
156. Hendrick D., Schwarz W., Pitzel S., Tiedemann H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 278—284.
157. Caskey C. T., Redfield B., Weissbach H., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 119—123.
158. Housman D., Jacobs-Lorena D., RajBhandary U. L., Lodish H. F., (1970), *Nature*, **227**, 913—918.
159. RajBhandary U. L., Ghosh H. P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1104—1113.
160. Takeishi K., Ukita T., Nishimura S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5761—5769.
161. Smith A. E., Marcker K. A., (1970), *Nature*, **226**, 607—610.
162. Brown J. C., Smith A. E., (1970), *Nature*, **226**, 610—613.
163. Gupta N. K., Chatterjee N. K., Bose K. K., Bhaduri S., Chung A., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 145—154.
164. Leis J. P., Keller E. B., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 416—421.
165. Ghosh K., Grishko A., Ghosh H. P., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 462—468.
166. Merrick W. C., Dure L. S. III, (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 641—645.
167. Richter D., Lipmann F., Tarrago A., Allende J. E., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1805—1809.
168. Yarwood A., Boulter D., Yarwood J. N., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 353—361.
169. Zasloff M., Ochoa S., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3059—3063.
170. Elson N. A., Adams S. L., Merrick W. C., Safer B., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3074—3079.
171. Strous G. J. A. M., Bollen Th., Bloemendal H., (1974), *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 471—475.
172. Morrison T., Stampfer M., Baltimore D., Lodish H. F., (1974), *J. Virol.*, **13**, 62—72.
173. Simsek M., RajBhandary U. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 508—511.
174. Piper P. W., Clark B. F. C., (1974), *Nature*, **274**, 516—518.
175. Simsek M., RajBhandary U. L., Boissard M., Petrissant G., (1974), *Nature*, **247**, 518—521.
176. Gillum A., Urquhart N., Smith M., RajBhandary U. L., (1975), *Cell*, **2**, 85—95.
177. Cytowane w pozycji 186.
178. Ghosh K., Ghosh H. P., Simsek M., RajBhandary U. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4720—4729.
179. Simsek M., Ziegenmeyer J., Heckman J., RajBhandary U. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1041—1045.
180. Petrissant G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1046—1049.
181. Piper P. W., Clark B. F. C., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 265—267.
182. Simsek M., Petrissant G., RajBhandary U. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2600—2604.

183. Rich A., Raj Bhandary U. L., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860.
184. Dube S. K., Marker K. A., Clark B. F. C., Cory S., (1968), *Nature*, **218**, 232—234.
185. Ecarot B., Cedergren R. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 400—405.
186. Walker R. T., Raj Bhandary U. L., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 61—78.
187. Stanley W. M. Jr., (1972), *Anal. Biochem.*, **48**, 202—216.
188. Miller R. L., Schweet R., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 632—646.
189. Filipowicz W., Sierra J. M., Nombela C., Ochoa S., Merrick W. C., Anderson W. F., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 44—48.
190. Merrick W. C., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1197—1206.
191. Safer B., Anderson W. F., Merrick W. C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9067—9075.
192. Merrick W. C., Kemper W. M., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5556—5562.
193. Safer B., Adams S. L., Kemper W. M., Berry K. W., Lloyd M., Merrick W. C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2584—2588.
194. Schreier M. H., Staehelin T., (1973), *Nature, New Biology*, **242**, 35—38.
195. Zasloff M., Ochoa S., (1973), *J. Mol. Biol.*, **73**, 65—76.
196. Adams S. L., Safer B., Anderson W. F., Merrick W. C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9083—9089.
197. Nombela C., Nombela N. A., Ochoa S., Merrick W. C., Anderson W. F., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 409—416.
198. Nombela C., Nombela N. A., Ochoa S., Safer B., Anderson W. F., Merrick W. C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 298—301.
199. Gąsior E., Rao P., Moldave K., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **254**, 331—340.
200. Gąsior E., Moldave K., (1972), *J. Mol. Biol.*, **66**, 391—402.
201. McCuiston J., Parker R., Moldave K., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 387—398.
202. Leader D. P., Wool I. G., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **262**, 360—370.
203. Picciano D. J., Prichard P. M., Merrick W. C., Shafritz D. A., Graf H., Crystal R. G., Anderson W. F., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 204—214.
204. Eich F., Drews J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 334—338.
205. Shafritz D. A., Anderson W. F., (1970), *Nature*, **227**, 918—920.
206. Cimadevilla J. M., Hardesty B., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4389—4397.
207. Torano A., Sandoval A., Sanjose C., Heredia C. F., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 11—14.
208. Nombela C., Nombela N. A., Ochoa S., (1974), w Lipmann Symposium, red. Richter D., str. 435—442, Walter de Gruyter, Berlin.
209. Gupta N. K., Woodley C. L., Chen Y. C., Bose K. K., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4500—4511.
210. Cashion L. M., Stanley W. M., Jr., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 436—440.
211. Suzuki H., Goldberg I. H., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4259—4263.
212. Levin D. H., Kyner D., Acs G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6416—6425.
213. Grummt F., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 337—342.
214. Kemper W. M., Berry K. W., Merrick W. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5551—5557.

215. Gupta N. K., Chatterjee B., Chen Y. C., Majumdar A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 853—862.
216. Dettman G. L., Stanley W. M. Jr., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 124—133.
217. Levin D. H., Kyner D., Acs G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 41—45.
218. Treadwell B. Y., Robinson W. G., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 176—183.
219. Ranu R. S., Wool I. G., (1975), *Nature*, **257**, 616—618.
220. Safer B., Adams S. L., Anderson W. F., Merrick W. C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9076—9082.
221. Walton G. M., Gill G. N., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 231—245.
222. Filipowicz W., Sierra J. M., Ochoa S., wyniki nie opublikowane.
223. Strycharz W. A., Ranki M., Dahl H.-H. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **48**, 303—310.
224. Prichard P. M., Anderson W. F., (1974), *Methods in Enzymology* red. Moldave K., Grossman L., t. 30, str. 136—141. Academic Press, New York.
225. Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2428—2431.
226. Thompson W. C., Buzash E. A., Heywood S. M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4559—4565.
227. Heywood S. M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1782—1788.
228. Ilan J., Ilan J., (1971), *Dev. Biol.*, **25**, 280—292.
229. Nudel U., Lebleu B., Revel M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2139—2144.
230. Wigle D. T., Smith A. E., (1973), *Nature, New Biology*, **242**, 136—140.
231. Stavnezer J., Huang R. C., (1971), *Nature, New Biology*, **230**, 172—176.
232. Pemberton R. E., Housman D., Lodish H., Baglioni C., (1972), *Nature, New Biology*, **235**, 99—103.
233. Mathews M. B., Osborn M., Berns A. J. M., Bloemendal H., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 5—7.
234. Berns A. J. M., Strous G. J. A. M., Bloemendal H., (1972), *Nature, New Biology*, **236**, 7—9.
235. Mathews M. B., Pragnell I. B., Osborn M., Arnstein H. R. V., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **287**, 113—123.
236. Rhoads R. E., McKnight G. S., Schimke R. T., (1972), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7407—7410.
237. Gurdon J. B., Lane C. D., Woodland H. R., Marbaix G., (1971), *Nature*, **233**, 177—182.
238. Berns A. J. M., van Kraaikamp M., Bloemendal H., Lane C. D., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1606—1609.
239. Wigle D. T., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 11—17.
240. Marcus A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 955—961.
241. Marcus A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 962—966.
242. Shafritz D. A., Weinstein J. A., Safer B., Merrick W. C., Hickey E. D., Baglioni C., (1976), *Nature*, **261**, 291—294.
243. Darnbrough C., Legon S., Hunt T., Jackson R. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **76**, 379—403.
244. Noll M., Noll H., (1972), *Nature, New Biology*, **238**, 225—228.
245. Noll M., Noll H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 477—494.
246. Jay G., Kaempfer R., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3199—3203.

247. Rudland P. S., Whybrow W. A., Clark B. F. C., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 76—78.
248. Lockwood A., Chakraborty P. R., Maitra U., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3122—3126.
249. Groner Y., Revel M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **84**, 407—410.
250. Majumdar A., Bose K. K., Gupta N. K., Wahba A. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 137—140.
251. de Kloet S. R., Andrean B. A. G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **425**, 401—408.
252. Lodish H. F., (1970), *J. Mol. Biol.*, **50**, 689—702.
253. Lodish H. F., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 627—632.
254. Filipowicz W., Wodnar-Filipowicz A., Zagórska L., Szafrański P., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1272—1279.
255. Hindley J., (1973), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **26**, 269—320.
256. Steitz J. A., Jakes K., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4734—4738.
257. Steitz J. A., (1969), *Nature*, **224**, 957—963.
258. Shine J., Dalgarno L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1342—1346.
259. Shine J., Dalgarno L., (1975), *Nature*, **254**, 34—38.
260. Both G. W., Banerjee A. K., Shatkin A. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1189—1193.
261. Rose J. K., Lodish H. F., (1976), *Nature*, **262**, 32—37.
262. Shih D. S., Dasgupta R., Kaesberg P., (1976), *J. Virology*, **19**, 637—642.
263. Muthukrishnan S., Morgan M., Banerjee A. K., Shatkin A. J., (1976), doniesienie ustne.
264. Both G. W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., (1975), *Cell*, **6**, 185—195.
265. Kozak M., Shatkin A. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4259—4266.
266. Hickey E. D., Weber L. A., Baglioni C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 19—23.
267. Canaani D., Revel M., Groner Y., (1976), *FEBS Letters*, **64**, 326—331.
268. Roman R., Brooker J. E., Seal S. N., Marcus A., (1976), *Nature*, **260**, 359—360.
269. Both G. W., Furuichi Y., Muthukrishnan S., Shatkin A. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 637—658.
270. Weissmann C., Billeter M. A., Goodman H. C., Hindley J., Weber H., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 303—328.
271. Shine J., Dalgarno L., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 609—615.
272. Eladari M. E., Galibert F., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 247—255.
273. Sierra J. M., Ochoa S., Shatkin A. J., doniesienie ustne.
274. Pieczenik G., Model P., Robertson H. G., (1974), *J. Mol. Biol.*, **90**, 191—214.
275. Hunter T. R., Hunt T., Knowland J., Zimmermann D., (1976), *Nature*, **260**, 759—764.
276. Shih D. S., Lane L. C., Kaesberg P., (1972), *J. Mol. Biol.*, **64**, 353—362.
277. Shih D. S., Kaesberg P., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1799—1803.
278. Simmons D. T., Strauss J. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 397—409.
279. Clegg J. C. S., Kennedy S. I. T., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 175—183.
280. Lachmi B. E., Kaariainen L., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1936—1940.
281. Knowland J., (1974), *Genetics*, **78**, 383—394.
282. Cancedda R., Villa-Komaroff L., Lodish H. F., Schlesinger M., (1975), *Cell*, **6**, 215—222.

283. Aviv H., Boime I., Loyd B., Leder P., (1972), *Science*, **178**, 1293—1295.
284. Schreirer M. H., Staehelin T., Gesteland R. F., Spahr P. F., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 575—578.
285. Morrison T. G., Lodish H. F., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 315—319.
286. Lodish H. F., (1974), *Nature*, **251**, 385—388.
287. Lodish H. F., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7131—7138.
288. Temple G., Lodish H. F., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 971—979.
289. Lodish H. F., Desalu O., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3520—3527.
290. Both G. W., Lavi S., Shatkin A. J., (1975), *Cell*, **4**, 173—180.
291. McDowell M., Villa-Komaroff L., Joklik W., Lodish H. F., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2649—2653.
292. Nuss D. L., Oppermann H., Koch G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1258—1262.
293. Nuss D. L., Koch G., (1976), *J. Mol. Biol.* **102**, 601—612.
294. Nuss D. L., Koch G., (1976), *J. Virol.*, **19**, 572—578.
295. Bogdanovsky D., Hermann W., Schapira G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 25—32.
296. Heywood S. M., Kennedy D. S., Bester A. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2428—2431.
297. Kennedy D. S., Bester A. J., Heywood S. M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 365—373.
298. Berns A., Salden M., Bogdanovsky D., Raymondjean M., Schapira G., Bloemendal H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 714—718.
299. Lee-Huang S., Sierra J.M., Naranjo R., Filipowicz W., Ochoa S., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, (w druku).

KATARZYNA GONTA-GRABIEC *

Rola poliprenoli w przenoszeniu reszt cukrowych

The Role of Polyrenols in Sugar Moiety Transfer

Spis treści

I. Udział poliprenoli w biosyntezie składników ścian bakteryjnych

I-1. Budowa ściany bakteryjnej

I-2. Biosynteza polimannanu

I-3. Biosynteza peptydoglikanu

I-4. Biosynteza determinantów O-antygenowych

I-5. Biosynteza polisacharydów otoczki bakteryjnej

I-6. Biosynteza kwasów teichowych.

II. Biosynteza celulozy u *Acetobacter xylinum*

III. Udział poliprenoli w biosyntezie zwierzęcych glikanów

IV. Udział poliprenoli w biosyntezie glikanów u grzybów i roślin

IV-1. Biosynteza mannoproteidów u drożdży

IV-2. Biosynteza mannanu u *Aspergillus niger*

IV-3. Biosynteza roślinnych glikanów

* Zagadnienia budowy, rozmieszczenia, biosyntezy i częściowo funkcji poliprenoli omówiono w *Postępkach Biochemii* w 1971 r. (1), dla przypomnienia podano niżej krótką charakterystykę poliprenoli.

Poliprenole są jednowodorotlenowymi alkoholami z węglowym szkieletem zbudowanym z połączonych reszt izoprenoidowych, których liczba waha się od 5 do 24 zależnie od pochodzenia danego poliprenolu. Poszczególne związki różnią się między sobą liczbą wiązań podwójnych i ich konfiguracją. Na ogół poliprenole występujące w organizmach żywych należą do jednej z dwóch grup: całkowicie *trans*-poliprenoli i *cis*, *trans*-poliprenoli (1).

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

Wykaz stosowanych skrótów: GDP — guanozynodwufosforan; CMP — cytydynomonofosforan; CDP — cytydynodwufosforan; TDP — tymidynodwufosforan; UMP — urydynomonofosforan; UDP — urydynodwufosforan; P — reszta fosforanowa; H₂N-Glu — glutamina; NAcGlc — N-acetyloglukozoamina; NAcMur — kwas N-acetylomuraminowy; GlcUA — kwas glukuronowy; Gal — galaktoza; Ram — ramnoza; Man — mannoza; Abe — abekwoza (3,6-dwudezoksy-D-galaktoza).

W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie rolą poliprenoli i ich pochodnych w biosyntezie polisacharydów i glikopeptydów, składników błon i ścian komórkowych.

I. Udział poliprenoli w biosyntezie składników ścian bakteryjnych

I-1. Budowa ściany bakteryjnej.

Podstawową strukturą ściany komórki bakteryjnej jest peptydoglikan zwany mureiną. Peptydoglikan jest heteropolimerem złożonym z łańcuchów, w których N-acetyloglukozamina i kwas N-acetylmuraminowy łączy się na przemian wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Takie proste, nierozgałęzione łańcuchy tworzą rdzeń mureiny. Reszty kwasu N-acetylmuraminowego łączą się z aminokwasami łańcuchów peptydowych wiązaniem amidowym. W skład łańcuchów peptydowych mureiny wchodzi następujące aminokwasy: L-alanina, kwas D-glutaminowy, kwas mezodwuaminopimelinowy, L-lizyna oraz D-alanina. Kwasy dwuaminowe: kwas mezodwuaminopimelinowy i L-lizyna odgrywają ważną rolę w tworzeniu sieci międzycząsteczkowej.

Tabela 1.

Podstawowe substancje występujące w ścianach bakterii gramdodatnich i gramujemnych (3)

Składniki ściany bakteryjnej	Bakterie	
	Gramdodatnie	Gramujemne
Glukozaminopeptydy	+	+
Polisacharydy	+	+
Oligosacharydy	+	-
Kwasy tejkowe	+	-
Kwasy tejkouronowe	+	-
Glikolipidy i śluzy	+	-
Białka	-	+
Lipidy	-	+
Lipopolisacharydy	-	+
Lipoproteidy	-	+

Druga grupa aminowa tych aminokwasów może łączyć się z końcową grupą karboksylową sąsiadujących łańcuchów peptydowych. Dzięki temu dwa heteropolimeryczne łańcuchy występujących na przemian N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączone są wiązaniami peptydowymi. W ten sposób powstaje olbrzymia, workowata cząsteczka — woreczek mureinowy. Woreczek ten pełni funkcję szkieletu podporowego ściany komórkowej. Bakterie gramdodatnie różnią się od gramujemnych zarówno budową szkieletu podporowego jak i występowaniem substancji dodatkowych na powierzchni ściany komórkowej (2). W tabeli 1 podano

substancje występujące w ścianach bakterii gramdodatnich i gramujemnych.

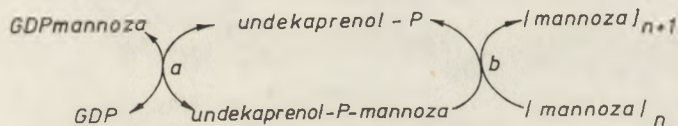
Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w ścianie komórkowej bakterii występują substancje nie spotykane w materiale zwierzęcym i roślinnym.

Z dotychczasowych prac wynika, że w biosyntezie przynajmniej sześciu różnych glikanów ściany bakteryjnej występują produkty pośrednie połączone z lipidem (4). W większości przypadków, bezpośrednia analiza chemiczna wykazała, że lipidem tym jest fosforan undekaprenolu. Undekaprenol, wyizolowany z komórek bakteryjnych jest poliprenolem zawierającym dwa wiązania podwójne o konfiguracji *trans*. W bakteriach występują również niewielkie ilości *di-trans-poli-cis-prenoli* o długości łańcucha odpowiadającej 10 i 12 jednostkom izoprenylowym (1, 4).

I-2. Biosynteza polimannanu.

Polimannan, składnik ścian bakteryjnych, jest rozgałęzionym polisacharydem zbudowanym z reszt mannozy połączonych wiązaniami glikozydowymi 1—2, 1—3 i 1—6.

Lenarz i wsp. (5, 6, 7) badając biosyntezę polimannanu u *Micrococcus lysodeikticus*, otrzymali po inkubacji preparatu ściany bakteryjnej i endogennych lipidów, otrzymanego z tego mikroorganizmu z GDP (^{14}C)mannozą oprócz (^{14}C)polimannanu również (^{14}C)mannolipid. Na podstawie wyników spektroskopii masowej i widma NMR stwierdzono, że część lipidowa mannolipidu jest *di-trans-poli-cis-prenolem-11* (undekapre-



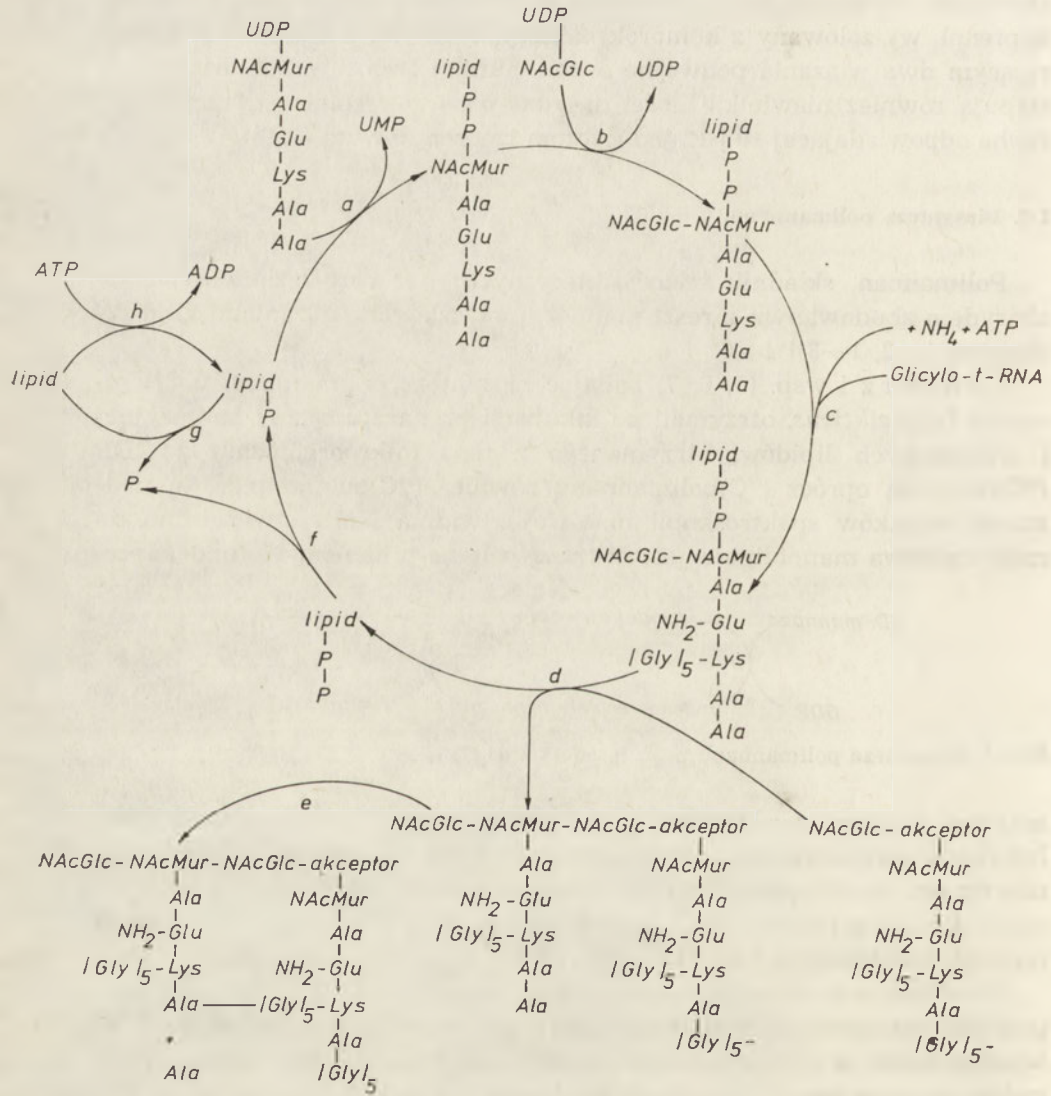
Ryc. 1. Biosynteza polimannanu u *M. lysodeikticus* (7).

nol) z niewielkimi domieszkami poliprenolu-10 (4%) i poliprenolu-12 (6%). Inkubacja preparatu z undekaprenylo(^{32}P)monofosforanem prowadzi do utworzenia undekaprenylo(^{32}P)monofosfomannozy. Na podstawie powyższych danych zaproponowano następujący schemat biosyntezy polimannanu u *M. lysodeikticus* (Ryc. 1):

Ustalono, że undekaprenylomonofosfomannoza występuje jako produkt pośredni jedynie w biosyntezie polimannanu ponieważ nie stwierdzono jej występowania w biosyntezie dwumannozyldwuglicerydu i oligomannozydów występujących również u *M. lysodeikticus*. (4). Wykazano, że dołączanie reszt mannozyliowych do nieredukującego końca powstającego mannanu zachodzi podobnie jak w syntezie glikogenu i skrobi (8), a odwrotnie niż w syntezie O-antygeny, (porównaj rozdział I-4.) gdzie jednostki cukrowe są dołączane do redukującego końca łańcucha cukrowego.

I-3. Biosynteza peptydoglikanu.

Strominger i wsp. (9—17) przeprowadzili liczne badania nad biosyntezą peptydoglikanu u *Staphylococcus aureus*, *M. lysodeikticus* i *Lactobacillus viridescens*. Badania te w pełni potwierdziły udział undekaprenolu w biosyntezie peptydoglikanu u wymienionych wyżej mikroorganizmów. Na rycinie 2 przedstawiono postulowany przez autorów mechanizm biosyntezy peptydoglikanu u *S. aureus*.



lipid = undekaprenol

Ryc. 2. Biosynteza peptydoglikanu *S. aureus* (4; 16).

Natura chemiczna akceptora biorącego udział w biosyntezie peptydoglikanu nie została jeszcze wyjaśniona.

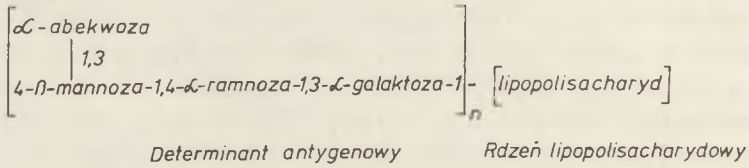
Po początkowym przeniesieniu fosforanu N-acetylmuramylopeptydu z nukleotydowego donora na undekaprenylomonofosforan (etap a) powstaje glikozydowe wiązanie β 1-4 (etap b) między kwasem N-acetylmuraminowym a N-acetyloglukozaminą. Modyfikacja łańcucha peptydowego (etap c) zachodzi przed powstaniem drugiego wiązania glikozydowego β 1-4 (etap d) i uwolnieniem undekaprenyldwufosforanu (17, 18). Modyfikacja ta polega na przekształceniu kwasu glutaminowego w glutaminę oraz na dołączeniu do ϵ -aminowej grupy lizyny kolejno pięciu reszt glicyny. W etapie e następuje utworzenie pentaglicylowego mostka pomiędzy alaniną a lizyną sąsiednich łańcuchów z odłączeniem reszty alanylowej (19). Undekaprenyldwufosforan uwolniony w etapie d jest defosforylowany (etap f) i może wejść ponownie w cykl biosyntetyczny. Do tej pory nie stwierdzono czy z udziałem prenylofosforanu zachodzi również synteza inicjującego łańcucha N-acetylmuraminopentapeptydowego. Badania izotopowe z zastosowaniem radioaktywnego fosforanu wykazały, że nadmiar UDP nie wpływa na kierunek reakcji etapu a, natomiast po dodaniu nadmiaru UMP do mieszaniny inkubacyjnej reakcja ta przebiega w przeciwnym kierunku (20, 21). Sugeruje to dwufosforanowe połączenie między undekaprenolem a N-acetylmuraminopentapeptydem. Za takim połączeniem przemawia również antybiotyczna aktywność bacytracyny (16, 22). Związek ten hamuje biosyntezę peptydoglikanu i prawdopodobnie innych polimerów ściany bakteryjnej. Inhibicja polega na tym, że bacytracyna łączy się z dwufosforanem undekaprenolu, co powoduje zahamowanie etapu f. Antybiotyk ten łącząc się z dwufosforanami całkowicie trans poliprenoli hamuje również prenylację prekursorów ubichinonów w bezkomórkowych preparatach wątroby szczura i *Rhodospirillum rubrum* (23). Nawet krótkołańcuchowe poliprenylopirofosforany wystarczająco silnie wiążą się z bacytracyną aby powodować zahamowanie biosyntezy cholesterolu w preparatach z wątroby szczura (4).

I-4. Biosynteza determinantów O-antygenowych.

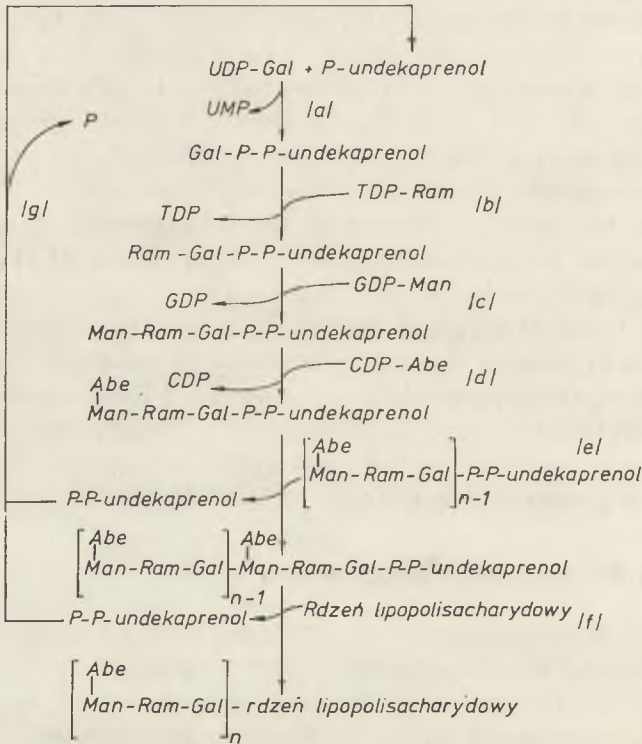
Wykazano, że związki poliprenylowe biorą również udział w biosyntezie determinantów O-antygenowych u *Salmonella typhimurium* i *S. newington* (24—34). Determinanty O-antygeny mieszczą się w polisacharydowej części kompleksów lipopolisacharydowych, będących składnikami błon *Salmonellae*. O-antygenowy łańcuch *S. typhimurium* składa się z rozgałęzionych, czterocukrowych, powtarzających się jednostek, które łączą się z resztą glukozy lipopolisacharydowego rdzenia (Ryc. 3).

Na przykładzie *S. typhimurium* przedstawiono kolejność reakcji prowadzących do syntezy O-antygenowego łańcucha (Ryc. 4). W pierwszym etapie (a) biosyntezy następuje odwracalne przeniesienie galaktozylomonofosforanu z UDP galaktozy na undekaprenylomonofosforan, z uwolnieniem UMP (24, 28). Kanegasaki i Wright (27) wykazali, przy zastoso-

waniu preparatów otoczki bakteryjnej *S. anatum*, że egzogenne galaktozylodwufosfundeaprenole służą jako akceptory ramnozy i mannozy (etap b i c). W przypadku *S. typhimurium* następuje przyłączenie abekwozy do utworzonego trójczukru połączonego z undekaprenolem. Podczas etapu d zachodzi polimeryzacja, która polega na przeniesieniu wcześniej utworzonej jednostki cukrowej z undekaprenylodwufosforanu na końcową resztę



Ryc. 3. Budowa lipopolisacharydowego antygeny *S. typhimurium* (35).



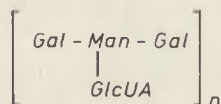
Ryc. 4. Schemat syntezy O-antygenowego łańcucha u *S. typhimurium* (36).

mannozy nowo utworzonego trójczukru (25, 30, 31). Ostatnim etapem w biosyntezie O-antygeny jest przeniesienie utworzonych oligosacharydów na lipopolisacharydowy rdzeń z jednoczesnym uwolnieniem dwufosforanu undekaprenolu. Regeneracja monofosforanu undekaprenolu zachodzi przez defosforylację jego dwufosforanu (etap g). Reakcję tę, podobnie jak to było w biosyntezie peptydoglikanu, hamuje bacytracyna (35).

Podobny udział undekaprenolu stwierdzono w biosyntezie zmodyfikowanych łańcuchów O-antygeny u odmian A, B, D₁, E *Salmonellae* (32, 33, 37—39).

1-5. Biosynteza polisacharydów otoczki bakteryjnej.

Troy i wsp. (40) wykazali udział związków poliprenylowych w biosyntezie otoczkowego polisacharydu u *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. Polisacharyd ten zbudowany jest z powtarzającego się trójcukru, galaktosylomannozylogalaktozy, z odgałęzieniami kwasu glukuronowego:



Wzór I. Polisacharyd otoczki *K. aerogenes* (40).

Autorzy ci zauważyli wzrost ilości(¹⁴C)galaktozy w fazie lipidowej w wyniku inkubacji frakcji otoczki komórkowej z UDP(¹⁴C)galaktozą w temperaturze 12°C. Na podstawie wyników spektroskopii masowej stwierdzono, że akceptorem lipidowym galaktozy jest fosforan undekaprenolu. Pierwszym etapem biosyntezy otoczkowego polisacharydu jest odwracalna reakcja, w wyniku której powstaje undekaprenyłodwufosfogalaktoza, z którą kolejno łączą się mannoza i galaktoza. Przyłączenie kwasu glukuronowego musi nastąpić przed przyłączeniem kolejnej reszty galaktozy. Wyizolowanie z kompleksu lipidowego oktasacharydu, który składał się z dwóch czterocukrowych jednostek, było jednocześnie potwierdzeniem, że polimeryzacja zachodzi z udziałem fosforanu undekaprenolu. Do tej pory nie poznano natury endogenego akceptora dla spolimeryzowanego oligosacharydu.

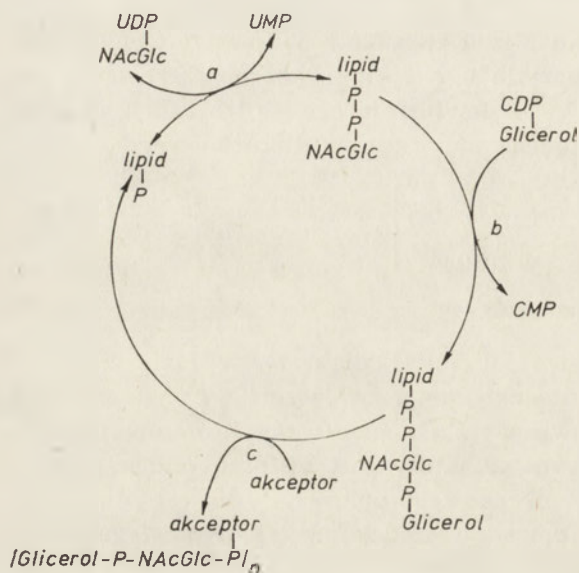
Stwierdzono również występowanie lipidu chromatograficznie podobnego do dwufosforanu undekaprenolu w biosyntezie polisacharydu otoczki *K. aerogenes* typu 8 (41).

1-6. Biosynteza kwasów tejchowych.

Ważną grupą polimerów występujących w błonach cytoplazmatycznych i ścianach komórkowych bakterii gramodatnich są kwasy tejchowe.

Douglas i Baddiley (42) zauważyli u *Staphylococcus lactis* I3 gromadzenie się kompleksu lipid-N-acetylo(¹⁴C)glukozamina podczas biosyntezy kwasu tejchowego, który zbudowany jest z N-acetyloglukozaminy i glicerolu połączonych wiązaniem fosfodwuestrowym. Autorzy ci obserwowano również przeniesienie aminocukru do kwasu tejchowego podczas inkubacji przemytego preparatu z CDP-glicerolem. Na podstawie przeprowadzonych badań Baddiley i wsp. (43, 44) zaproponowali schemat biosyntezy kwasu tejchowego u *S. lactis* I3 (Ryc. 5).

Lipid biorący udział w powyższej syntezie jak również w biosyntezie polimeru ściany bakteryjnej *S. lactis* 2102 (45, 46) nie został w pełni scharakteryzowany, ale wstępna analiza chemiczna sugeruje, że jest to undekaprenol (47).



Ryc. 5. Synteza kwasu teichowego u *S. lactis* 13 (44).

Jeszcze jednym dowodem przemawiającym za udziałem undekaprenolu w biosyntezie kwasów teichowych są badania przeprowadzone przez Watkinsona i wsp. (47), którzy wykazali współzawodnictwo między syntezą kwasów teichowych a syntezą peptydoglikanu u *S. lactis* 13. W przeprowadzonym doświadczeniu autorzy ci obserwowali włączenie w 83% substratu CDP(¹⁴C) glicerolu do kwasu teichowego. Wartość ta ulegała obniżeniu do 65% w warunkach, w których zachodziła równocześnie synteza peptydoglikanu. Warto podkreślić, że obydwie syntezy hamowała bacytracyna (47—49). Podobne współzawodnictwo tych dwóch biosyntez obserwowano w bezkomórkowych preparatach *Bacillus licheniformis* (48, 49).

II. Biosynteza celulozy u *Acetobacter xylinum*.

Celuloza nie występuje w ścianie komórkowej bakterii. Istnieją jednak nieliczne bakterie (*Acetobacter xylinum*, *Sarcina ventriculi*) zdolne do syntezy celulozy, ale wytwarzają ją tylko pozakomórkowo jako składnik śluzu. *A. xylinum* wydziela celulozę do środowiska w postaci delikatnych włókienek które nadają mu skórzastą zwartość.

Cooper i Manley (51—53) przedstawili dane doświadczalne popierające wcześniejszą sugestię, dotyczącą występowania produktów pośrednich połączonych z lipidem w biosyntezie celulozy u *A. xylinum* (50). Problem ten wymaga jednak dalszych, bardziej szczegółowych, badań.

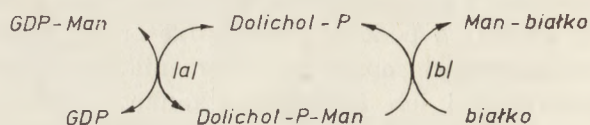
III. Udział poliprenoli w biosyntezie zwierzęcych glikanów.

Z danych przytoczonych w poprzednim rozdziale wynika, że fosforany poliprenoli pełnią u bakterii zasadniczą rolę w przenoszeniu reszt cukrowych z nukleotydowych donorów na wiele różnych akceptorów. Tymi akceptorami są na ogół połączone z błoną lub ścianą komórkową homopolisacharydy, glikolipidy i glikopeptydy. Ponieważ w organizmach zwierzęcych występują glikany o podobnej strukturze oraz poliprenole przeprowadzono badania dotyczące możliwości tworzenia pochodnych cukrowych fosforanów poliprenoli i ich funkcji w tkankach zwierzęcych (przede wszystkim ssaków). Z tkanek zwierzęcych wyizolowano poliprenole zawierające od 17 do 21 jednostek prenylowych, które nazwano dolicholami. Należą one do grupy *di-trans-poli-cis*-prenoli z tym, że wiązanie w końcowej reszcie prenylowej zawierającej grupę wodorotlenową jest uwodoro-
wane (1, 4).

W 1969 roku Caccam i wsp. (54) zauważyli powstawanie lipidu połączonego z mannozą we frakcji gładkich błon retikulum endoplazmatycznego wątroby królika, katalizującej przeniesienie mannozy z GDPmannozy do glikoproteidu. Badania *in vitro* nad szybkością włączania mannozy wykazały, że przeniesienie (^{14}C)mannozy z GDP(^{14}C)mannozy do lipidu było szybsze niż przeniesienie do białka. Dodanie nieznakowanej GDPmannozy do mieszaniny inkubacyjnej powodowało spadek radioaktywności w (^{14}C)mannolipidzie i jej wzrost w glikoproteidzie, sugerując tym samym występowanie lipidowego produktu pośredniego w biosyntezie glikoproteidu. Stosunek heksozy do fosforanu w częściowo oczyszczonym lipidzie wahał się w granicach od 1 : 1 do 2 : 1. Chromatograficzne własności wyizolowanego lipidu były zbliżone do undekaprenylofosfomannozy. Tworzenie podobnego kompleksu lipidowego stwierdzono również w mikrosomalnych preparatach mózgu myszy (55).

W kilka lat później przeprowadzono bardziej szczegółowe badania nad przeniesieniem mannozy do mannolipidu i glikoproteidu w mikrosomalnych preparatach wątroby świni (56). W wyniku inkubacji mikrosomalnego preparatu z GDP(^{14}C)mannożą otrzymano około 40% (^{14}C)mannozy w mannolipidzie i około 3% (^{14}C)mannozy w glikoproteidzie. Dodanie do mieszaniny egzogenego fosforanu dolicholu powodowało podwojenie tych wartości. Wstępna charakterystyka endogenego mannolipidu za pomocą spektroskopii masowej, IR i analizy chemicznej wykazała, że jest on identyczny z syntetyczną dolichylofosfomannożą. Na tej podstawie

Hemming i wsp. (56) zaproponowali poniższy schemat przeniesienia mannozy do białka w wątrobie świni (Ryc. 6). Występowanie monofosforanowego połączenia w dolichylomonofosfomannozy popiera fakt, że dodanie nadmiaru GDP do mieszaniny reakcyjnej powoduje odwrócenie etapu a (Ryc. 6), podczas gdy nadmiar GMP nie zmienia kierunku reakcji. Autorzy ci, badając specyficzność enzymu katalizującego etap a wykazali, że fosforan betulaprenolu (di-*trans*-poli-*cis*-prenole-6→9) powoduje podobnie jak egzogeny fosforan dolicholu 4-krotny wzrost ilości mannozy przeniesionej do lipidu, podczas gdy fosforan solanesolu (całkowicie-*trans*-poliprenol-9) był jedynie w 65% tak efektywny a fosforan fikaprenolu (tri-*trans*-poli-*cis*-prenole-9→13) w 30%. Wynika z tego, że enzym katalizujący tę reakcję wykazuje niską specyficzność do konfiguracji wiązań



Ryc. 6. Udział fosforanu dolicholu w przeniesieniu mannozy na białko w wątrobie świni (56).

podwójnych, długości łańcucha oraz nasycenia reszt izoprenowych poliprenoli. Warto jednak podkreślić, że najbardziej efektywne z przebadanych poliprenoli były di-*trans*-poli-*cis*-prenole (56, 57). Syntezę podobnych mannolipidów stwierdzono następnie w wielu tkankach zwierzęcych (58—67).

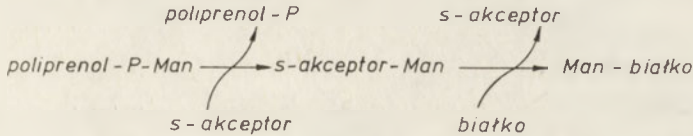
Wszegobecność fosforanów poliprenoli oraz ich cukrowych pochodnych w żywych komórkach sugeruje, że poliprenylofosfomannoza odgrywa zasadniczą rolę jako przenośnik zaaktywowanej reszty mannozy.

Dalsze badania nad biosyntezą glikoproteidów w tkankach zwierzęcych skupiły się nad ustaleniem czy mannoza ulega bezpośredniemu przeniesieniu z dolichylofosfomannozy na białko, czy też istnieje jakiś inny akceptor pośredniczący w tym procesie.

Waechter i wsp. (68) badając biosyntezę glikoproteidów błon jajo-wodu kury i tarczycy wołu obserwowali włączanie mannozy z GDP-mannozy do trzech produktów. Najszybciej powstającym produktem była poli-prenylofosfomannoza, podczas gdy pozostałe dwa produkty powstawały dużo wolniej. Te dwa produkty nazwane przez autorów s-akceptorem (*soluble acceptor*) i r-akceptorem (*residual acceptor*) mannozy różniły się znacznie rozpuszczalnością. S-akceptor nie ulegał rozpuszczeniu w mieszaninie chloroform—metanol (2 : 1) i w wodzie, ale rozpuszczał się w mieszaninie chloroform—metanol—woda (1 : 1 : 0,3). R-akceptor natomiast nie ulegał rozpuszczeniu w żadnym z wymienionych wyżej układów rozpuszczalników. Dalsza analiza r-akceptora wykazała, że jest on prawdopodobnie białkiem albo mieszaniną białek. Na podstawie badań kinetyki przeniesienia mannozy z GDP-mannozy na endogenne akceptory autorzy

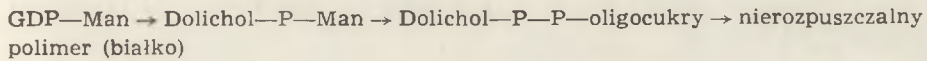
postulują zależność prekursor—produkt między poliprenylofosfomannozą a s- i r-akceptorami. W związku z tym zaproponowali oni poniższy schemat biosyntezy glikoproteidu (Ryc. 7).

Ponadto na podstawie badań przeprowadzonych w innych laboratoriach (69, 70) autorzy sugerują, że s-akceptor jest oligosacharydowym produktem pośrednim w biosyntezie glikoproteidu.



Ryc. 7. Schemat przeniesienia mannozy z poliprenylofosfomannozy na białko (68).

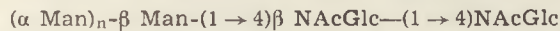
Powyższy wniosek potwierdzają ostatnie prace nad udziałem związków lipidowych w biosyntezie glikoproteidów i oligosacharydów (71—73). Obecnie uważa się, że białka nie zawierające reszt glikozylowych dają początek błonie plazmatycznej a następnie w tym hydrofobowym środowisku następuje wprowadzenie do białek łańcuchów oligosacharydowych poprzez przeniesienie oligosacharydu z kompleksu oligosacharyd—lipid (71—76). Hemmings i wsp. (72) zaproponowali następującą kolejność przeniesienia mannozy do białka (Ryc. 8).



Ryc. 8. Kolejność reakcji przeniesienia mannozy na białko (72).

Powyższą kolejność potwierdzają również badania nad aktywnością mannozylotransferazy dla której donorem mannozy jest dolichylofosfomannoza a akceptorem dolichylofosfooligosacharyd (4).

W dalszym toku badań podjęto próby scharakteryzowania oligosacharydowej części kompleksu oligosacharyd—lipid. Wykazano, że oligosacharydowy łańcuch zawiera od 7 do 13 reszt cukrowych (71, 72) o podanej niżej strukturze (76).

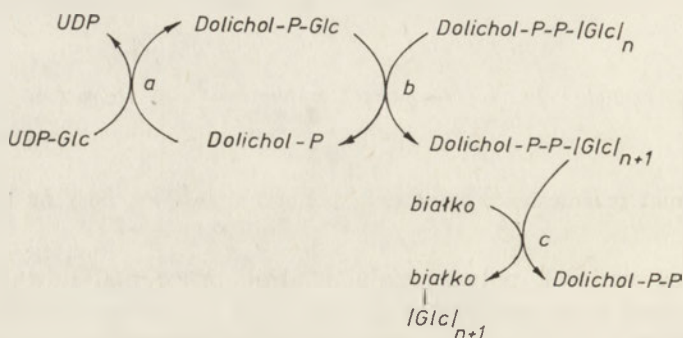


Wzór II. Struktura oligosacharydowego łańcucha kompleksu oligosacharyd—lipid (76).

Występowanie N-acetyloglukozaminy i mannozy w tych lipidowych kompleksach potwierdzają również prace innych autorów nad biosyntezą tych związków w preparatach wątroby szczura i jajowodu kury (77). Do tej pory najmniej wiadomo na temat białkowych akceptorów tych oligosacharydowych łańcuchów. Pless i wsp. (78) wyizolowali z preparatów

jajowodu kury trzy akceptorowe białka o nieznannej strukturze, których masa cząsteczkowa wahała się od 25 000 do 75 000.

Behrens i Leloir (58, 69, 70, 79, 80, 81) wykazali udział dolicholu w biosyntezie innego glikolipidu, scharakteryzowanego jako dolichylofosfoglukoza. Użyte przez autorów mikrosomalne preparaty z wątroby szczura katalizują ciąg reakcji przedstawionych na poniższym schemacie (Ryc. 9):



Ryc. 9. Schemat syntezy glikoproteidu, katalizowanej przez mikrosomalne preparaty z wątroby szczura (123).

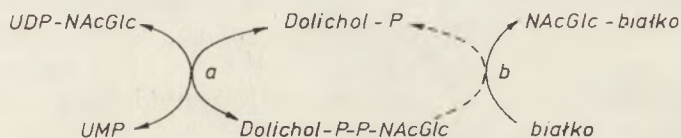
Powstawanie dolichylofosfoglukozy w etapie a potwierdzają badania Jankowskiego i Chojnackiego (82, 83). Ponadto autorzy ci obserwowali przeniesienie glukozy na endogenny fosforan fikaprenolu, co świadczy o niskiej specyficzności odpowiedniej transferazy do fosforanu poliprenolu.

Ponieważ stwierdzono, że ostatecznym akceptorem glukozy jest białko, podjęto próby w celu ustalenia czy dolichylofosfoglukoza bierze udział w glukozytacji kolagenu i ceramidu (58, 84, 85). Badania te dały negatywny wynik i jak do tej pory natura glikoproteidu ulegającego glukozytacji przy udziale dolichylofosfoglukozy pozostaje nieznaną.

Istnieją dowody na to, że pochodne poliprenoli biorą również udział w przeniesieniu N-acetyloglukozaminy na akceptor białkowy. Wykazano, że mikrosomalne preparaty wątroby królika katalizują przeniesienie aminocukru z nukleotydujących prekursorów do endogennego lipidu. Hamowanie tej reakcji zarówno przez UMP jak i UDP oraz przenoszenie równomolarnych ilości ^{32}P i ^{14}C z $(^{32}P)UDP(^{14}C)N$ -acetyloglukozaminą na lipid, sugeruje dwufosforanowe połączenie między N-acetyloglukozaminą a lipidem (dolicholem) (86, 87).

Leloir i wsp. (58) wykazali, że egzogeny fosforan dolicholu może służyć jako akceptor dla N-acetyloglukozaminy. Rycina 10 ilustruje powyższe wnioski z tym, że mechanizm etapu a nie jest całkiem jasny. Ostatnio zaproponowano, że etap a (Ryc. 10) może być również pierwszym etapem w powstawaniu dolichylofosfoligosacharydów o strukturze zbliżonej do przedstawionej wyżej (wzór 2) (88, 89).

W ostatnich latach wykazano, że fosforan retinolu bierze również udział w przenoszeniu reszt cukrowych (61, 90—95). Stwierdzono między innymi, że dodanie retinolu oraz ATP do mikrosomalnych preparatów wątroby szczura z niedoborem witaminy A powoduje takie same przeniesienie mannozy z GDP-mannozy na lipid jakie obserwuje się w preparatach otrzymanych z tkanek zdrowych szczurów. Badania izotopowe utworzonego lipidu wykazały, że zawiera on równomolarne ilości retinolu i mannozy oraz fosforan pochodzący z ATP (93).



Ryc. 10. Przeniesienie N-acetyloglukozaminy na białko przy udziale fosforanu dolicholu (87).

IV. Udział poliprenoli w biosyntezie glikanów u grzybów i roślin.

Poza tkankami zwierzęcymi dolichole wykryto w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*. Głównym składnikiem jest tu dolichol o długości łańcucha odpowiadającej 16 resztom izoprenowym. Najbardziej uwodorowane poliprenole wyizolowano z grzybów *Aspergillus fumigatus* i *A. niger*. Poliprenole te mają podobnie jak dolichole, uwodorowaną końcową resztę prenylową, zawierającą grupę wodorotlenową oraz dwie reszty prenylowe na przeciwległym końcu łańcucha. Są to heksahydropoliprenole zawierające dwa wiązania o konfiguracji *trans*, a pozostałe wiązania o konfiguracji *cis*. Długość łańcucha w tych związkach waha się od 19 do 23 jednostek prenylowych z wyraźną przewagą poliprenolu-21. U poliprenoli wyizolowanych z *A. niger* stwierdzono występowanie dodatkowej grupy metylenowej na węglowodorowym końcu łańcucha (1, 4, 110).

IV-1. Biosynteza mannoproteidów u drożdży.

U drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) występują mannoproteidy zawierające 50% a nawet 90% mannozy (96, 97). Wykazano, że większa część polimannanu łączy się z resztą asparaginy białka poprzez N-acetylochitobiozę (98). Ponadto przynajmniej część tych białek zawiera krótkie łańcuchy oligomannozy związane glikozydowo z resztami seryny i treoniny (99, 100).

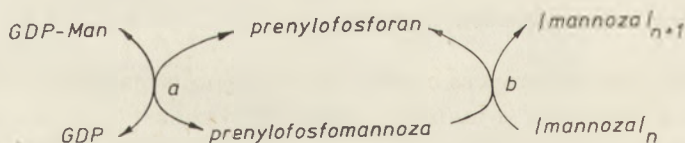
Ostatnie badania wskazują na udział lipidowych produktów pośrednich w biosyntezie mannoproteidów u drożdży (101—106). Produkty te scharakteryzowano jako pochodne fosforanu dolicholu (107). Warto podkreślić, że

w biosyntezie oligomannozylowych jednostek związanych z treoniną i seryną jedynie reszta mannozy bezpośrednio związana z aminokwasem jest przenoszona za pośrednictwem fosforanu dolicholu, podczas gdy donorem pozostałych reszt mannozy jest bezpośrednio GDP-mannoza (102, 108).

Ostatnio *Lehle i Tanner* (109) wykazali, że preparaty błon drożdży katalizują włącznie (^{14}C)N-acetyloglukozaminy z UDP(^{14}C)N-acetyloglukozaminy do glikolipidu i glikoproteidu. Okazało się, że wyizolowany glikolipid składał się z 3 składników. Dwa z nich scharakteryzowano jako dolichyldwufosfo-N-acetyloglukozaminę i dolichyldwufosfo-N-acetylochitobiozę. Obserwowano również przenoszenie mannozy z GDP-mannozy do drugiego składnika (109). Na podstawie pomiaru ciężaru cząsteczkowego stwierdzono, że oligosacharydowa część dolichyldwufosfooligosacharydu zawiera dwie reszty mannozy i dwie reszty N-acetyloglukozaminy. Ponieważ wykazano, że polisacharydowa część glikoproteidu składa się z wewnętrznego rdzenia (około 15 jednostek cukrowych) i z dłuższego zewnętrznego łańcucha, sugeruje się, że dolichyldwufosfooligosacharyd bierze udział jedynie w biosyntezie rdzenia, albo nawet tylko jego fragmentu, podczas gdy donorem w biosyntezie wysoce rozgałęzionej zewnętrznej części jest GDP-mannoza.

IV-2. Biosynteza mannanu u *Aspergillus niger*

Po wykryciu poliprenoli u *A. niger* prowadzono badania nad ich ewentualnym udziałem w przenoszeniu reszt cukrowych. *Barr i Hemming* (111) wykazali, że w skład produktów otrzymanych w wyniku inkubacji preparatu *A. niger* z GDP(14)-mannozą wchodzi mannelipid i mannan. Na podstawie chromatograficznych własności mannelipidu i jego labilności w środowisku kwasowym scharakteryzowano go jako heksahydropoliprenylofosfomannozę. Powyższe wyniki wskazują na to, że *A. niger* posiada mannozylotransferazy dla których akceptorem mannozy jest fosforan heksahydropoliprenolu. Następnym etapem w biosyntezie mannanu byłoby, zgodnie z tą sugestią, przeniesienie mannozy z powyższego kompleksu na mannan (Ryc. 11).



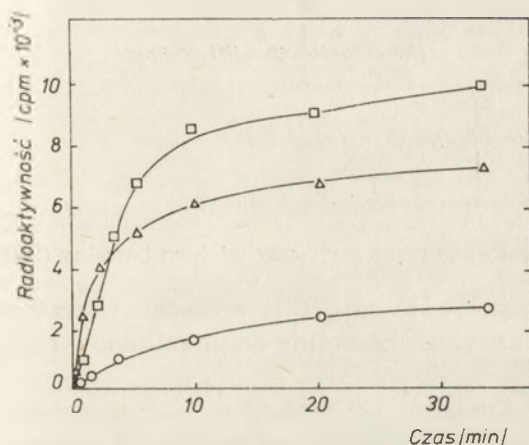
Ryc. 11. Schemat biosyntezy mannanu u *A. niger* (111).

IV-3. Biosynteza roślinnych glikanów.

W roślinach zachodzi biosynteza różnorodnych związków, w których skład wchodzi reszty cukrowe. Są to m.in. skrobia, celuloza, hemicelulozy, pektyny i glikoproteidy będące składnikami ścian komórkowych roślin.

Ich struktura i biosynteza są w tej chwili dość dobrze poznane (112, 113). Ponieważ u wielu roślin stwierdzono również występowanie wolnych poli-prenoli, takich jak solanesol (całkowicie-*trans*-polipreno^l-9) oraz tri-*trans*-poli-*cis*-prenole-9→13 (114, 117). wysunięto przypuszczenie, że mogą one lub ich pochodne brać udział w transporcie reszt cukrowych analogicznym do procesów obserwowanych u bakterii, ssaków i grzybów.

W początkowym okresie badań nad tym problemem obserwowano przeniesienia (¹⁴C)mannozy z GDP(¹⁴C)mannozy do endogennego lipidu w cząstkowych preparatach otrzymanych w większości przypadków z młodych kiełków fasoli (118—125). Wyizolowany mannilipid wykazywał własności chromatograficzne zbliżone do undekaprenylomonofosfomannozy. Identyfikacyjnie chromatograficznie lipid wyodrębniono z preparatów grochu (124).

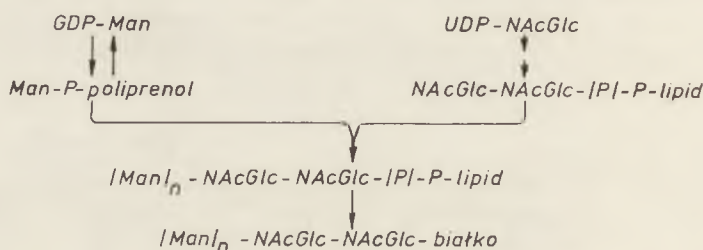


Ryc. 12. Przebieg włączania (¹⁴C)mannozy z GDP (¹⁴C)mannozy do różnych związków o preparacie enzymatycznym z włókien bawełny (130).

Produkty te zostały scharakteryzowane jako kompleks oligocukier-lipid (○—○), poliprenolofosfomannozy (Δ—Δ) oraz glikoproteid (□—□)

Poza przeniesieniem mannozy do lipidu, preparaty fasoli (*Phaseolus aureus*) katalizują również przeniesienie mannozy do glikoproteidów i polisacharydów (126). Szczegółowe badania nad tym procesem prowadzili Forsee i Elbein (127—130) stosując cząstkowe preparaty otrzymywane z dojrzałych włókien bawełny. Autorzy ci wykazali, że powyższe preparaty katalizują przeniesienie (¹⁴C)mannozy z GDP(¹⁴C)mannozy do oligosacharydów połączonych z lipidem i do glikoproteidów. Wyizolowane oligosacharydy z kompleksów oligosacharyd—lipid stanowiły mieszaninę w której najkrótszymi oligosacharydami były trójczukry o budowie mannozylo-N-acetyloglukozamino-N-acetyloglukozamina a najdłuższe składały się z około 10 jednostek cukrowych. Warto podkreślić, że kompleksy oligosacharyd—lipid o dłuższym łańcuchu cukrowym powstające w czasie powtórnej inkubacji preparatu włókien bawełny z dodatkiem nieznakowanej GDPmannozy zawierały radioaktywne trójczukry (130). Rycina 12 przedstawia włączanie mannozy z GDP(¹⁴C)mannozy do trzech różnych związków, katalizowane przez preparat enzymatyczny otrzymany z włókien bawełny.

Cząstkowe frakcje włókien bawełny katalizują również przenoszenie N-acetyloglukozaminy z UDP(³H)N-acetyloglukozaminy na lipidy i glikoproteidy. Gdy mieszanina inkubacyjna nie zawierała GDPmannozy zasadniczo cała N-acetyloglukozamina łączyła się z lipidem tworząc N,N'-dwuacetylochitobiozylodwufosfolipid. Dodanie GDPmannozy do powyższej mieszaniny powodowało spadek radioaktywności w lipidowym kompleksie z towarzyszącym mu pojawieniem się radioaktywności w kompleksie oligosacharyd—lipid. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że kompleks dwucukier—lipid służy jako akceptor reszt mannozy, po dołączeniu których powstaje oligosacharyd—lipid. Rycina 13 ilustruje postulowany mechanizm biosyntezy glikoproteidu.



Ryc. 13. Biosynteza glikoproteidu katalizowana przez preparaty włókien bawełny (130).

Ostatnio również Roberts i Pollard (131) wykazali włączanie N-acetyloglukozaminy z UDP-N-acetyloglukozaminy do glikolipidów i glikoproteidów w siewkach fasoli.

Z zestawienia danych na temat udziału poliprenoli w biosyntezie glikanów wynika, że są one niezbędne dla przebiegu tego procesu. W związku z niską polarnością wielu białek błon komórkowych (132) wydaje się, że jedną z funkcji fosforanów poliprenoli jest „wyłapywanie” cukrów w tym środowisku, ułatwiając tym samym działanie glikozylotransferaz zlokalizowanych w błonach (4). Uznanie powyższych procesów za ogólnobiologiczny mechanizm biosyntezy glikanów wymaga jednak dalszych, bardziej szczegółowych badań.

Arktukół nadszedł 3.8.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 18.9.1976.

PISMIENICTWO

1. Turowska G., (1971), *Post. Biochem.*, 17, 483—495.
2. Schlegel H. G., (1975), *Mikrobiologia ogólna*, 1 wyd., str. 44—56, PWRiL, Warszawa.
3. Salton M. R. J., (1964), *The Bacterial Cell Wall*, 1 wyd., str. 251, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
4. Hemming F. W., (1974), w *The Biochemistry of Lipids*, red. Goodwin T. W., t. 4, str. 39—97, University Park Press, Baltimore, Butterworths, London.

5. Scher M., Lennarz W. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2777—2789.
6. Lahav M., Chiu T. M., Lennarz W. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5890—5898.
7. Scher M., Lennarz W. J. Sweeley C. C., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 1313—1320.
8. Leloir L. F., De Fekete M. A. R., Cardini C. E., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 636—641.
9. Higashi Y., Strominger J. L., Sweeley C. C., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1878—1884.
10. Anderson J. S., Matsuhashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 881—889.
11. Anderson J. S., Matsuhashi M., Haskin M. A., Strominger J. L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3180—3190.
12. Plapp R., Strominger J. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3667—3674.
13. Plapp R., Strominger J. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3675—3682.
14. Higashi Y., Siewert G., Strominger J. L., *J. Biol. Chem.*, **245**, 3682—3690.
15. Higashi Y., Strominger J. L., Sweeley C.C., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3697—3702.
16. Strominger J. L., Higashi Y., Sanderman H., Stone K. J., Willoughby E., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 135—154, Academic Press, New York London.
17. Matsuhashi M., Dietrich C. P., Strominger J. L., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 587—594.
18. Kamiryo T., Matsuhashi M., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 215—222.
19. Ghuysen J., (1968), *Bacteriol. Rev.*, **32**, 425—431.
20. Struve W. F., Sinha R. K., Neuhaus F. C., (1969), *Biochemistry*, **5**, 82—93.
21. Heydanek M. G., Struve W. G., Neuhaus F. C., (1969), *Biochemistry*, **8**, 1214—1221.
22. Stone K. J., Strominger J. L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3223—3227.
23. Schechter N., Momose K., Rudney H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 833—839.
24. Wright A., Dankert M., Robbins P. W., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 235—241.
25. Robbins P. W., Bray D., Dankert M., Wright A., (1967), *Science*, **158**, 1536—1542.
26. Bray D., Robbins P. W., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 334—339.
27. Kanegasaki S., Wright A., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 951—957.
28. Weiner J. M., Higuchi T., Rothfield L., Saltmarsh-Andrew M., Osborn M. J., Horecker B. L., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 228—235.
29. Dankert M., Wright A., Kelley W. S., Robbins P. W., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 425—435.
30. Osborn M. J., Weiner J. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2631—2639.
31. Kent J. L., Osborn M. J., (1968), *Biochemistry*, **7**, 4396—4408.
32. Wright A., (1969), *Fed. Proc.*, **28**, 658.
33. Wright A., (1971), *J. Bacteriol.*, **105**, 927—936.

34. Wright A., Dankert M., Fennessey P., Robbins P. W., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **57**, 1798—1803.
35. Lennarz W. J., Scher M. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 417—441.
36. Osborn M. J., (1969), *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 501—538.
37. Nikaido H., Nikaido K., Nakae T., Makela P. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3902—3911.
38. Nikaido K., Nikaido H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3912—3919.
39. Takeshita M., Makela P. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3920—3927.
40. Troy F. A., Frerman F. E., Heath E. C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 118—133.
41. Sutherland J. W., Norval M., (1970), *Biochem. J.*, **120**, 567—576.
42. Douglas L. J., Baddiley J., (1968), *FEBS Letters*, **1**, 114—117.
43. Hancock I. C., Baddiley J., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 27—37.
44. Hussey H., Baddiley J., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 39—50.
45. Brooks D., Baddiley J., (1969), *Biochem. J.*, **113**, 635—642.
46. Brooks D., Baddiley J., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 307—314.
47. Watkinson R. J., Hussey H., Baddiley J., (1971), *Nature, New Biology*, **229**, 57—59.
48. Anderson R. G., Hussey H., Baddiley J., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 11—25.
49. Baddiley J., (1972), w *Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 337—343, Academic Press, New York London.
50. Dankert M., Garcia R., Recondo E., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 199—206, Academic Press, New York London.
51. Cooper D., Manley R. St. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 97—108.
52. Cooper D., Manley R. St. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 109—119.
53. Cooper D., Manley R. St. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 120—127.
54. Caccam J. F., Jackson J. J., Eylar E. H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 505—511.
55. Zatz M., Barondes S. H., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 511—517.
56. Richards J. B., Hemming F. W., (1972), *Biochem. J.*, **130**, 77—93.
57. Richards J. B., Evans P. J., Hemming F. W., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 207—220, Academic Press, New York London.
58. Behrens N. H., Parodi A. J., Leloir L. F., Krisman C. R., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **143**, 375—383.
59. Herscovics A., Tkacz J. S., Warren C. D., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 523.
60. Wedgewood J. F., Warren C. D., (1973), *Fed. Proc.* **32**, 523.
61. De Luca L., Maestri N., Rosso G., Wolfe G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 641—648.
62. Adamany A. M., Spiro R. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2842—2854.
63. Baynes J. W., Hsu A-F., Heath E. C., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5693—5704.
64. Wedgwood J. F., Strominger J. L., Warren C. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6316—6324.
65. Tkacz J. S., Herscovics A., Warren C. D., Jeanloz R. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6372—6381.
66. Alam S. S., Barr R. M., Richards J. B., Hemming F. W., (1971), *Biochem. J.*, **121**, 19P.

67. Richards J. B., Evans P. J., Hemming F. W., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 957—959.
68. Waechter C. J., Lucas J. J., Lennarz W. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7570—7579.
69. Behrens N. H., Parodi A. J., Leloir L. F., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2857—2860.
70. Parodi A. J., Behrens N. H., Leloir L. F., Carminatti H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3268—3272.
71. Oliver G. J. A., Hemming E. W., (1975), *Biochem. J.*, **152**, 191—199.
72. Oliver G. J. A., Harrison J., Hemming F. W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 223—229.
73. Lucas J. J., Waechter C. J., Lennarz W. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1992—2002.
74. Chambers J., Elbein A. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6904—6915.
75. Hsu A-F., Baynes J. W., Heath E. C., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2391—2395.
76. Chen W. W., Lennarz W. J., Tarentino A. L., Maley F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7006—7013.
77. Levy J. A., Carminatti H., Cantarella A. J., Behrens N. H., Leloir L. F., Tabora E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 118—125.
78. Pless D. D., Lennarz W. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7014—7019.
79. Behrens N. H., Leloir L. F., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 153—158.
80. Parodi A. J., Behrens N. H., Leloir L. F., Dankert M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 529—537.
81. Parodi A. J., Behrens N. H., Leloir L. F., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 195—198, Academic Press, New York London.
82. Jankowski W., Chojnacki T., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 93—97.
83. Jankowski W., Chojnacki T., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 51—69.
84. Bosmann H. B., Eylar E. H., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 89—94.
85. Basu S., Kaufman B., Roseman S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5802—5807.
86. Tetas M., Chao H., Molnar J., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 135—146.
87. Molnar J., Chao H., Ikehara Y., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 401—410.
88. Leloir L. F., Staneloni R. J., Carminatti H., Behrens N. H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 1285—1292.
89. Behrens N. H., Carminatti H., Staneloni R. J., Leloir L. F., Cantarella A. J., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3390—3394.
90. De Luca L., Schumacker M., Wolf G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4551—4558.
91. De Luca L., Rosso G., Wolf G., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 615—620.
92. Griffin M. J., Dickenson M., Chiba N., Johnson B. C., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 1134.
93. Rodriquez P., Bello O., Gaede K., (1972), *FEBS Letters*, **28**, 133—138.
94. Helting T., Peterson P. A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 429—436.

95. De Luca L., Maestri N., Rosso G., Wolf G., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 641—648.
96. Collona W. J., Lampen J. O., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2748—2753.
97. Van Rijn H. J. M., Boer P., Steyn-Parve E. P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 431—441.
98. Tarentino A. L., Plummer Jr. T. H., Maley F., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 818—824.
99. Sentandreu R., Northcote D. H., (1968), *Biochem. J.*, **109**, 419—432.
100. Nakajima T., Ballou C. E., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7679—7684.
101. Babczinski P., Tanner W., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1119—1124.
102. Sharma C. B., Babczinski P., Lehle L., Tanner W., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 35—41.
103. Braetthauer R. K., Wu S., Irwin E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 736—747.
104. Sentandreu R., Lampen J. O., (1971), *FEBS Letters*, **14**, 109—113.
105. Palamarczyk G., Chojnacki T., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 201—203.
106. Tanner W., Jung P., Linden J. C., w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 227—235, Academic Press, New York London.
107. Jung P., Tanner W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 1—6.
108. Lehle L., Tanner W., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 225—235.
109. Lehle L., Tanner W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **339**, 364—374.
110. Barr R. M., Hemming F. W., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 1193—1202.
111. Barr R. M., Hemming F. W., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 1203—1208.
112. Northcote D. H., (1969), *Essays Biochem.*, **5**, 89—137.
113. Northcote D. H., (1972), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 113—132.
114. Hannus K., Pensar G., (1974), *Phytochemistry*, **13**, 2563—2566.
115. Sasak W., Chojnacki T., (1973), *Acta Biochim. Polon.*, **20**, 343—350.
116. Stone K. J., Wellburn A. R., Hemming F. W., Pennock J. F., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 325—330.
117. Dunphy P. J., Kerr J. D., Pennock J. F., Whittle K. J., Feeney J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 136—147.
118. Kauss H., (1969), *FEBS Letters*, **5**, 81—84.
119. Kauss H., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 221—226, Academic Press, New York London.
120. Villemez C. L., Clark A. F., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 57—63.
121. Villemez C. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 636—641.
122. Clark A. F., Villemez C. L., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 84—86.
123. Alam S. S., Hemming F. W., (1972), *FEBS Letters*, **19**, 60—62.
124. Hassid W. Z., (1972), w *The Biochemistry of the Glycosidic Linkage*, red. Piras R., Pontis H. G., str. 315—336, Academic Press, New York London.
125. Storm D. L., Hassid W. Z., (1972), *Plant Physiol.*, **50**, 473—476.
126. Elbein A. D., (1969), *J. Biol. Chem.*, **224**, 1608—1616.
127. Forsee W. T., Elbein A. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2858—2867.
128. Forsee W. T., Elbein A. D., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 930—939.
129. Forsee W. T., Elbein A. D., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 2607.
130. Forsee W. T., Elbein A. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9283—9293.
131. Roberts R. M., Pollard W. E., (1975), *Plant Physiol.*, **55**, 431—436.
132. Capaldi R. A., Vandercooi G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 930—932.

WOJCIECH RODE *)

Syntetaza tymidylanowa

Thymidylate Synthetase

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Rola biologiczna i występowanie syntetazy tymidylanowej
- III. Właściwości syntetazy tymidylanowej oraz postępy w zakresie jej oczyszczania
- IV. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową
- V. Uwagi końcowe

I. Wstęp

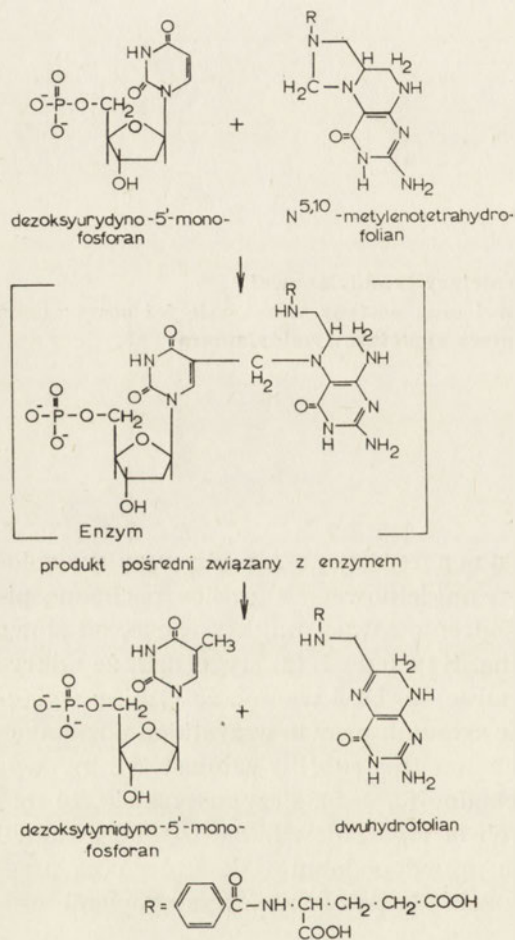
W 1893 roku K o s s e l i N e u m a n n (1) po raz pierwszy wyizolowali z kwaśnego hydrolizatu kwasu nukleinowego z grasicy pochodną pirymidynową i ze względu na pochodzenie kwasu nukleinowego, od słowa *thymus*, nazwali ten związek tyminą. S t e u d e l (2) stwierdził, że odkryta substancja ma budowę 5-metylouracylu. Dziś wiemy, że tymina występuje bardzo powszechnie, stanowiąc składnik prawie wszystkich poznanych DNA. Jedynie w niektórych fagach *Bacillus subtilis* zamiast tyminy występuje uracyl lub inne jego 5-pochodne (3, 4, 5). Przypuszcza się, że metylacja uracylu lub jego pochodnych *in vivo* pojawiła się w toku ewolucji stosunkowo późno (6), zapewniając prawdopodobnie jakąś nieznaną przewagę ewolucyjną (6, 7), jakkolwiek zakłada się również występowanie prebiotycznej syntezy tyminy (8).

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

Wykaz stosowanych skrótów: BrdUMP — 5-bromo-2'-dezoksyurydino-5'-monofosforan; dTMP — 2'-dezoksytymidino-5'-monofosforan; dUMP — 2'-dezoksyurydino-5'-monofosforan; FdUMP — 5-fluoro-2'-dezoksyurydino-5'-monofosforan; JdUMP — 5-jodo-2'-dezoksyurydino-5'-monofosforan.

II. Rola biologiczna i występowanie syntetazy tymidylanowej

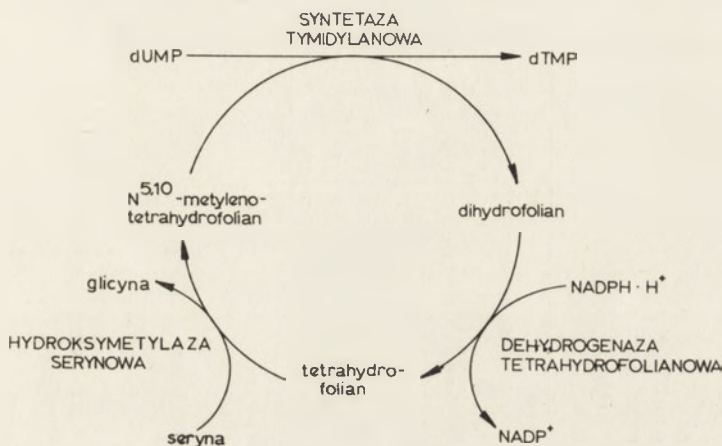
W organizmach żywych metylacja uracylu zachodzi na poziomie dezoksynukleotydu i katalizuje ją enzym, syntetaza tymidylanowa, C-metylotransferaza $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolian:dezoksyurydyno-5'-monofosforan, E. C. 2.1.1.b (9). Reakcję tę, łączącą przeniesienie grupy metylenowej z $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianu na dUMP z jej redukcją do grupy metylenowej, przy jednoczesnym utlenieniu tetrahydrofolianu do dihydrofo-



Ryc. 1. Reakcja katalizowana przez syntetazę tymidylanową.

lianu (10), przedstawia rycina 1. W reakcji oprócz syntetazy tymidylanowej bierze udział dUMP, tetrahydrofolian oraz donor grupy jednowęglowej. W badaniach *in vitro* jako donor grupy jednowęglowej służy formaldehyd, tworzący z tetrahydrofolianem bez udziału enzymu $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolian. Związek ten musi być obecny w mieszaninie reakcyjnej w stężeniu substratowym (11). *In vivo* donorem grupy jednowęglowej jest

grupa hydroksymetylowa seryny (12), której przeniesienie na tetrahydrofolian katalizuje hydroksymetylotransferaza serynowa (E. C. 2.1.2.1). Syntetaza tymidylanowa, hydroksymetylotransferaza serynowa oraz dehydrogenaza tetrahydrofolianowa (E. C. 1.5.1.3), regenerującą *in vivo* tetrahydrofolian, katalizują reakcje składowe tzw. cyklu syntezy tymidylanu (Ryc. 2). Cykl ten wymaga jedynie katalitycznych ilości tetrahydrofolianu (13), regenerowanego przez dehydrogenazę tetrahydrofolianową i hydroksymetylowanego przez hydroksymetylotransferazę serynową.



Ryc. 2. Cykl syntezy tymidylanu.

Aktywność syntetazy tymidylanowej w komórkach zmienia się równolegle z intensywnością syntezy DNA. Wzrost aktywności tego enzymu następuje w komórkach intensywnie dzielących się, zarówno w organizmach prokariotycznych (14, 15) jak i eukariotycznych (16—27). Uważa się, że reakcja katalizowana przez syntetazę tymidylanową może być etapem ograniczającym syntezy DNA (28), jakkolwiek rolę taką pełnić może także reakcja katalizowana przez reduktazę rybonukleozydodwufosforanów (29), ze względu na bardzo wysoki poziom kontroli allosterycznej tego enzymu (30, 31). Jednakże, pomimo stwierdzenia powiązania indukcji syntetazy tymidylanowej z biosyntezą DNA, mechanizm tego zjawiska pozostaje dalej nie znany.

III. Właściwości syntetazy tymidylanowej oraz postępy w zakresie jej oczyszczenia

Tabela I przedstawia niektóre właściwości syntetazy tymidylanowej z różnego materiału. Tylko w niektórych przypadkach przy badaniach dysponowano oczyszczonymi preparatami enzymu. Powodem tego była la-

Tabela 1.

Właściwości syntetazy tymidylanowej z różnych organizmów

Organizm	Aktywatory	Km			Masa cząsteczkowa $\times 10^{-3}$	ilość i masa cząsteczkowa podjednostek $\times 10^{-3}$	Aktywność właściwa oczyszczonego preparatu ($\mu\text{mole/godz/mg}$ białka w temp. w °C)
		wobec dUMP (μM)	wobec metylenotetrahydrofolianu (μM)	Optimum pH			
1	2	3	4	5	6	7	8
Bakterie							
<i>E. coli</i>	Mg ²⁺ (35), RSH (34,35)	4,0 (35)	4,5 (35)	7,0—8,0 (35)	60—70 (36, 37)	2 × 35 (75%) (37)	67 w 30° (32)
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	Mg ²⁺ (37)	30,8 (37)	266 (37)	7,0—7,7 (37)	34—38 (37)	—	—
<i>L. casei</i>	Mg ²⁺ , RSH (38, 39)	5,1 (38); 5,2 (39)	32 (38); 45 (39)	6,9—7,8 (39)*	70 (38)	2 × 35 (38)	150 w 30° (38)
<i>S. faecalis</i> R	Mg ²⁺ , RSH (40)	5,7 (41)	37 (41)	7,8 (41)	—	—	54 w 37° (40)
Fagi							
T2	RSH (42)	6 (33); 18 (34)	13 (33)	—	64,4 (42)	2 × 31,5 (42)	900 w 30° (42)
T4	—	—	—	—	58 (43)	2 × 29 (43)	52 w 37° (43)
T5	—	—	—	—	55 (43)	—	51 w 37° (43)
T6	—	30 (34)	—	—	—	—	—
Pierwotniaki							
<i>Trypanosoma gambiense</i>	—	20 (44)	—	6,5—6,7 (44)	—	—	—
<i>Trypanosoma lewisi</i>	—	20 (44)	—	6,5—6,7 (44)	—	—	—
<i>Plasmodium chabaudi</i>	—	20 (44)	—	6,5—6,7 (44)	—	—	—
<i>Plasmodium berghei</i>	—	—	—	7,0—8,8 (45)	100 (45)	—	—

I	2	3	4	5	6	7	8
Owady							
<i>Drosophila melanogaster</i>	RSH (46)	6,8 (46)	83 (46)	7,5—8,0 (46)	—	—	—
<i>Bombyx mori</i> (jedwabnik morwowy)	RSH (47)	—	—	7,0—7,5 (47)	34 (48)	—	0,2 w 25° (48)
Ptaki							
Kurczę (zarodek)	RSH, (NH ₄) ₂ SO ₄ (49)	7,5 (49)	14 (49)	65,(49)	58 (49)	—	3,8 w 37° (49)
Ssaki							
Ciele (grasica)	—	20 (50); 9,0 (51)	40 (50)	7,1 (50); 6,9 (51)	77,5 (51)	—	21 w 37° (51)
Świnia (grasica)	RSH (52)	1,0 (52)	17 (52)	6,2—6,8 (52)	—	—	10,4 w 25° (52)
I forma	Mg ²⁺ , RSH, różne sole (52)	7,4 (52)	17 (52)	7,2—7,4 (52)	—	—	16,3 w 25° (52)
II forma	—	—	—	—	68 (45)	—	—
Mysz (erytrocyty)	—	—	—	—	—	—	—
Mysz (rak wysiękowy Ehrlicha)	RSH (53)	6,3 (53)	43 (53)	6,5—6,7 (54)	67—71 (53)	—	28,2 w 37° (53)
Szczur (komórki embrionalne hodowane <i>in vitro</i>)	—	4,5 (56)	—	—	—	—	—
Człowiek (leukocyty)	Mg ²⁺ , EDTA (55)	—	—	6,5 (55)	—	—	—

* zależy od składu buforu i od obecności Mg²⁺ (38).

bilność enzymu oraz jego niski poziom w komórkach i tkankach. Z punktu widzenia oczyszczania syntetazy tymidylanowej sytuacja ta jest szczególnie niekorzystna w przypadku tkanek ssaków, czego przykładem mogą być komórki raka wyściełowego Ehrlicha (53, 57).

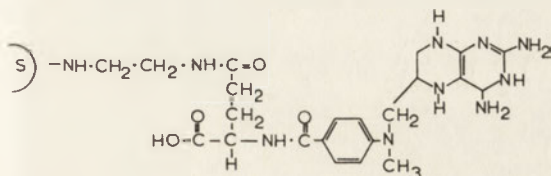
Syntetaza tymidylanowa pozostaje w centrum zainteresowania biochemii klinicznej jako enzym docelowy niektórych antymetabolitów stosowanych w chemioterapii nowotworów (np. 6, 58). Pożądane więc byłoby dokładne zbadanie właściwości i mechanizmu działania tego enzymu pochodzenia nowotworowego, a szczególnie różnic, o ile takie istnieją, pomiędzy enzymem pochodzącym z tkanek nowotworowych i z prawidłowych. W tym celu potrzebna jest jednak metoda, pozwalająca otrzymywać wysoko oczyszczone preparaty enzymu z różnych materiałów biologicznych przy zachowaniu wysokiej wydajności.

W ostatnich latach próby opracowania takiej metody, opartej na technice chromatografii powinowactwa biologicznego, podjęto w kilku ośrodkach. Stosując jako adsorbent biologicznie swoisty *) unieruchomiony na Sepharose substrat, dUMP (59, 60) lub jego analog, FdUMP (61, 62), opracowano dwie metody umożliwiające szybkie i wydajne izolowanie elektroforetycznie czystej syntetazy tymidylanowej z bakterii *Lactobacillus casei* opornych na ametoptynę. Obie metody polegały na adsorpcji enzymu na adsorbencie biologicznie swoistym przy niskiej sile jonowej oraz jego elucji, następującej po wymyciu z adsorbenta białek towarzyszących, a powodowanej podwyższeniem siły jonowej eluentu. Podkreślić należy, że bakterie *L. casei* odporne na ametoptynę, w których poziom syntetazy tymidylanowej jest około 200-krotnie podwyższony (38) w porównaniu ze szczepem dzikim, są wyjątkowo bogatym źródłem tego enzymu, co na pewno nie pozostaje bez wpływu na wyniki jego oczyszczania. Dotychczas brak jest informacji o pomyślnym zastosowaniu powyższych metod przy izolowaniu syntetazy tymidylanowej z materiału innego niż wspomniany szczep *L. casei*. Stwierdzono wprawdzie, że pierwsza metoda pozwala oczyścić enzym z bakterii *Escherichia coli*, ale tylko w niewielkim stopniu (48), za co wydawała się odpowiadać niska swoistość biologiczna stosowanego układu chromatograficznego.

Ostatnio opracowano metodę izolowania syntetazy tymidylanowej (48, 63) opartą także na chromatografii powinowactwa biologicznego, która wydaje się odpowiadać warunkowi „uniwersalności”. Jako adsorbenta biologicznie swoistego użyto silnego inhibitora syntetazy tymidylanowej, tetrahydroametoptyny, związanego poprzez etylenodiaminę z Sepharose (Ryc. 3). Sorpcja enzymu na tym adsorbencie następowała jedynie w obecności dUMP, a więc prawdopodobnie na zasadzie powstawania trójcząstecz-

*) Terminy z zakresu chromatografii powinowactwa biologicznego stosowane w tym artykule omówiono w artykule pt. „Oczyszczanie enzymów i białek biologicznie czynnych poprzez chromatografię na substancjach niskocząsteczkowych unieruchomionych w fazie stałej”, *Post. Biochem.*, 23, 113—127.

kowego kompleksu unieruchomiony analog jednego substratu-enzym-drugi substrat. Po wymyciu białek towarzyszących buforem o wysokiej sile jonowej zawierającym dUMP, syntetazę tymidylanową eluowano tym samym buforem bez substratu. Fakt uwieńczonego powodzeniem zastosowania tej metody przy izolowaniu syntetazy tymidylanowej z *E. coli*, grasicy cielęcej, mięsaka 180 (sarcoma 180), limfiakomięsaka Gardnera (Gardner lymphosarcoma) i jaj jedwabnika (48, 63) pozwala mieć nadzieję na możliwość jej powszechnego stosowania.



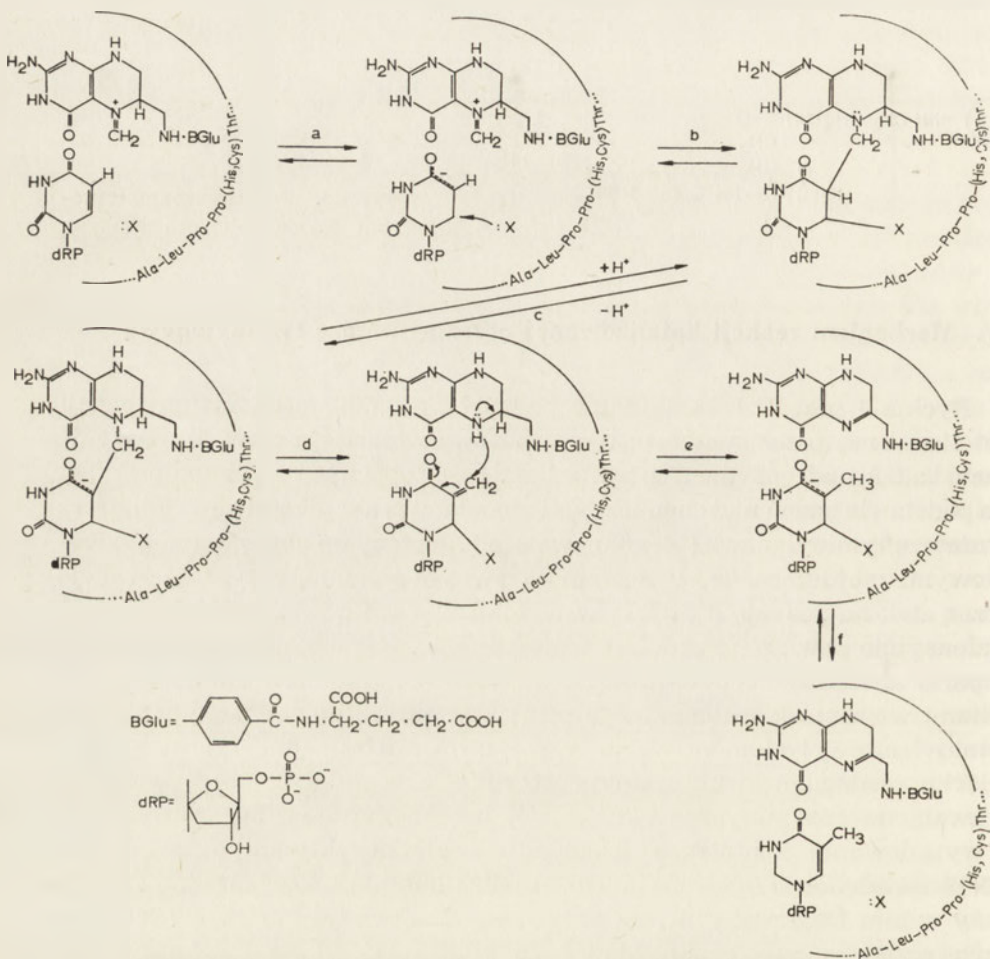
Ryc. 3. Tetrahydroametoptyrino-etylo-Sepharose

IV. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową

Rycina 4 przedstawia aktualne poglądy na temat mechanizmu reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową. Oparto je głównie na wynikach badań nad enzymem z bakterii *L. casei* opornych na ametoptyrynę. Na podstawie badań nad chemicznymi modelami reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową (64—68) uważa się, że grupa o charakterze nukleofilowym, znajdująca się w centrum aktywnym enzymu, katalizuje reakcję przez atak na pozycję 6 dUMP, w wyniku którego powstaje aktywny, kowalencyjnie powiązany produkt pośredni (Ryc. 4 reakcje a, b). Hipotezę tę poparło stwierdzenie powstawania w obecności $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianu wiązania kowalencyjnego pomiędzy nukleofilową grupą syntetazy tymidylanowej i atomem węgla w pozycji 6 FdUMP (69—72), który jest bliskim analogiem strukturalnym dUMP. Duża stabilność tego wiązania pozwala na enzymatyczne (73, 74, 75) lub chemiczne (76) odszczepienie i wyizolowanie kompleksu fragmentu centrum aktywnego z FdUMP i $N^{5,10}$ -metylenotetrahydrofolianem. Analiza kompleksu wykazała, że związany w nim fragment centrum aktywnego zawiera trzy aminokwasy, których reszty mogłyby odpowiadać za atak nukleofilowy na pozycję 6 FdUMP lub, przez analogię, dUMP. Były to: cysteina, treonina i histydyna. Nie udało się niestety stwierdzić, z którą z reszt związany był FdUMP, ale na podstawie pozytywnej reakcji kompleksu z odczynnikiem Pauly'ego przypuszcza się, że nie była to prawdopodobnie reszta histydyny (75). Wyniki wcześniejszych badań z zastosowaniem inhibitorów sulfhydrylowych (38, 77, 78) wskazywały, że przynajmniej jedna z czterech reszt cysteinowych syntetazy tymidylanowej z *L. casei* reaguje z FdUMP. Wydaje się więc, że FdUMP wiąże się z cząsteczką enzymu poprzez resztę cysteinową, odpo-

wiedzialną także za atak nukleofilowy na pozycję 6 nukleotydu. O ile mechanizm odpowiada rzeczywistości, to można sądzić, że substrat, dUMP, mógłby wiązać się z enzymem z ten sam sposób.

Następny etap reakcji (Ryc. 4 reakcja c) polega na uwolnieniu protonu z pozycji 5 dUMP (6, 39, 68, 74). Lomax i Greenberg (79) wykorzystali ten fakt, opracowując bardzo czułą i powszechnie stosowaną metodę oznaczania aktywności syntetazy tymidylanowej opartą na pomiarze



Ryc. 4. Mechanizm reakcji katalizowanej przez syntetazę tymidylanową.

ilości trytu uwolnionego w wyniku reakcji enzymatycznej z 5-³H-dUMP. Gdy w pozycji 5 dUMP zamiast atomu wodoru znajduje się atom fluorkowy (w FdUMP), wiązanie C—F jest zbyt stabilne, aby jon fluorkowy mógł się uwolnić (73). Natomiast w przypadku BrdUMP i JdUMP następuje uwolnienie jonu Br⁻ lub J⁻, dzięki czemu analogi te mogą służyć jako substraty syntetazy tymidylanowej przy biosyntezie dTMP (80).

Po uwolnieniu protonu zachodzi prawdopodobnie β -eliminacja tetrahydrofolianu (Ryc. 4 reakcja d), prowadząca do powstania wysoce reaktywnego produktu pośredniego, będącego metylenową pochodną dUMP. Oba te związki pozostają w bliskim sąsiedztwie na cząsteczce enzymu. W wyniku wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia jonu wodorkowego z tetrahydrofolianu na egzocykliczną grupę metylenową powstają dTMP, dihydrofolian i wolny enzym (Ryc. 4 reakcje e, f; 68).

Omówiony mechanizm nie rozstrzyga kolejności przyłączania do enzymu substratów i uwalniania produktów. Nieliczne dotychczas próby wyjaśnienia tego zagadnienia poprzez badania kinetyczne dały wyniki niejednoznaczne i różne w przypadku enzymu z różnych źródeł. Na podstawie tych badań wydawało się, że reakcję syntetazy tymidylanowej ze *Streptococcus faecalis* (41), raka wysiękowego Ehrlicha (54) i zarodka kurczęcia (49) charakteryzuje mechanizm uporządkowany, a w dwóch ostatnich przypadkach — uporządkowany sekwencyjny (badania enzymu z *S. faecalis* nie dały odpowiedzi rozstrzygającej pomiędzy mechanizmem sekwencyjnym lub „ping — pong”). Do dwóch pierwszych enzymów substraty przyłączałyby się w kolejności N^{5,10}-metylenotetrahydrofolian przed dUMP, a do ostatniego — w kolejności odwrotnej.

Nowe światło na zagadnienie kolejności wiązania się substratów z syntetazą tymidylanową rzuciły badania S l a v i k a i wsp. (63), które umożliwiły opracowanie metody izolowania tego enzymu opartej na chromatografii powinowactwa biologicznego (porównaj rozdział III). Stwierdzony fakt odwracalnego wiązania się syntetazy tymidylanowej z unieruchomionym analogiem substratu, tetrahydroametoptyryną, jedynie w obecności dUMP dowodzi powstawania trójcząsteczkowego kompleksu enzym-substrat-analog drugiego substratu, określając jednocześnie kolejność, w jakiej niskocząsteczkowe składniki kompleksu reagują z enzymem (dUMP przed tetrahydroametoptyryną). Powszechna, jak się wydaje, stosowalność wspomnianej metody wskazuje, że powyższy mechanizm cechuje syntetazę tymidylanową niezależnie od jej pochodzenia. Za mechanizmem takim przemawiają także wyniki G a l i v a n a i wsp. (81), którzy badając wiązanie dUMP i 7,8-dihydrofolianu lub ametoptyryny z syntetazą tymidylanową z *L. casei* opornych na ametoptyrynę metodą równowagi dializacyjnej stwierdzili, że wspomniane pochodne i analogi folianu wiązały się z enzymem również tylko w obecności dUMP. Ten ostatni substrat wiązał się natomiast z syntetazą tymidylanową także pod nieobecność pochodnych folianowych, co stwierdzono już wcześniej na drodze pomiarów dichroizmu kołowego (78). Wykazany brak wiązania się dihydrofolianu oraz ametoptyryny i jej uwodorowanej pochodnej z syntetazą tymidylanową pod nieobecność dUMP, ze względu na podobieństwo strukturalne tych związków do N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu, trudno pogodzić z kolejnością przyłączania się substratów (N^{5,10}-metylenotetrahydrofolian przed dUMP) do enzymu ze *S. faecalis* i raka wysiękowego Ehrlicha, określoną na podstawie

badan kinetycznych (patrz wyżej). Podkreślić jednak należy, że w ogromnej większości badań nie stosowano dotychczas poliglutaminianowych pochodnych folianowych, a można dziś sądzić, że taka właśnie pochodna N^{5,10}-metylenotetrahydrofolianu jest naturalnym substratem syntetazy tymidylanowej. Z badań Kisliuka i wsp. (82) oraz Friedkina i wsp. (83) wynika również, że różnica w liczbie reszt glutaminianowych związanych z cząsteczką pochodnej folianowej może zasadniczo zmieniać własności cząsteczki, nadając jej na przykład charakter inhibitora.

V. Uwagi końcowe.

Badania nad syntetazą tymidylanową prowadzone są już od około dwudziestu lat. Obszerny przegląd piśmiennictwa poświęconego temu enzymowi zawierają prace Friedkina (6, 84) oraz Blakleya (85). Pomimo znacznego wysiłku poświęconego poznaniu syntetazy tymidylanowej wiedza na jej temat pozostaje nadal fragmentaryczna. Nieznany jest mechanizm regulacji aktywności syntetazy tymidylanowej w komórce, chociaż wielokrotnie udowodniono ścisłą zależność pomiędzy jej występowaniem a stanem proliferacji komórek. Baril i wsp. (86) stwierdzili, że w komórkach regenerującej wątroby szczura około 50% aktywności omawianego enzymu występuje we frakcji błon gładkich izolowanych z supernatantu pomikrosomowego. W tej samej frakcji wykryto inne enzymy biosyntezy DNA: polimerazę II DNA, reduktazę rybonukleozydodwufosforanów i kinazę tymidylanową. Sprawdzono, że związanie wspomnianych enzymów z błonami nie jest wynikiem adsorpcji ani też agregacji w warunkach niskiej siły jonowej. Co więcej, po rozpuszczeniu błon działaniem mieszaniny n-butanol—Triton X-100 enzymy te pozostawały w dalszym ciągu związane w postaci kompleksu multienzymatycznego. Wyniki te wskazują na możliwość istnienia multienzymatycznego kompleksu biosyntezy DNA w komórkach eukariotycznych, a prawdopodobna obecność syntetazy tymidylanowej w takim kompleksie przemawia za intensyfikacją zaniebdywanych dotychczas badań rozmieszczenia tego enzymu w komórkach.

Artykuł nadszedł 20.8.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 20.9.1976.

PISMIENICTWO

1. Kossel A., Neumann A., (1893), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **26**, 2753—2756.
2. Steudel H., (1901), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **32**, 241—244.
3. Kallen R. G., Simon M., Marmur J., (1962), *J. Mol. Biol.* **5**, 248—250.
4. Takahashi I., Marmur J., (1963), *Nature*, **197**, 794—795.

5. Krasucki C., Hayashi H., Nakanishi K., (1972), *Fed. Proc.*, **31**, 444, Abs. 1281.
6. Friedkin M., (1973), *Advan. Enzymol.*, **38**, 235—292.
7. Friedkin M., (1959) w *The Kinetics of Cellular Proliferation*, red. Stohlman F. Jr., str. 97—103, Grune and Stratton, New York.
8. Bishop M. J., Lohrmann R., Orgel L. E., (1972), *Nature*, **237**, 162—
9. Barman T. E., (1969), *Enzyme Handbook*, t. 1, str. 265, Springer-Verlag, Heidelberg, New York.
10. Humphreys G. K., Greenberg D. M., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.* **78**, 275—287.
11. Friedkin M., Kornberg A., (1957) w *The Chemical Basis of Heredity*, red. McElroy W. D., Glass H. B., str. 609—614, John Hopkins Press, Baltimore, Maryland.
12. Crosbie G. W., (1960) w *The Nucleic Acids*, red. Chargaff E., Davidson J. N., t. 3, str. 323—348, Academic Press, New York.
13. McDougall B. M., Blakley R. L., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 832—837.
14. Soini J., (1967), *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A—II*, 140.
15. Soini J., Majasaari K., (1973), *Suomen Kemistilehti B* **46**, 276—280.
16. Silber R., Cox R. P., Haddad J. R., Friend C., (1964), *Cancer Res.* **24**, 1892—1897.
17. Kit S., Dubbs D. R., Frearson P. M., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2565—2573.
18. Firshein W., Berry S. J., Swindlehurst M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **149**, 190—198.
19. Labow R., Maley G. F., Maley F., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 366—372.
20. Elford H. L., Freese M., Passamani E., Morris H. P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5228—5233.
21. Conrad A. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1318—1323.
22. Roberts D., Loehr E. V., (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1181—1187.
23. Rosenberg R. N., Vande Venter L., De Francesco L., Friedkin M. E., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1436—1440.
24. Walter R. D., Königk E., (1971), *Z. Tropenmed. Parasit.*, **22**, 250—255.
25. Wilmanns W., Neef V., (1971), *Klin. Wschr.*, **49**, 755—762.
26. Conrad A. H., Ruddle F. H., (1972), *J. Cell Sci.*, **10**, 471—486.
27. Rode W., Szymanowska H., (1976), *Insect Biochem.*, **6**, 333—337.
28. Maley G. F., Maley F., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2975—2986.
29. Beck W. S., (1964), *Medicine* **43**, 715—726.
30. Reichard P., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 259—266.
31. Elford H. L., (1972), *Advan. Enz. Regul.*, **10**, 19—38.
32. Friedkin M., Crawford E. J., Donovan E., Pastore J., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3811—3814.
33. Greenberg G. R., Somerville R. L., De Wolf S., (1962), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**, 242—247.
34. Mathews C. K., Cohen S. S., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 367—370.
35. Wahba A. J., Friedkin M., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 3794—3801.
36. Friedkin M., Donovan E., (1972), *Adv. Enz. Regul.*, **10**, 133—142.
37. McCuen R. W., Sirotnak F. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 369—380.
38. Dunlap R. B., Harding N. G. L., Huennekens F. M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 88—97.
39. Crusberg T. C., Leary R., Kisliuk R. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5292—5296.

40. Blakley R. L., McDougall B., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 812—818.
41. Blakley R. L., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 2113—2118.
42. Galivan J., Maley G. F., Maley F., (1974), *Biochemistry* **13**, 2282—2289
43. Capco G. R., Krupp J. R., Mathews C. K., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 726—735.
44. Walter R. D., Mühlpfordt H., Königk E., (1970), *Z. Tropenmed. Parasit.*, **21**, 347—357.
45. Reid V. E., Friedkin M., (1973), *Mol. Pharmacol.*, **9**, 74—80.
46. Carpenter N. J., (1974), *J. Insect Physiol.*, **20**, 1389—1401.
47. Rode W., (1976), Praca doktorska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa.
48. Rode W., Zielińska Z. M., Slavik K., Slaviková V., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 925—927.
49. Lorenson M. Y., Maley G. F., Maley F., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3332—3344.
50. Jenny E., Greenberg D. M., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3378—3382.
51. Hornishi H., Greenberg D. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 741—752.
52. Gupta V. S., Meldrum J. B., (1972), *J. Biochem.*, **50**, 352—362.
53. Fridland A., Langenbach R. J., Heidelberger C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7110—7114.
54. Reyes P., Heidelberger C., (1965), *Mol. Pharmacol.*, **1**, 14—30.
55. Silber R., Gabrio B. W., Huennekens F. M., (1963), *J. Clin. Invest.*, **42**, 1913—1921.
56. Langenbach R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 295—301.
57. Hartmann K. U., Heidelberger C., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 3006—3013.
58. Bertino J. R., Johns D. G., (1972) w Cancer Chemotherapy II. The Twenty-Second Hahnemann Symposium, red. Brodsky I., Kahn S. B., Moyer J. H., str. 9—22, Grune and Stratton.
59. Danenberg P. V., Langenbach R. J., Heidelberger C., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1029—1033.
60. Danenberg P. V., Heidelberger C., (1974), w *Methods in Enzymology* **34 B**, 520—523.
61. Whiteley J. M., Jerkunica I., Deits T., (1974), *Biochemistry* **13**, 2044—2050.
62. Whiteley J. M., Jerkunica I., Deits T., (1974), w *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, red. Dunlap R. B., str. 135—146, Plenum Press, New York, London.
63. Slavik K., Rode W., Slaviková V., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4222—4227.
64. Santi D. V., Brewer C. F., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6236—6238.
65. Santi D. V., Brewer C. F., Farber D., (1970), *J. Heterocycl. Chem.*, **7**, 903—910.
66. Kalman T. I., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2567—2573.
67. Santi D. V., Sakai T. T., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3598—3607.
68. Pogolotti A. L., Santi D. V., (1974), *Biochemistry*, **13**, 456—466.
69. Langenbach R. J., Danenberg P. V., Heidelberger C., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1565—1571.
70. Santi D. V., McHenry C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1855—1857.
71. Santi D. V., McHenry C. S., Perriard E. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 467—470.

72. Santi D. V., McHenry C. S., Sommer H., (1974), *Biochemistry*, **13**, 471—481.
73. Sommer H., Santi D. V., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 689—695.
74. Danenberg P. V., Heidelberger C., (1975), *Fed. Proc.*, **34**, 522, Ab. 501.
75. Pogolotti A. L., Jr., Jvanetich K. M., Sommer H., Santi D. V., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 972—978.
76. Bellisario R. L., Maley G. F., Galivan J. H., Maley F., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1848—1852.
77. Danenberg P. V., Langenbach R. J., Heidelberger C., (1974), *Biochemistry*, **13**, 926—933.
78. Leary R. P., Beaudette N., Kisliuk R. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4864—4868.
79. Lomax M. I. S., Greenberg R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 109—113.
80. Wataya Y., Santi D. V., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 818—823.
81. Galivan J. H., Maley G. F., Maley F., (1976), *Biochemistry*, **15**, 356—362.
82. Kisliuk R. L., Gaumont Y., Baugh C. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4100—4103.
83. Friedkin M., Plante L. T., Crawford E. J., Crumm M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5614—5621.
84. Friedkin M., (1963), *Ann. Rev. Biochem.*, **32**, 185—214.
85. Blakley R. L., (1969), *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, American Elsevier, New York.
86. Baril E., Baril B., Elford H., Luftig R. B., (1974) w *Mechanism and Regulation of DNA Replication*, red. Kolber A. R., Kohiyama M., str. 275—291, Plenum Press, New York, London.

BOGDAN SZUKALSKI *)

Komórkowa i subkomórkowa topografia enzymów sterydogenezy

Cellular and Subcellular Distribution of Enzymes Involved in Steroid Biosynthesis

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rozmieszczenie enzymów w gruczołach wytwarzających hormony sterydowe
 - II-1. Kora nadnerczy
 - II-2. Jądro, gruczoł krokowy
 - II-3. Pęcherzyk jajnikowy, ciało żółte, macica
 - II-4. Łożysko
- III. Mechanizm hydroksylacji pierścienia sterydowego
- IV. Uwagi końcowe
- V. Piśmiennictwo

I. Wstęp

Udział hormonów sterydowych w mechanizmach regulujących prawidłową funkcję żywego ustroju oraz ich zastosowanie w klinice sprawiają,

*) Doc. dr, Zakład Biochemii, Instytut Psychoneurologiczny, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

Wykaz stosowanych w artykule potocznych nazw sterydów: Sterydy typu Δ^5 lub Δ^4 —związki sterydowe z wiązaniem między 5 i 6 lub 4 i 5 atomem węgla; Kortyzol — 11 β ,17 α ,21-trójhidroksy-4-pregnen-3,20-dion; Kortykosteron — 11 β ,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3,20-dion; Korteksolon — 17 β ,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3,20-dion; Kortekson — 21-hydroksy-4-pregnen-3,20-dion; Aldosteron — 11 β ,21-dwuhydroksy-4-pregnen-3,20-dion-18-al; Testosteron — 17 β -hydroksy-4-androsten-3-on, 5 α -dwuhydrotestosteron — 17 β -hydroksy-5 α -androsten-3-on; Androstendion — 4-androsten-3,17-dion; Dehydroizoandrosteron — 3 β -hydroksy-5-androsten-17-on, 16 α -hydroksydehydroizoandrosteron — 3 β ,16 α -dwuhydroksy-5-androsten-17-on; Progesteron — 4-pregnen-3,20-dion, 17 α -hydroksyprogesteron — 17 α -hydroksy-4-pregnen-3,20-dion; Pregnandiol — 3 α ,20 α -dwuhydroksy-5 β -pregnan, 17 α -hydroksypregnenolon — 3 β ,17 α -dwuhydroksy-5-pregnen-20-on; Pregnenolon — 3 β -hydroksy-5-pregnen-20-on; Estradiol-17 β — 3,17 β -dwuhydroksy-1,3,5 (10)-estratrien; Estron — 3-hydroksy-1,3,5(10)-estratrien-17-on; Estriol — 3,16 β ,17 β -trójhidroksy-1,3,5(10)-estratrien; Cholesterol — 3 β -hydroksy-5-cholesten.

że zainteresowanie tą grupą związków naturalnych jest nadal znaczne. Prawie 130 lat po historycznym opisie przez Tomasza Addisona klinicznych objawów niedoczynności kory nadnercza i 125 lat po przedstawieniu przez Brown-Sequarda eksperymentalnych dowodów nieodzowności kory nadnerczy dla życia ustroju — biochemia hormonów sterydowych odgrywa nadal istotną rolę w badaniach nad zdolnością adaptacyjną człowieka, mechanizmami powstawania i rozwoju nowotworów, patogenezą cukrzycy, nadciśnienia, otyłości, osteoporozy, niektórych chorób psychicznych i innych. Poznanie reakcji składających się na wieloetapowy proces syntezy hormonów sterydowych oraz topografii i własności enzymów katalizujących te reakcje zbliża nas do zrozumienia mechanizmów molekularnych, warunkujących wiele zjawisk patologicznych.

Procesy sekrecji hormonów sterydowych można badać na różnych poziomach, zależnie od potrzeby oraz dokładności pozostających do dyspozycji metod badawczych. Można je rozpatrywać na poziomie narządu — gruczołu (kora nadnerczy, jajniki, jądra, łożysko), tkanek wchodzących w skład narządu (tkanka śródmiąższowa jądra, ciało żółte), komórek (komórki tekalne pęcherzyka jajnikowego), składników komórkowych i organelli (siateczka endoplazmatyczna, mitochondria, płyn komórkowy), elementów strukturalnych tych organelli (błony retikulum endoplazmatycznego, wewnętrzna błona mitochondrialna) oraz na poziomie molekularnym.

Postępujący rozwój mikroskopii elektronowej oraz precyzyjnych metod biochemicznych sprowadził badania biosyntezy hormonów o strukturze sterydowej na poziom struktur subkomórkowych, które wydziela się za pomocą wirowania homogenatów tkankowych (Ryc. 1).

Badanie pod mikroskopem elektronowym ujawniło w retikulum endoplazmatycznym dwa typy błon: 1. retikulum szorstkie (granularne, ziarniste) złożone z błon lipoproteidowych pokrytych rybosomami. W wyniku wirowania homogenatu tkankowego retikulum to daje frakcję zawierającą pęcherzyki powstałe z fragmentacji tych błon (tzw. frakcja mikrosomalna szorstka, *rough surfaced microsomal fraction* — RSMF); 2. retikulum gładkie (agranularne), nie zawierające mikrosomów, z którego po wirowaniu homogenatu tworzy się tzw. frakcja mikrosomalna gładka (*smooth surfaced microsomal fraction* — SSMF).

Rozdzielanie frakcji mikrosomalnej na te podfrakcje można przeprowadzić metodą ultrawirowania w gradiencie stężenia sacharozy (1, 2). Dodanie 15mM chlorku cezu powoduje agregację błon i ułatwia ich sedymentację (3).

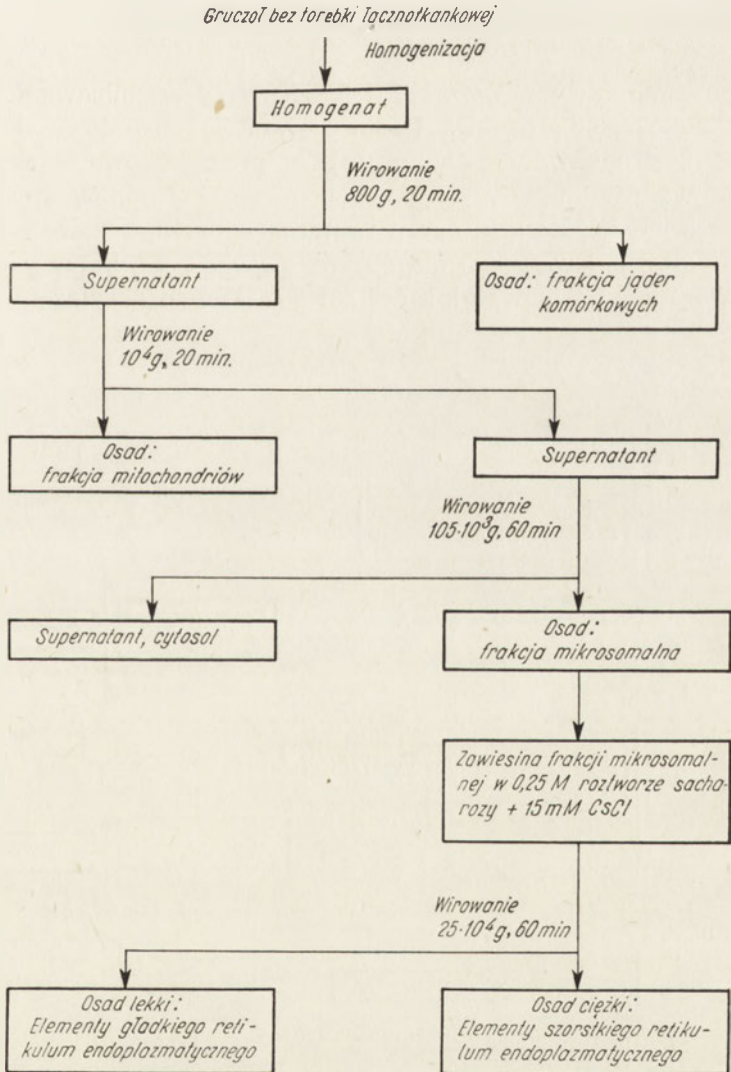
Ogólnie można powiedzieć, że enzymy sterydogenezy występujące w siateczce endoplazmatycznej związane są głównie z gładkim retikulum endoplazmatycznym a więc po wirowaniu znajdujemy je we frakcji powstałej w wyniku fragmentacji gładkich błon retikulum.

W komórkach łożyska, jajnika i ciała żółtego enzymy zsyntetyzowa-

ne w rybosomach na powierzchni szorstkiego retikulum endoplazmatycznego docierają do retikulum gładkiego, gdzie zostają zmetabolizowane z szybkością zbliżoną do szybkości ich biosyntezy.

W retikulum endoplazmatycznym komórek śródmięszowych jądra i kory nadnerczy synteza enzymów sterydogenezy przebiega z mniejszą szybkością, ale gromadzą się one w retikulum gładkim, które dzięki temu dysponuje bogatą pulą tych enzymów.

W celu zbadania wewnątrzmitochondrialnych miejsc sterydogenezy, wyodrębnione z homogenatów komórkowych wolne mitochondria poddaje się fragmentacji metodą osmotyczną (4) lub ultradźwiękową (5) a następ-



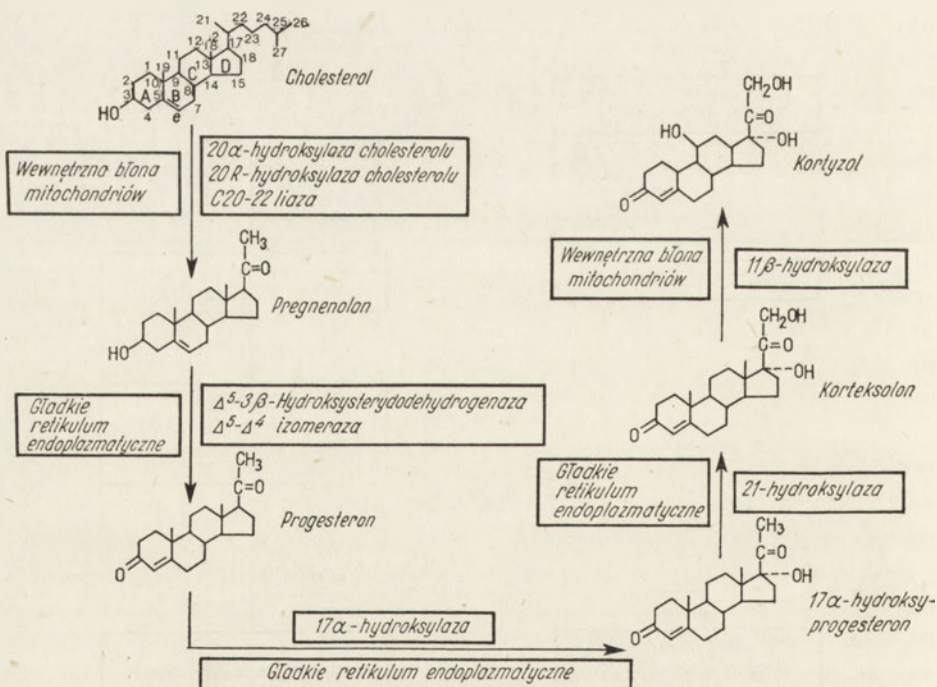
Ryc. 1. Schemat otrzymywania frakcji subkomórkowych.

nie rozdziela za pomocą wirowania w gradiencie gęstości na frakcję błon wewnętrznych, błon zewnętrznych i matriks. Dokładność rozdzielania sprawdza się metodą mikroskopii elektronowej a następnie bada skład enzymów i poziom ich aktywności w każdej z otrzymanych frakcji. Okazuje się, że mitochondrialne enzymy sterydogenazy związane są głównie z wewnętrzną błoną mitochondriów.

II. Rozmieszczenie enzymów w gruczołach wytwarzających hormony sterydowe

II-1. Kora nadnerczy

Kora nadnerczy ludzi dorosłych zawiera trzy zróżnicowane warstwy komórek. Ze względu na swą budowę warstwa obwodowa nosi nazwę kłębkowatej, środkowa — pasmowatej a przyśrodkowa — siatkowatej. Wszystkie warstwy uczestniczą w biosyntezie hormonów sterydowych, przy czym kortyzol, kortykosteron i androgeny nadnerczowe (androstendion i dehydroizoandrosteron) mogą powstawać w całej korze a aldosteron tylko w warstwie pasmowatej, która zawiera 18-hydroksylazę.



Ryc. 2. Etapy biosyntezy kortyzolu z cholesterolu.

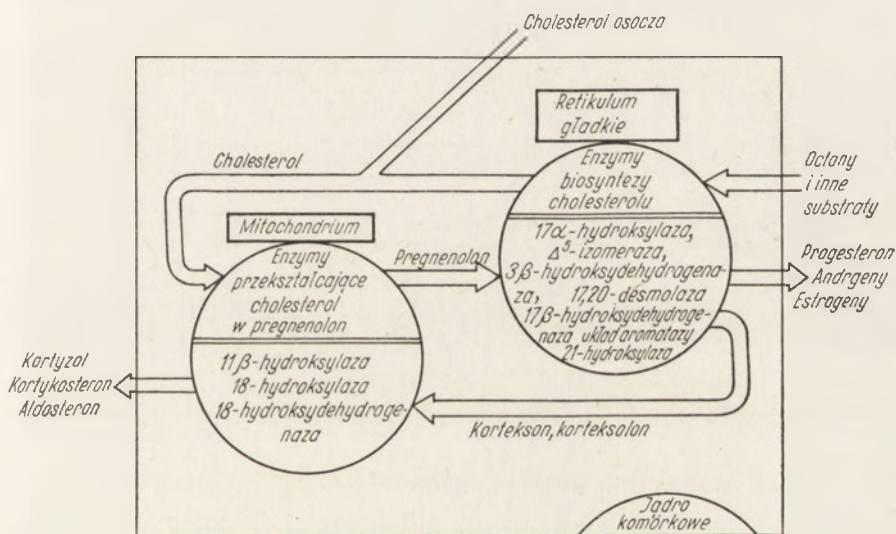
We wzorze cholesterolu podano oznakowanie pierścieni oraz numerację atomów węgla.

Etapy biosyntezy głównego hormonu nadnerczowego — kortyzolu z cholesterolu z zaznaczeniem uczestniczących w tym enzymów i ich rozmieszczenia w elementach subkomórkowych przedstawiono na rycinie 2.

Enzymy katalizujące pierwszy etap biosyntezy kortyzolu, tj. 20 α -hydroksylację i 22R-hydroksylację cholesterolu oraz odłączenie bocznego łańcucha, które przekształca cholesterol w pregnenolon, występują na wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Kolejne reakcje biosyntezy prowadzące do powstania korteksolonu z pregnenolonu, zachodzą pod działaniem enzymów występujących w gładkim retikulum endoplazmatycznym, natomiast 11 β -hydroksylaza, enzym przekształcający korteksolon w kortyzol — występuje w wewnętrznej błonie mitochondrialnej.

Ustalenie wewnątrzkomórkowej topografii układów enzymatycznych doprowadziło do odkrycia dróg transportu prekursorów sterydowych między poszczególnymi elementami strukturalnymi komórki produkującej hormony.



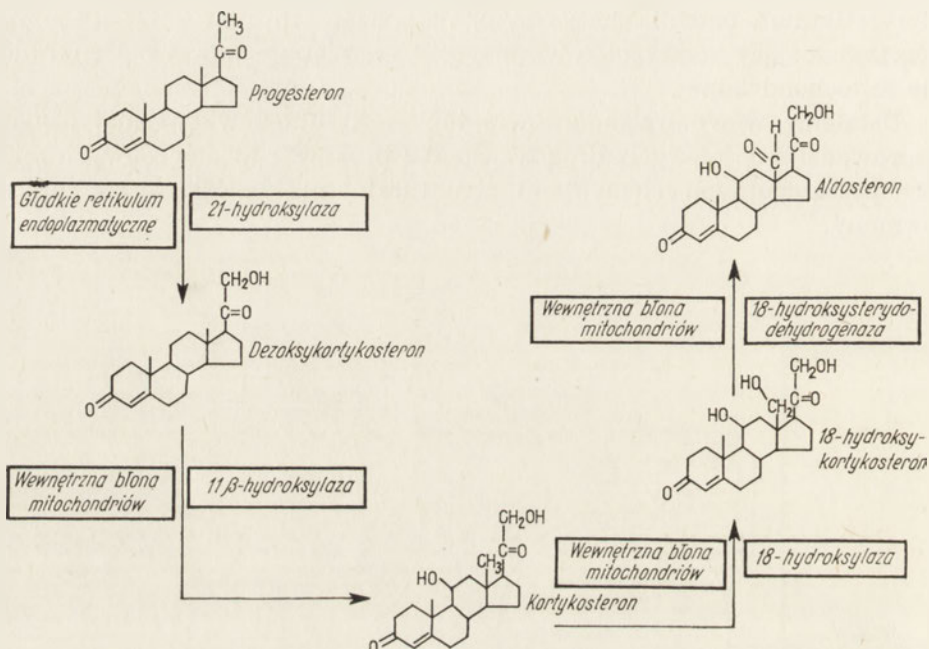
Ryc. 3. Schematyczny obraz „wędrówki” prekursorów kortykosterydów w komórce kory nadnerczy.

Rycina 3 pokazuje drogę prekursorów sterydogenezy w komórkach gruczołów podczas biosyntezy hormonów. Cholesterol, spełniający rolę prekursora hormonów sterydowych, dociera z gładkiego retikulum endoplazmatycznego i osocza do błony wewnętrznej mitochondriów i tam przekształca się w pregnenolon w wyniku utraty łańcucha bocznego.

Pregnenolon przechodzi przez zewnętrzną błonę mitochondrialną, dociera do retikulum i pod wpływem obecnych w nim enzymów ulega dalszym przemianom prowadzącym do powstania pochodnych nie zawiera-

jących grupy hydroksylowej w pozycji 11 (dezoksykortykosteron, korteksolon, androgeny).

Jednakże ostateczne produkty biosyntezy: kortykosteron, kortyzol i aldosteron nie mogą powstać w retikulum, gdyż 11 β -hydroksylaza i 18-hydroksylaza występują w mitochondriach. Dlatego w komórkach kory nadnerczy odpowiednie „półprodukty” hormonów (dezoksykortykosteron, korteksolon), powstałe w retikulum, muszą wrócić do mitochondriów i tam dopiero ulegają przemianie we właściwe hormony.



Ryc. 4. Etapy biosyntezy aldosteronu z progesteronu.

W wewnętrznej błonie mitochondriów zachodzi również 18-hydroksylacja oraz utlenianie powstałej grupy alkoholowej do aldehydowej. Enzymy katalizujące te reakcje: 18-hydroksylaza i 18-hydroksydehydrogenaza przekształcają kortykosteron w aldosteron — hormon regulujący gospodarkę mineralną ustroju. Jego biosyntezę z progesteronu przedstawia rycina 4.

II-2. Jądro, gruczoł krokowy

Z uwagi na bardzo złożoną strukturę komórkową jądra, na którą składają się spermatogonie, spermatocyty I i II rzędu, spermatydy, plemniki, śródmięszkowe komórki Leydiga, komórki Sertoliego, komórki naczyń krwionośnych oraz błon podstawowych, pierwszy etap badania jego funk-

cji wydzielniczej polegał na ustaleniu, które z wymienionych komórek są miejscem biosyntezy hormonów.

Naświetlanie jąder szczura promieniami rentgenowskimi w dawce 1000 R niszczy spermatogenezę, nie zmienia natomiast komórek Sertoliego i śródmięszowych. Nie ulega również zmianie ciężar pomocniczych narządów płciowych (pęcherzyki nasienne, gruczoł krokowy). Podanie gonadotropiny kosmówkowej szczurom naświetlanym wywołuje przerost komórek śródmięszowych oraz przerost ciężaru pomocniczych narządów płciowych, nie wpływa zaś na komórki Sertoliego (6, 7). Inkubacja progestesteronu z oddzielnymi pod mikroskopem kanalikami nasiennymi i tkanką śródmięszową prowadzi do powstawania androgenów jedynie w mieszaninie zawierającej tkankę śródmięszową (8). Wreszcie guz komórek śródmięszowych produkuje *in vitro* androgeny z różnych prekursorów (9). Wskazuje to, że właśnie śródmięszowe komórki jądra obdarzone są zdolnością wydzielniczą. Z dalszych badań wynika, że tylko one spośród wszystkich komórek składających się na strukturę jądra wyposażone są w „zestaw” enzymatyczny niezbędny do produkcji męskich hormonów płciowych (10). Miejscem występowania wszystkich enzymów uczestniczących w produkcji testosteronu z pregnenolonu jest gładkie retikulum endoplazmatyczne i to zarówno u człowieka jak i u innych badanych zwierząt, tj. szczura, królika, myszy i świnki morskiej (11).

Interesujące wnioski na temat rozmieszczenia enzymów syntetyzujących sterydy w strukturach subkomórkowych wypływają z badań Inano i Tamaki (12). Otóż w jądrach szczura pregnenolon ulega przekształceniu wyłącznie w progesteron. 17 α -hydroksylacji nie podlega on nawet w obecności nadmiaru NADPH i cząsteczkowego tlenu, które sprzyjają działaniu 17 α -hydroksylazy a przeciwdziałają przemianie sterydów szeregu Δ^5 w sterydy szeregu Δ^4 .

Progesteron wytworzony z pregnenolonu ulega bardzo łatwo działaniu 17 α -hydroksylazy, przekształcając się w 17 α -hydroksyprogesteron. Oznacza to, że kolejność poszczególnych etapów biosyntezy hormonów sterydowych w danym narządzie jest ściśle określona i nie ulega zmianie pod wpływem zmienionych warunków. Próba przesunięcia procesu biosyntezy z toru Δ^4 na tor Δ^5 przez dodanie do frakcji mikrosomalnej jąder szczura 7 α -hydroksyandrostendionu, znanego inhibitora 3 β -hydroksysterydodehydrogenazy i izomerazy, nie dało również spodziewanych efektów. W tych warunkach pregnenolon nie przekształcał się ani w progesteron ani w hydroksylowane metabolity typu Δ^5 .

Badania gruczołu krokowego (prostaty) szczura pod względem występowania w nim enzymów modyfikujących strukturę hormonów sterydowych, doprowadziły do wykrycia aktywności 3 α -hydroksysterydodehydrogenazy i Δ^4 -5 α -reduktazy (13, 14). Oba enzymy uczestniczą w interkonwersji trzech ważnych hormonów androgennych: 5 α -dwohydrotestosteronu, testosteronu i androstandiolu (15, 16). Rozdział frakcji subkomórko-

wych zmodyfikowaną metodą (17, 18) i ich badanie na obecność enzymów ujawniły, że miejscem występowania obu enzymów jest — dość nietypowo — zewnętrzna błona jąder komórkowych oraz, w mniejszym stopniu, cytosol. Fizjologiczna rola tych enzymów w prostatie nie jest dotychczas znana, można jednak przypuszczać, że polega ona na kontroli i regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia 5α -dwuhydrotestosteronu, który jest najsilniej działającym naturalnym androgenem (19).

II-3. Pęcherzyk jajnikowy, ciało żółte, macica

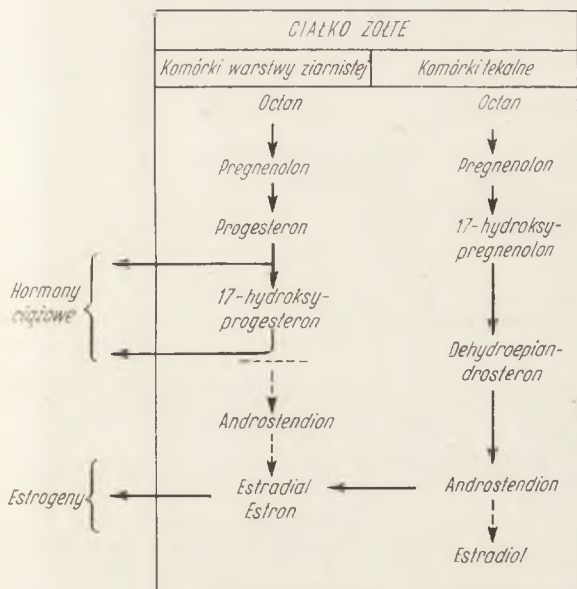
Jajnik, najogólniej biorąc, składa się z trzech elementów: pęcherzyków jajnikowych czyli pęcherzyków Graafa, ciała żółtego oraz zrębu łącznotkankowego. W pęcherzyku jajnikowym można wyróżnić następujące elementy strukturalne: komórkę jajową, osłonkę przejrzystą, płyn pęcherzykowy, błonę ziarnistą, błonę podstawową, warstwę wewnętrzną osłonki pęcherzyka jajnikowego zbudowaną z tzw. komórek tekalnych (osłonkowych) oraz warstwę zewnętrzną osłonki pęcherzyka jajnikowego. Czynność dokrewna jajnika polega na produkcji hormonów estrogennych (17β -estradiol i estron), hormonów progestagennych (progesteron i 17α -hydroksyprogesteron) a także niewielkich ilości androgenów (testosteron i androstendion).

Badania lat ostatnich dały odpowiedź na pytanie, jakie komórki są miejscem powstawania poszczególnych grup hormonów oraz w jakich strukturach subkomórkowych występują układy enzymatyczne katalizujące poszczególne etapy biosyntezy. Jediną czynną wydzielniczo warstwą komórek w pęcherzyku jajnikowym są komórki tekalne znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych. Dysponują one zestawem enzymów zdolnych do biosyntezy androgenów i przekształcenia ich w estrogeny.

Jajeczkowanie zapoczątkowuje proces tworzenia się ciała żółtego, w którym główną rolę spełniają nabłonkowe komórki błony ziarnistej. Po owulacji zaczynają się one szybko rozrastać i w ciągu kilku dni osiągają duże rozmiary. Do warstwy tych komórek przenikają komórki warstwy wewnętrznej osłonki pęcherzyka jajnikowego a wraz z nimi naczynka włosowate powodując niszczenie błony podstawowej i unaczynienie komórek ziarnistych. W wyniku tych przemian komórki ziarniste nabierają zdolności sekrecyjnych.

Inkubowanie komórek warstwy ziarnistej ludzkiego ciała żółtego z ^3H -pregnenolonem prowadzi do powstawania progesteronu i 17α -hydroksyprogesteronu, nie zanotowano natomiast wyraźnej przemiany w androgeny i estrogeny. W komórkach tekalnych ciała żółtego zaś, podobnie jak w pęcherzyku jajnikowym, z pregnenolonu tworzą się androgeny i estrogeny.

Tak więc estrogeny powstają głównie w komórkach tekalnych pęcherzyka jajnikowego oraz w komórkach tekalnych ciała żółtego, które w procesie powstawania corpus luteum wniknęły do warstwy komórek ziarnistych. Natomiast w komórkach ziarnistych, wskutek deficytu C_{17} — C_{20} -liazy, odłączającej łańcuch boczny przy C_{17} , końcowym produktem biosyntezy sterydów są 2 hormony progestagenne: progesteron i 17α -hydroksyprogesteron (Ryc. 5).



Ryc. 5. Dwa tora biosyntezy hormonów w ciałku żółtym (20).

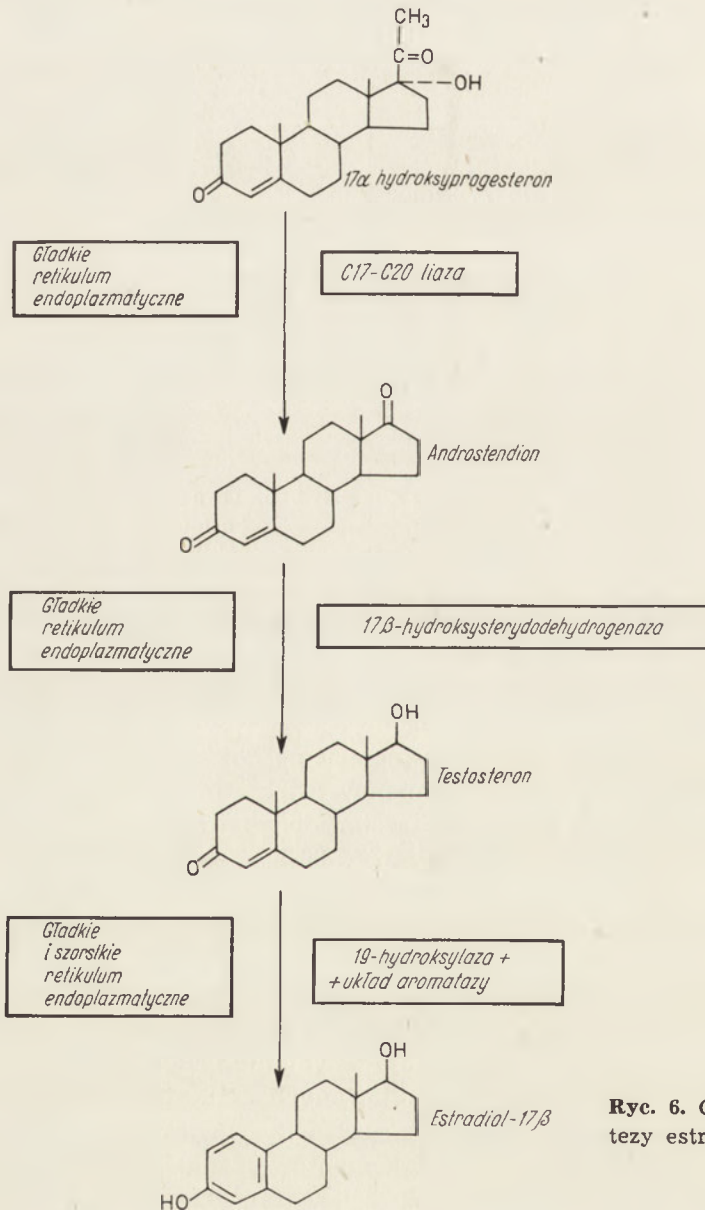
Hormony estrogenne, w odróżnieniu od innych grup hormonów sterydowych, zawierają aromatyczny pierścień A, co nadaje grupie hydroksylowej w pozycji 3 charakter fenolowy. Ich biosynteza polega na utlenianiu w cząsteczkach androgenów węgla 19, usunięciu go w formie formaldehydu oraz aromatyzacji (dehydrogenacji) pierścienia A.

Enzymy katalizujące biosyntezę hormonów estrogennych i progestogennych, a więc zarówno układ 3β -hydroksysterydodehydrogenazy i Δ^5 - Δ^4 -izomerazy, przekształcający związki typu Δ^5 - 3β -hydroksy w hormony progestagenne, jak i układ aromatazy przekształcający androgeny w hormony estrogenne — związane są z gładkim retikulum endoplazmatycznym (Ryc. 6).

Na uwagę zasługują opublikowane ostatnio wyniki badań 17β -hydroksysterydodehydrogenazy występującej w błonie śluzowej macicy (endometrium) (21, 22, 23). Enzym ten katalizuje utlenianie grupy 17β -hydroksylowej zarówno sterydów typu C_{18} (zbudowanych z 18 atomów węgla) jak i C_{19} (24, 25). Ciekawe, że wykryto go zarówno we frakcji rozpuszczalnej jak i frakcjach powstających z fragmentów gładkiego retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów oraz jąder komórkowych (21, 26).

Enzym posiada grupy sulfhydrylowe, które są elementem warunkującym jego aktywność. Metale ciężkie powodują inaktywację enzymu. Sterydy typu C_{18} z aromatycznym pierścieniem A (estrogeny), a wśród nich estradiol-17 β , stanowią właściwy, najbardziej reaktywny substrat.

Hormony androgenne mogą również być substratami tej reakcji, ale bieżnie ona znacznie wolniej niż przy użyciu estrogenów. Jedyny wyjątek



Ryc. 6. Główne etapy biosyntezy estradiolu.

od tej reguły stanowi szybsza niż w przypadku estronu redukcja androstendionu przez mitochondria nowotworowo zmienionej śluzówki macicy (21). Enzym o podobnych własnościach występuje w łożysku (27, 28).

II-4. Łożysko

Znamienną cechą ciąży jest progresywny wzrost biosyntezy hormonów estrogennych oraz wydalania z moczem ich metabolitów. Odkrycie ścisłego związku między wydalaniem estriolu i rozwojem płodu oraz wydalaniem pregnandiolu i rozwojem łożyska wskazywało na wyraźny udział płodu i łożyska w produkcji sterydów wykrywanych w moczu matki. Płód i łożysko zachowują się jak dwa kompartmenty jednolitego zespołu funkcjonalnego, który nazwano jednostką płodowo-łożyskową (*foeto-placental unit*). Zarówno substraty jak i układy enzymatyczne biorące udział w biosyntezie hormonów sterydowych występują w obu kompartmentach jednostki płodowo-łożyskowej w sposób wzajemnie się uzupełniający (29).

Korę nadnerczy płodu ludzkiego cechuje znaczny przerost tzw. „warstwy płodowej” mieszczącej się w sąsiedztwie rdzenia nadnerczy, a więc na miejscu warstwy siatkowatej kory dojrzalej. We wczesnym okresie rozwoju płodowego kora nadnerczy rozwija się szybciej niż inne narządy, osiągając największe rozmiary w czwartym miesiącu ciąży. U noworodka następuje bardzo szybka involucja narządu (powrót do prawidłowych rozmiarów).

W pierwszej połowie ciąży kora nadnerczy płodu ludzkiego wykazuje deficyt 3β -hydroksysterydodehydrogenazy i Δ^5 - Δ^4 -izomerazy, powodujący nasiloną produkcję z pregnenolonu androgenów typu Δ^5 , głównie dehydroizoandrosteronu i 16α -hydroksydehydroizoandrosteronu. Płodowe nadnercza mogą nie tylko syntetyzować pregnenolon *de novo*, ale również przekształcać w androgeny pregnenolon wytworzony przez łożysko. Pregnenolon ulega najpierw hydroksylacji w pozycji 17 z utworzeniem 17α -hydroksypregnenolonu, który pod działaniem liazy traci łańcuch boczny, przekształcając się w dehydroizoandrosteron. Ten ostatni związek może ulec hydroksylacji do 16α -hydroksydehydroizoandrosteronu.

W łożysku komórki trofoblastu, których zadanie polega na zaopatrywaniu zarodka w substancje odżywcze, rozrastają się w głąb błony śluzowej macicy, różnicując się przy tym na warstwę zewnętrzną, czyli syncytiotrofoblast oraz wewnętrzną — cytotrofoblast.

Enzymy sterydogenezy wykryto histochemicznie w syncycjotrofoblastach. Zespół enzymów odłączających łańcuch boczny od cząsteczki cholesterolu znajduje się w mitochondriach a enzymy katalizujące reakcje aromatyzacji androgenów — w gładkim retikulum endoplazmatycznym. Ponadto łożysko zawiera enzymy potrzebne do syntezy cholesterolu z aktywnego octanu. Wszystko więc wskazuje na to, że rozmieszczenie enzymów katalizujących biosyntezę sterydów w ultrastrukturach komórek

tego narządu oraz mechanizmy tych reakcji są takie same jak w innych gruczołach produkujących sterydy. Jedyny wyjątek stanowi biosynteza estrogenów. W odróżnieniu od jajnika, łożysko nie może produkować ich z octanu poprzez cholesterol i pregnenolon, lecz uzależnione jest od dopływu androgenów powstających w nadnerczach matki i płodu.

W tabeli 1 zestawiono dane dotyczące subkomórkowego rozmieszczenia enzymów sterydogenezy w różnych typach komórek produkujących hormony sterydowe.

Wynika z niej, że dwa zespoły enzymów działające na wczesnych etapach biosyntezy, występują we wszystkich komórkach wytwarzających hormony sterydowe. Są to: 1) mitochondrialny układ obcinający łańcuch boczny cholesterolu, w którego skład wchodzi 20 α i 22-hydroksylaza cholesterolu oraz liaza 20, 22-dwuhydroksycholesterolu, 2) mikrosomalny układ przekształcający sterydy typu Δ^5 -3 β -hydroksy (grupa hydroksylowa w pozycji 3 β i wiązanie podwójne między 5 i 6 atomem węgla) w sterydy typu Δ^4 -3-keto (grupa ketonowa w pozycji 3 i wiązanie podwójne między węglem 4 i 5). Zawiera on 3 β -hydroksysterydodehydrogenazę i Δ^4 - Δ^5 -izomerazę.

Inne enzymy sterydogenezy, które modyfikują strukturę hormonu w kierunku zwiększenia jej funkcjonalnej swoistości, występują tylko w niektórych komórkach.

III. Mechanizm hydroksylacji pierścienia sterydowego

W procesie biosyntezy hormonów sterydowych zasadniczą rolę odgrywają reakcje hydroksylacji zachodzące w różnych pozycjach pierścienia steranowego. Zalecana przez Komisję Słownictwa Biochemicznego (30) nazwa enzymów katalizujących te procesy brzmi: hydroksylazy. Jednakże w piśmiennictwie spotyka się szereg innych, często mylących czytelnika, określeń jak oksygenazy, oksigenazy o funkcji mieszanej, oksydazy o funkcji mieszanej czy monooksydazy.

Reakcje hydroksylacji związków o strukturze sterydowej sprzężone są ze specyficznym łańcuchem przenoszenia elektronów, związanym z wewnętrzną błoną mitochondriów (31). Droga transportu elektronów przy 11 β i 18-hydroksylacji pochodnych pregnanu, a prawdopodobnie również przy 20- i 22-hydroksylacji cholesterolu, przedstawia rycina 7.

W procesie tym biorą udział dwa substraty ulegające utlenianiu: związek sterydowy i NADPH. Do utworzenia grupy hydroksylowej, wprowadzanej do pierścienia sterydowego, wykorzystany zostaje jeden atom tlenu cząsteczkowego. Z drugiego atomu tlenu tworzy się cząsteczka wody.

NADPH redukuje grupę prostetyczną flawoproteidu, a ten powoduje redukcję adrenodoksyny, białka zawierającego niehemowo związane żelazo (3). Adrenodoksyna redukuje cytochrom P-450, który wiąże tlen czą-

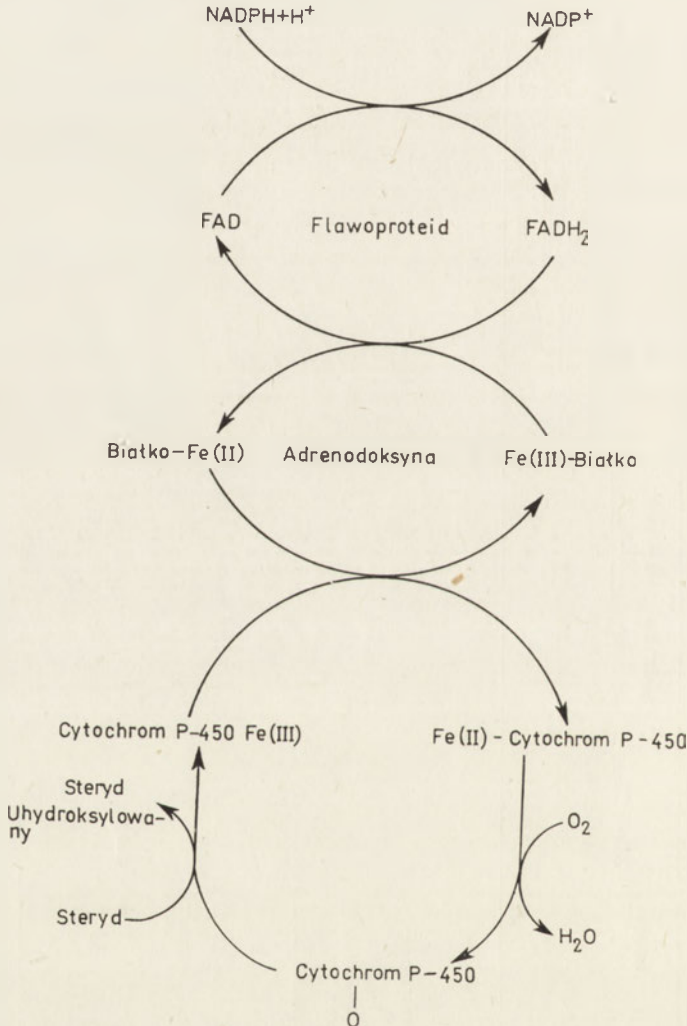
Tabela 1.

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie enzymów uczestniczących w biosyntezie hormonów sterydowych

Frakcja subkomórkowa	Enzym	Mitochondria		Mikrosomy (retikulum endoplazmatyczne)					Mitochondria		Produkt biosyntezy	
		20 α - i 22-hydroksylaza + liaza	3 β -hydroksydehydrogenaza + izomeraza	Hydroksylazy		17, 20-liaza	19-hydroksylaza + atromataza	17-kcto reductaza sterydy typu		Hydroksylazy		
				21	17			C ₁₈	C ₁₉	11 β		18
Tkanka												
Kora nadnerczy	Warstwa kłębkowata	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	Aldosteron
	Warstwa pasmowata	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	Kortyzol
	Warstwa siatkowata	+	-	?	+	-	-	?	-	-	-	Dehydroizoandrosteron
Jajnik	Łożysko	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	Progesteron + estrogeny
	Pęcherzyk jajnikowy	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	Estrogeny
	Ciałko żółte	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	Progesteron + estrogeny
Jądro	Tkanka śródmiąższowa	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	Androstendion + testosteron
	Tkanka śródmiąższowa	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	Testosteron + androstendion
	Tkanka guza	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	11 β -hydroksytosteron

steczkowy, tworząc „aktywny kompleks tlenowy”. W wyniku reakcji tego kompleksu z cząsteczką sterydu powstaje steryd uhydroksylowany oraz utleniona forma cytochromu.

Hydroksylacje sterydów są procesami wysoce specyficznymi: grupy hydroksylowe zostają przyłączone do określonych atomów węgla i w ściśle określonej konfiguracji przestrzennej. Specyficzność pozycyjna i konfiguracyjna hydroksylacji pierścienia sterydowego zależy prawdopodobnie od współdziałania odpowiedniej hydroksylazy z cytochromem P-450.



Ryc. 7. Łańcuch przenoszenia elektronów uczestniczący w reakcjach hydroksylacji sterydów.

Adrenodoksyna — żelazoproteid nie posiadający grupy hemowej. Atomy żelaza łączą się bezpośrednio z siarką grup sulfhydroksylowych cysteiny wchodzących w skład części białkowej. Flawoproteid — oksydo-reduktaza zawierająca dwunukleotyd flawinoadeninowy jako grupę prostetyczną.

Uważa się, że hydroksylacje pierścienia steranowego w różnych pozycjach przebiegają z udziałem odrębnych cytochromów P-450 (32, 33).

Hydroksylazy współzawodniczą z łańcuchem oddechowym zarówno o dawcę elektronów (NADPH) jak i o tlen. Reakcje przez nie katalizowane są więc dla komórki energetycznie niekorzystne.

Nie zidentyfikowano dotąd składników układu przenoszenia elektronów w retikulum endoplazmatycznym komórek produkujących hormony sterydowe, gdzie zachodzą hydroksylacje w pozycji 21 i 17 α . Badania mechanizmu hydroksylacji progesteronu i 17 α -hydroksyprogesteronu w pozycji 21 przez retikulum endoplazmatyczne komórek kory nadnerczy (34) wskazują, że do przebiegu tej reakcji potrzebny jest NADPH, tlen cząsteczkowy, cytochrom P-450 i flawoproteid. W tym układzie enzymatycznym nie znaleziono natomiast adrenodoksyny. Przeciwnie, dodanie białka zawierającego żelazo związane niehemowo do badanego układu hamuje 21-hydroksylację sterydów.

IV. Uwagi końcowe

Hormony sterydowe powstają z cholesterolu w komórkach wysoko wyspecjalizowanych tkanek zwierzęcych: kory nadnerczy, jąder, pęcherzyków jajnikowych i ciała żółtego a w okresie ciąży — łożyska. Enzymy odpowiedzialne za przemianę cholesterolu w pregnenolon, czyli za pierwszy etap sterydogenezy, występują w mitochondriach komórek wymienionych gruczołów. Ten zespół enzymów składa się z hydroksylaz oraz układu transportującego elektrony, w którym bierze udział NADPH, FADH₂, adrenodoksyna i cytochrom P-450.

Pregnenolon jest kluczowym prekursorem hormonów sterydowych. Enzymy, które przekształcają go w hormony, związane są, z wyjątkiem dwóch, z retikulum endoplazmatycznym komórek gruczołowych. Te dwa wyjątki to 11 β - i 18-hydroksylazy, które występują w błonie wewnętrznej mitochondriów komórek kory nadnerczy.

Dla pęcherzyka jajnikowego, ciała żółtego i łożyska charakterystyczne jest występowanie zespołu enzymów (19-hydroksylaza i tzw. aromataza), przekształcającego androgeny w hormony estrogenne. Ta szczególna sytuacja, że męskie hormony płciowe są tworzywem służącym do budowy substancji warunkujących żeńskie cechy organizmu, ma swój legendarny odpowiednik w opowieści o powstaniu Ewy z żebra Adama, opisaney w pierwszej księdze Starego Testamentu.

Osiągnięcie znacznego postępu w poznaniu szlaków biosyntezy hormonów sterydowych a także funkcji i własności enzymów katalizujących poszczególne etapy biosyntezy doprowadziło do wykrycia i dokładnej charakterystyki różnych anomalii procesu sterydogenezy, warunkujących ciężkie zespoły kliniczne. Tak np. brak lub deficyt 11 β i 21-hydroksylaz

wywołuje grupę genetycznie uwarunkowanych schorzeń znanych jako zespół nadnerczowo-płciowy. Jeszcze groźniejsze skutki kliniczne pociąga za sobą brak lub deficyt dehydrogenazy 3β -hydroksysterydów.

Artykuł nadszedł 14.5.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 22.9.1976.

PISMIENICTWO

1. Fouts J. R., (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **6**, 373—378.
2. Dallner G., Orrenius S., Bergstrand A., (1963), *J. Cell. Biol.* **16**, 426—430.
3. Tamaoki B., (1973), *J. Steroid Biochem.*, **4**, 89—118.
4. Dodge A. H., Christensen A. K., Clayton R. B., (1970), *Endocrinology*, **87**, 254—261.
5. Yago N., Kobayashi S., Sekiyama S., Kurokawa H., Iwai I., Suzuki I., Ichii S., (1970), *J. Biochem. (Tokyo)*, **68**, 775—783.
6. Schoen E. J., (1964), *Endocrinology*, **75**, 56—65.
7. Inano H., Tamaoki B., (1968), *Endocrinol. Japan.*, **15**, 197—203.
8. LeBourhis E. E., Hofmann F. G., (1968), *Endocrinology*, **82**, 633—637.
9. Inano H., Machino A., Tamaoki B., Tsubura Y., (1968), *Endocrinology*, **83**, 659—670.
10. Van der Vusse G. J., Kalkman M. L., Van der Molen H. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 473—485.
11. Tamaoki B., Shikita M., (1966), w *Steroid Dynamics*, red. Pincus G., Nakao T., Tait J. F., str. 493—530, Academic Press, Nowy York.
12. Inano H., Tamaoki B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 482—493.
13. Van Doorn E. J., Bird C. E., Clark A. F., (1975), *Endocrinol. Res. Commun.*, **2**, 471—487.
14. Taurog J. D., Moore R. J., Wilson J. D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 810—817.
15. Krieg M., Horst H. J., Sterba M. L., (1975), *J. Endocrinol.*, **64**, 529—538.
16. Tveter K. J., Hansson V., Unhjem O., (1975), w *Molecular Mechanisms of Gonadal Hormone Action*, *Advances in Sex Hormone Research*, red. J. A. Thomas i R. Singhal, tom 1, str. 17, University Park Press, Baltimore.
17. Nozu K., Tamaoki B., (1973), *Acta Endocrinol.*, **73**, 585—598.
18. Moore R. J., Wilson J. D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 958—967.
19. Bruchoovsky N., (1971), *Endocrinology*, **89**, 1212—1222.
20. Szukalski B., (1971), w *Zarys metabolizmu hormonów sterydowych*, str. 98, PWN, Warszawa.
21. Pollow K., Lübbert H., Pollow B., (1976), *J. Steroid Biochem.*, **7**, 45—50.
22. Pollow K., Lübbert H., Jeske R., Pollow B., (1975), *Acta Endocrinol. (Kbh)*, **79**, 146—156.
23. Pollow K., Lübbert H., Pollow B., (1975), *Acta Endocrinol.*, **80**, 355—364.
24. Siiteri P. K., Ashby R., Schwartz B., McDonald P. C., (1972), *J. Steroid Biochem.*, **3**, 459—470.
25. Gabb R. G., Stone G. M., (1974), *J. Endocrinol.*, **62**, 109—123.
26. Pollow K., Lübbert H., Boquoi E., Kreuzer G., Jeske R., Pollow B., (1975), *Acta Endocrinol.*, **79**, 134—145.
27. Billiar R. B., Little B., (1971), *Endocrinology*, **88**, 263—267.

28. Pollow K., Sokolowski G., Grunz H., Pollow B., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 501—514.
29. Szukalski B., (1976), *Endokrynologia Polska*, **27**.
30. Korzybski T., (1967), *Enzymy, nomenklatura i klasyfikacja*, PWN, Warszawa.
31. Rapp J. P., Dahl L. K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1235—1242.
32. Shikita M., Hall P. F., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5598—5604.
33. Ramseyer J., Harding B. W., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **315**, 306—316.
34. Cooper D. Y., Narasimhulu S., Rosenthal O., Estabrook R. W., (1968), w *Functions of the Adrenal Cortex*, red. McKerns K. W., tom 2, rozdział 23, Appleton — Century — Crofts, Nowy York.

WOJCIECH RODE *)

Oczyszczanie enzymów i innych białek biologicznie czynnych przez chromatografię na substancjach niskocząsteczkowych unieruchomionych w fazie stałej

Purification of Enzymes and Other Biologically Active Proteins by Means of Chromatography on Low Molecular Substances Immobilized on Solid Supports

Spis treści:

I. Chromatografia powinowactwa biologicznego

I-1. Wiadomości wstępne

I-2. Wybór afinantu

I-3. Wybór wysokocząsteczkowego nośnika

I-4. Wybór sposobu związania afinantu z nośnikiem

I-5. Wybór warunków adsorpcji biologicznie swoistej

I-6. Wybór warunków elucji izolowanego białka

II. Chromatografia powinowactwa hydrofobowego

III. Chromatografia na unieruchomionych jonach metali ciężkich

Jednym z istotnych problemów metodycznych współczesnej biochemii jest rozwój technik umożliwiających jak najskuteczniejsze oczyszczanie białek biologicznie czynnych bez naruszania ich budowy oraz właściwości. Poniżej opisano trzy techniki, w których rozdział białek zachodzi na zasadzie różnego powinowactwa pomiędzy tymi białkami a określonymi substancjami niskocząsteczkowymi, unieruchomionymi w fazie stałej. O wyborze tych technik do wspólnego omówienia zdecydowało podobieństwo budowy adsorbentów chromatograficznych wykorzystywanych przez nie. Adsorbent taki składa się z wysokocząsteczkowego, nierozpuszczalnego nośnika oraz związanych z nim cząsteczek ligandu, obdarzonego powinowactwem do oczyszczanego białka. Każda z opisanych technik wykorzystuje inny typ powinowactwa między ligandem a oczyszczanym białkiem. Nie należy jednak zapominać, że występowanie powinowactwa jednego

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

typu pomiędzy określonym ligandem a oczyszczanym białkiem nie wyklucza występowania innego typu powinowactwa pomiędzy tymże ligandem a białkami innymi niż to oczyszczane. Dlatego wydaje się, że posługując się którąkolwiek z opisanych technik należy znać podstawy każdej z nich.

I. Chromatografia powinowactwa biologicznego ¹⁾

I-1. Wiadomości wstępne

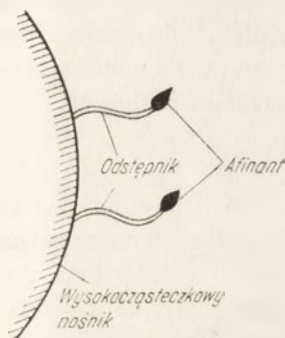
Technika ta, rozwinięta w bieżącym dziesięcioleciu, umożliwiła znaczny postęp w dziedzinie izolowania enzymów i innych białek aktywnych biologicznie. Wcześniej stosowane „klasyczne” techniki rozdzielające wykorzystywały różnice w zakresie fizyko-chemicznych własności białek. Przewaga chromatografii powinowactwa biologicznego nad tymi technikami wynika z wykorzystania indywidualnej własności oczyszczanego białka, jaką jest biologiczne powinowactwo do określonej substancji, stosowanej jako afinant. Unieruchomienie afinantu w fazie stałej (zwykle przez związanie kowalencyjne z wysokocząsteczkowym nośnikiem) oraz znalezienie warunków umożliwiających odwracalne wiązanie się z nim oczyszczanego białka może pozwalać nawet na jednoetapowe uzyskiwanie jego homogennych preparatów z surowego wyciągu tkankowego. Afinantem może być substancja wysokocząsteczkowa (białko lub kwas nukleinowy) lub niskocząsteczkowa (substrat lub efektor enzymu). Dalsza część pracy traktować będzie wyłącznie o tej drugiej sytuacji.

Pierwszym, który zastosował zasadę chromatografii powinowactwa biologicznego do izolowania enzymu, był Starkenstein (1). Wyizolował on α -amylazę poprzez sorpcję na nierozpuszczalnej skrobi i elucję roztworem rozpuszczalnej skrobi. Znacznie później skorzystano z kolumny skrobiowej przy rozdzieleniu α - i β -amylazy (2). Do prac prekursorskich w zakresie omawianej techniki należały także oczyszczenie tyrozynazy przy użyciu aminofenolu związanego z celulozą (3), oczyszczenie kinazy flawinowej przy użyciu pochodnej flawiny związanej z celulozą (4) oraz oczyszczenie oksydazy glikolanowej przy użyciu flawinomonofosforanu związanego z celulożą (5).

Przełomu w zakresie rozpowszechnienia chromatografii powinowactwa biologicznego dokonało zastosowanie przez Cuatrecasasa i wsp. (6) agarozy (preparat firmy Pharmacia pod nazwą Sepharose), jako wysokocząsteczkowego nośnika wiążącego afinant. Stało się to możliwe dzięki

¹⁾ Ze względu na brak ustalonego polskiego słownictwa w zakresie omawianej techniki w pracy stosowano następujące terminy: chromatografia powinowactwa biologicznego (= *bioaffinity chromatography* (10,11), adsorbent biologicznie swoisty (= *affinity adsorbent* (10), afinant (= *affinant, ligand*), odstępnik (= *spacer-arm*), elucja biologicznie swoista (= *bioelution*).

badaniom Axéna i Poratha (7) nad aktywacją cyjanohalogenkami makrocząsteczek polisacharydowych (typu Sephadex). Po opracowaniu metod przeprowadzania nośników polisacharydowych w pochodne, umożliwiające związanie różnego rodzaju afinantów (8), techniką chromato-



Ryc. 1. Schemat budowy adsorbenta biologicznie swoistego.

grafii powinowactwa biologicznego zaczęto posługiwać się bardzo powszechnie przy oczyszczaniu różnych białek czynnych (9).

Opracowanie metody oczyszczania enzymu techniką chromatografii powinowactwa biologicznego wymaga wyboru odpowiedniego afinantu i wysokocząsteczkowego nośnika, wyboru sposobu związania afinantu z nośnikiem oraz znalezienia warunków biologicznie swoistej adsorpcji enzymu i jego elucji z adsorbenta. Schemat budowy adsorbenta biologicznie swoistego przedstawia rycina 1.

I-2. Wybór afinantu

Afinantem stosowanym przy chromatografii powinowactwa biologicznego może być tylko związek wykazujący wysokie powinowactwo do izolowanego białka. Może to być analog substratu o charakterze inhibitora, efektor, kofaktor lub w niektórych przypadkach substrat. Substrat może służyć jako afinant, o ile wiąże enzym w warunkach nie sprzyjających katalizie, na przykład pod nieobecność aktywatora, gdy zależności K_M i k_{kat} od pH są różne czy też w niskiej temperaturze. Enzym wymagający dwóch substratów może być izolowany na unieruchomionym jednym z substratów, o ile zachowuje w stosunku do niego powinowactwo pod nieobecność drugiego substratu. Czasem można także w takim przypadku wykorzystać powstawanie kompleksu enzym—substrat z drugim substratem lub jego analogiem (10—15) — o ile kompleks taki jest w warunkach chromatografii nieaktywny — przy czym jeden z niskocząsteczkowych składników kompleksu musi pozostawać unieruchomiony, a drugi powinien być obecny w buforze, z którego adsorbowany jest enzym.

Zakłada się, że powinowactwo wybranego afinantu w stosunku do izolowanego białka powinno odpowiadać K_I lub $K_M < 10^{-4}$ (16). Ponadto cząsteczka afinantu musi posiadać grupę funkcyjną, umożliwiającą zwią-

zanie z wysokocząsteczkowym nośnikiem. Zablockowanie tej grupy nie może powodować zaniku powinowactwa afinantu do izolowanego białka.

Jako afinant można zastosować także związek wykazujący powinowactwo w stosunku do grupy enzymów, jako ich wspólny substrat lub kofaktor (na przykład NAD^+ , ATP). Taki „powszechny afinant” (= *general ligand*), unieruchomiony, umożliwia biologicznie swoistą adsorpcję całej grupy enzymów. Izolowanie poszczególnych białek wymaga wówczas opracowania warunków biologicznie swoistej elucji każdego z nich (17).

I-3. Wybór wysokocząsteczkowego nośnika

Idealnym nośnikiem z punktu widzenia chromatografii powinowactwa biologicznego byłby taki, który nie oddziaływałby z białkami na zasadzie sorpcji, wymiany jonowej czy też sita molekularnego. Nośnik taki powinna cechować znaczna porowatość (rzadkie usieciowanie), udostępniająca dużą powierzchnię dla wiązania afinantu i umożliwiającą dostęp do afinantu dużym cząsteczkom. Cząstki nośnika winny być kuliste, w celu zapewnienia równego upakowania kolumny oraz dobrego przepływu. Wymagana jest zupełna nierozpuszczalność nośnika w wodzie przy znacznej hydrofilności oraz stabilność fizyko-chemiczna w warunkach zmienności pH (w zakresie 2—12), siły jonowej, temperatury, a także w obecności substancji denaturujących białko (detergenty, mocznik, guanidyna). Nośnik musi mieć także odpowiednio dużą liczbę grup funkcyjnych, których aktywacja lub modyfikacja, w warunkach nie naruszających struktury nośnika, pozwala na chemiczne związanie ligandu.

Żaden ze stosowanych dotychczas nośników, jak na przykład celuloza (3—5), liniowe kopolimery etylenu z bezwodnikiem maleinianowym (18), polistyren (8, 19, 20), żele hydroksyalkilometakrylanowe (21) i poliakrylamidowe (8,22), porowate kulki szklane (23) oraz agaroz (6, 23, 24) nie spełnia wymagań stawianych nośnikowi idealnemu. Najbliższa ich spełnienia wydaje się być jednak najczęściej stosowana agaroz (Sepharse).

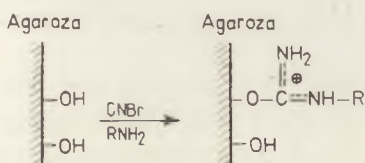
Dokładne opisy właściwości poszczególnych nośników oraz sposobów ich aktywacji znaleźć można w pracach Cuatrecasasa (25), Guilforda (26), Weetalla (16), Parikha i wsp. (27), Poratha (28), Turkovej (29), Weetalla i Filberta (30) i Slavika (31).

I-4. Wybór sposobu wiązania afinantu z nośnikiem

Jednym z najbardziej rozpowszechnionych wśród zainteresowanych badaczy poglądów jest ten, że niskocząsteczkowy afinant powinien być związany z wysokocząsteczkowym nośnikiem poprzez odstępnik, zapewniający zachowanie pewnej odległości pomiędzy cząsteczką afinantu a nośnikiem (8, 16, 23—25). Odsunięcie afinantu od powierzchni nośnika ma być konieczne dla umożliwienia jego swobodnego oddziaływania z izolowanym białkiem. Przekonanie o konieczności stosowania odstępnika po-

chodzi stąd, że przy opracowywaniu metod izolowania kilku enzymów stwierdzono wyraźną zależność występowania adsorpcji enzymu od tego, czy stosowany adsorbent swoisty posiadał afinant związany z nośnikiem bezpośrednio czy też przez odstępnik (6, 8, 32—34). Wykazano także wyraźny wpływ długości odstępnika na efektywność adsorpcji (33, 34). Na przykład w doświadczeniu Steersa i wsp. (34) p-aminofenilo- β -tiogalaktopiranozyd (inhibitor β -galaktozydazy) związany z agarozą silnie adsorbował β -galaktozydazę z wyciągu z *E. coli* dopiero wtedy, gdy od agarozy oddzielony był ośmiowęglowym, węglowodorowym odstępnikiem, o długości około 20 Å.

Przy syntezie odstępników stosuje się zwykle węglowodory alifatyczne lub aromatyczne, posiadające grupy funkcyjne ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$), które umożliwiają łatwe dwustronne związanie cząsteczki. Związki te można wiązać szeregowo, otrzymując odstępnik pożądanej długości (8, 24, 25). Zaczęto także stosować odstępniki wysokocząsteczkowe, na przykład polilizynę lub zdenaturowaną albuminę (35—38). Zaletą ich jest wielopunktowe powiązanie z nośnikiem, obniżające znacznie prędkość wyciekania liganda (= *ligand leakage*) z adsorbenta swoistego biologicznie (36, 37, 39). Wyciekanie liganda jest zjawiskiem, z którym należy się liczyć przy pracy z biologicznie swoistymi adsorbentami opartymi na agarozie aktywowanej cyjanobromkiem. Powstające pomiędzy grupą $-\text{OH}$ nośnika i grupą $-\text{NH}_2$ odstępника powiązanie ma głównie charakter N-podstawionego izomocznika (Ryc. 2) i nie jest absolutnie trwałe (40, 41).



Ryc. 2. N-podstawiony izomocznik, powstający w wyniku reakcji sprzężenia aktywowanej cyjanobromkiem agarozy z aminami.

Istnieją dwie drogi sprzężenia afinantu z nośnikiem poprzez odstępnik. Pierwsza polega na połączeniu afinantu z odstępnikiem i sprzężeniu otrzymanego produktu z nośnikiem (6), druga — na sprzężeniu nośnika z odstępnikiem i przyłączeniu do otrzymanego produktu afinantu (8). Wadą pierwszego sposobu jest konieczność przeprowadzenia bardziej skomplikowanej syntezy organicznej, wadą drugiego — możliwość wykazywania przez adsorbent biologicznie swoisty niepożądanych właściwości wymiennicza jonowego, wynikających z niepełnego wysycenia przez afinant grup funkcyjnych odstępника. Jednakże w przypadku adsorbentów biologicznie swoistych z nośnikiem agarozowym aktywowanym cyjanobromkiem, obecne w nich ugrupowanie izomocznikowe (Ryc. 2) stwarza zawsze możliwość oddziaływań o charakterze wymiany jonowej (37, 37a). Poza tym obecnie

wyduje się, że wpływ ewentualnych efektów jonowymiennych na przebieg chromatografii powinowactwa biologicznego jest niewielki i łatwo mu zapobiec działaniem podwyższonej siły jonowej eluentu (42). Dlatego godnym polecenia sposobem syntezy adsorbentów biologicznie swoistych jest raczej prostszy sposób drugi.

Obszerny przegląd reakcji umożliwiających wiązanie afinantu z nośnikiem poprzez odstępnik zawierają prace Weetalla (16), Cohena (43), Inmana (44), Sundberga i Poratha (44a), Wilcheka i Mirona (38) oraz Slavika (31).

W ostatnich latach pojawiły się prace, reprezentujące odmienny, ostrożniejszy i chyba bardziej uzasadniony pogląd na temat konieczności stosowania odstępnika oraz jego charakteru. Er-el i współautorzy (45) w trakcie opracowywania metody izolowania glikogenowej fosforylazy b stwierdzili, że aminooktylo-Sepharose adsorbuje ten enzym niezależnie od tego, czy z grupą aminooktylową jest związany glikogen. Wykazali oni, że adsorpcja enzymu jest skutkiem oddziaływań hydrofobowych pomiędzy łańcuchem węglowodorowym sprzężonym z Sepharose oraz białkiem enzymatycznym. Praca Er-ela i współautorów była jedną z tych, które dały początek nowej technice oczyszczania enzymów — chromatografii powinowactwa hydrofobowego (patrz rozdz. II). Ostrzegająca ona jednocześnie przed zbyt pochopnym, nie kontrolowanym stosowaniem odstępników węglowodorowych w chromatografii powinowactwa biologicznego. Warto wspomnieć, że prawie równoległe podobny fakt hydrofobowej adsorpcji syntetaz aminoacylo-tRNA na aminoheksylo-Sepharose stwierdzili Jakubowski i Pawełkiewicz (46), stawiając tym samym pod znakiem zapytania swoistość biologiczną opracowanej wcześniej metody oczyszczania tych enzymów (47).

Bardzo staranną analizę roli odstępnika podjęli O'Carra i wsp. (48). Wykazali oni, że zaprezentowana przez Steersa i wsp. (34) zależność adsorpcji β -galaktozydazy na p-aminofenylo- β -tiogalaktopiranozydzie sprzężonym z agarozą od długości odstępnika łączącego inhibitor z nośnikiem była skutkiem oddziaływań hydrofobowych. Oddziaływania tego samego typu uniemożliwiały stosowanie adsorbenta, zawierającego związany NAD^+ , przy izolowaniu niektórych dehydrogenaz (49). Ponadto O'Carra i wsp. (48) stwierdzili, że w przypadku hydrofobowego afinantu związanego z nośnikiem poprzez hydrofobowy odstępnik zachodzić może prawdopodobnie zjawisko, polegające na zwinięciu całej hydrofobowej cząsteczki. Taka „okluzja konformacyjna”, (11) spowodować może brak dostępności afinantu dla izolowanego białka. Wspomniani autorzy przyjęli założenie, że zastosowanie hydrofilowych odstępników wyeliminowałoby lub osłabiło większość zaobserwowanych niekorzystnych zjawisk (48). Opracowali oni proste metody syntezy odstępników hydrofilowych różnej długości (50). Odstępniki te, zastosowane zamiast wcześniej wypróbowanych odstępników hydrofobowych tej samej długości, rzeczywiście nie

wykazywały biologicznie nieswoistej sorpcji białek, nawet przy niskiej sile jonowej (50). Na przykład dehydrogenazę mleczanową oczyszczano na adsorbencie biologicznie swoistym, zawierającym analog substratu związany z Sepharose poprzez sześciowęglowy analog substratu związany z Sepharose poprzez sześciowęglowy odstępnik węglowodorowy. W obecności NADH (w buforze eluującym białka towarzyszące) enzym tworzył z koenzymem oraz z analogiem substratu trójcząsteczkowy kompleks dysocjujący, o ile w eluencie zabrakło NADH. Wyeliminowanie nieswoistej biologicznie adsorpcji białek przez odstępnik wymagało wysokiego stężenia soli w eluencie (0,3—0,5M) i było możliwe tylko wtedy, gdy stężenie związku odstępnik—afinant w żelu nie było zbyt wysokie (51, 52). Po zastosowaniu odstępnika hydrofilowego chromatografię można było prowadzić w rozcieńczonym buforze (50). Co więcej, zarówno w przypadku omówionej metody jak i innych (50), wprowadzenie hydrofilowych odstępników uniezależniło biologicznie swoistą adsorpcję enzymu od długości odstępnika.

Po podsumowaniu przedstawionych poglądów na temat roli odstępnika wydaje się, że długi odstępnik bywa potrzebny znacznie rzadziej niż to dotychczas powszechnie i dość bezkrytycznie zakładano. W przypadku stwierdzenia zależności domniemanej adsorpcji swoistej izolowanego białka od długości odstępnika, należy dokładnie sprawdzić swoistość biologiczną stosowanego układu chromatograficznego. Stosować przy tym można jako kryteria chromatografię kontrolną na adsorbencie pozbawionym afinantu oraz analizę parametrów chromatograficznych (11).

Zależność parametrów chromatograficznych przy rozdziale biologicznie swoistym powinno w przypadku elucji biologicznie nieswoistej (patrz Rozdz. 1-6) przedstawiać równanie 1

$$R_{\text{bio}} = \frac{Af}{K_{Af}} \quad (1)$$

zaś w przypadku elucji biologicznie swoistej (patrz Rozdz. I-6) równanie 2

$$R_{\text{bio}} = \frac{Af}{K_{Af}} \times \frac{K_{kAf}}{K_{kAf} + k_{Af}} \quad (2)$$

gdzie poszczególne symbole oznaczają:

R_{bio} — współczynnik przesunięcia chromatograficznego, będącego wynikiem wyłącznie powinowactwa biologicznego,

Af — stężenie sfinantu,

K_{Af} — stała dysocjacji kompleksu enzym-unieruchomiony afinant,

k_{Af} — stężenie „kontrafinantu” (patrz Rozdz. I-6) w eluencie,

K_{kAf} — stała dysocjacji kompleksu enzym-„kontrafinant”.

Nie zawsze korzystne jest zupełne wyeliminowanie oddziaływań biologicznie nieswoistych pomiędzy izolowanym białkiem i odstępnikiem, pod warunkiem że można ich siłą kontrolować, na przykład siłą jonową eluen-

tu. Słabą adsorpcję biologicznie swoistą mogą synergistycznie wzmocnić oddziaływania hydrofobowe (11, 49) na zasadzie „powinowactwa związku”²⁾ (10, 11).

I-5. Wybór warunków adsorpcji biologicznie swoistej

Adsorpcję białka prowadzić należy w warunkach (stosowany bufor, pH i siła jonowa) optymalnie sprzyjających oddziaływaniom pomiędzy białkiem i afinantem. Należy przy tym pamiętać, że nie zawsze pH optymalne dla katalizy enzymatycznej jest optymalne także dla wiązania substratu lub inhibitora przez enzym. Adsorbent biologicznie swoisty można stosować w formie kolumny lub jako zawiesinę. Drugi sposób stosuje się głównie przy adsorpcji białek z surowych wyciągów tkankowych, zawierających cząstki zatykające kolumnę. W przypadku stwierdzonej nieswoistej biologicznie adsorpcji białek elucję izolowanego białka należy poprzedzić elucją białek towarzyszących (na przykład w warunkach odpowiednio podwyższonej siły jonowej).

I-6. Wybór warunków elucji oczyszczanego białka

Wymywanie białka z kolumny przebiegać może na drodze elucji biologicznie swoistej lub nieswoistej. Najbardziej wybiórcza elucja swoista polega na wprowadzeniu do eluentu „kontrafinantu”, substancji współzawodniczącej z afinantem o miejsce wiązania na izolowanym białku. Elucja nieswoista polegać może na działaniu buforów deformujących białko (na przykład bufor fosforanowy) o wysokim stężeniu, zmian pH, temperatury oraz siły jonowej (11). W niektórych przypadkach stosowano też substancje rozfałdowujące białko, na przykład 6M chlorowodorek guanidyny (53). Czasem może też być korzystne usunięcie z kolumny nieaktywnego kompleksu afinant—białko. Można to osiągnąć w stosunkowo łagodnych warunkach, o ile afinant sprzężony jest z nośnikiem poprzez wiązanie azowe, estrowe (kwasu karboksylowego) lub tioestrowe (8, 25).

Obszerne zestawienia enzymów oczyszczanych techniką chromatografii powinowactwa biologicznego zawierają prace Wilcheka i Jakoby'ego (9), Turkovej (29) i Slavika (31).

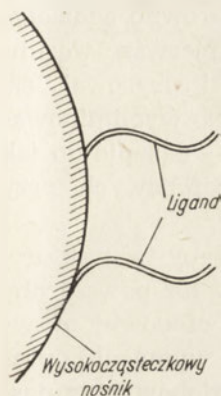
II. Chromatografia powinowactwa hydrofobowego³⁾

Rozdział białek przy zastosowaniu tej techniki oparty jest na oddziałyvaniach hydrofobowych pomiędzy obszarami hydrofobowymi cząsteczek białka i adsorbentem hydrofobowym, zbudowanym z nośnika wysokocząs-

²⁾ Chodzi o powinowactwo związku afinant—odstępnik do izolowanego białka.

³⁾ Ze względu na brak ustalonego polskiego nazewnictwa w zakresie omawianej techniki w pracy stosowano następujące terminy: chromatografia powinowactwa hydrofobowego (= *hydrophobic chromatography*), adsorbent hydrofobowy (= *hydrophobic adsorbent*), ligand (= *hydrophobic ligand*).

teczkowego, z którym związane są cząsteczki ligandu o charakterze lipofilnym (Ryc. 3). Grupy hydrofobowe białka, jako jeden z czynników warunkujących jego trzeciorzędową strukturę (54), są na ogół niedostępne jako ulokowane wewnątrz cząsteczki, jednak zarówno enzymy (55—57) jak i inne białka (58—60) mogą posiadać dostępne hydrofobowe miejsca wiążące, pełniące określone funkcje (na przykład wiązanie substratu).



Ryc. 3. Schemat budowy adsorbenta hydrofobowego.

Prace Er-ela i współautorów (45) oraz Yona (61) dały początek szerokiemu wykorzystaniu chromatografii hydrofobowej przy oczyszczaniu różnego rodzaju białek, jakkolwiek technikę tę stosowano już wcześniej przy frakcjonowaniu tRNA (62—63) oraz białek błon mitochondrialnych (64). Er-el i współautorzy (45), o wynikach których wspomniano już (patrz Rozdz. I-4), zsyntetyzowali homologiczną serię adsorbentów o ogólnym wzorze Sepharose—NH(CH₂)_nH. Stwierdzili oni, że ze wzrostem n (od 1 do 6) adsorbenty te wiążą coraz silniej glikogenową fosforylaze b z mięśni królika. W wyniku chromatografii surowego wyciągu z mięśni na kolumnie z bytulo-Sepharose uzyskali oni stukrotne oczyszczenie wspomnianego enzymu. Enzym uwalniano z kolumny działaniem buforu imidazolowo-cytrynianowego, wpływającego na konformację białka. Yon (61) adsorbował transkarbamoilaze asparaginianową z surowego wyciągu z kiełków pszenicy na N-(3-karboksypropionilo)aminodekyl—Sepharose i po wymyciu z kolumny dużej ilości białek towarzyszących 0,2M chlorkiem sodu, uwalniał enzym działaniem 0,2% dezoksycholanu sodu, 2% acetonu lub przez zmianę pH z 8 na 10. Wyniki obu prac wskazywały na zdecydowaną zależność adsorpcji izolowanych białek od obecności łańcuchów węglowodorowych w stosowanych adsorbentach. Siła wiązania białko-adsorbent zmieniała się w zależności od długości łańcucha węglowodorowego oraz od tego, czy łańcuch ten zakończony był grupą hydrofilową (45). Obecność grupy hydrofilowej w ligandzie uzależniała siłę wiązania od pH.

Analiza opisanych doświadczeń prowadzi do wniosku, że jakkolwiek

oddziaływania hydrofobowe odgrywały w nich rolę kluczową, to w żadnym przypadku nie występowały one w formie „czystej”. Przy syntezie adsorbentów aktywowano Sepharose cyjanobromkiem, czego wynikiem jest obecność ładunku dodatniego w miejscu związania hydrofobowego ligandu z nośnikiem (patrz Rozdz. I-4). Oczyszczona agarozą zaś może posiadać ładunek ujemny (65). Stosowany przez Y o n a (61) ligand hydrofobowy był także zakończony grupą polarną. Niewątpliwie więc w obydwu przypadkach rozdział chromatograficzny był wynikiem zarówno oddziaływań hydrofobowych jak i hydrofilowych, przy czym te pierwsze warunkowały swoistość. W dalszym rozwoju omawianej techniki zarysowały się dwa różne podejścia, z których jedno cechowało dążenie do wyeliminowania oddziaływań elektrostatycznych, podczas gdy drugi — dążenie do jak najlepszego wykorzystania tych oddziaływań, obok hydrofobowych, przy rozdziale białek.

„Najczystsza” formą chromatografii hydrofobowej byłaby ta, w której wyeliminowano by oddziaływania polarne. Ze względu na powszechne stosowanie Sepharose jako nośnika w chromatografii hydrofobowej, otrzymanie adsorbenta hydrofobowego pozbawionego ładunku wymagało opracowania odpowiedniej metody sprzęgania ligandów hydrofobowych z nośnikiem. P o r a t h i współautorzy (66) oraz H j e r t é n i współautorzy (67) opisali różne sposoby syntezy niepolarnych adsorbentów z nośnikiem agarozowym (Sepharose). Adsorbenty te w warunkach wysokiej siły jonowej wiążą różne białka, przy czym charakteryzuje je olbrzymia pojemność (66). Adsorpcja białek zależy od stężenia ligandu hydrofobowego na nośniku (68). Wymywając buforem o malejącym gradiencie siły jonowej, obniżając polarność eluentu, podwyższając pH (66, 67) lub temperaturę (67) zaadsorbowane białka można frakcjonować. Bardzo charakterystyczna jest stymulacja powstawania oddziaływań hydrofobowych w warunkach wysokiej siły jonowej. Zjawisko to, polegające na wiązaniu przez cząsteczki soli cząsteczek wody — utrudniających powstawanie wiązań hydrofobowych (69, 70) — w istocie swej zbliżone jest prawdopodobnie do wysalania białek. Podobnie jak przy wysalaniu nie jest tu obojętny rodzaj stosowanej soli (68).

Obecność ładunku na adsorbencie hydrofobowym komplikuje mechanizm chromatografii zwiększając jednocześnie jej rozdzielczość (61, 71). Adsorbent hydrofobowy może zawierać ugrupowanie polarne tylko w miejscu sprzęgnięcia ligandu z Sepharose (po aktywacji CNBr) lub także na wolnym końcu ligandu. Przykładem adsorbentów pierwszego typu jest homologiczna seria Sepharose—NH⁺(CH₂)_nH. Uwagę zwraca fakt, że adsorbenty te budową przypominają detergenty. Stwierdzono, że wiążą one białka na zasadzie kooperacji oddziaływań hydrofobowych i elektrostatycznych (72, patrz też Ryc. 2), przy czym udział oddziaływań hydrofobowych rośnie ze wzrostem długości łańcucha hydrofobowego (73) oraz ze wzrostem stężenia ligandów hydrofobowych na nośniku (74). Przypuszcza

się (75), że hydrofobowy ligand penetruje powierzchnię białka, powodując częściowe rozfałdowanie łańcucha polipeptydowego i odsłaniając grupy o charakterze anionowym tworzące silne wiązania jonowe z dodatnio naładowanymi ugrupowaniami adsorbenta. W przypadku zbyt długiego ligandu, w wyniku detergentowego działania adsorbenta dojść może do nieodwracalnego zdeformowania cząsteczek białka (37, 70, 73). Doboru odpowiedniego adsorbenta dokonać można stosując zestaw próbnych kolumn, posiadających ligandy o różnej długości (76).

Tabela 1.

Białka izolowane techniką chromatografii powinowactwa hydrofobowego

Izolowane białko	Piśmiennictwo
Adenyliotransferaza ATP-syntetaza glutaminowa	(81)
Aminotransferaza histydynylofosforanowa	(82)
Białko J wiążące histydynę	(83)
Dehydrataza treoninowa	(79)
Dehydrogenaza glutaminianowa	(84)
Dhydrogenaza I kinaza asparaginianowa l-homoseryna	(69)
Dehydrogenaza maleinianowa	(84)
Enzym deurydylujący białko P ₁₁	(81)
Fosfataza fosforylazowa	(74)
Fosforylaza glikogenowa a	(85)
Fosforylaza glikogenowa b	(45, 74)
Fosforylaza maltodekstrynowa	(86)
β -galaktozydaza	(69, 79)
Galaktozylotransferaza UDPgalaktoza-glukoza	(87)
Inhibitor trypsyny	(66)
Karbamoilotransferaza asparaginianowa	(61, 80)
Kinaza białkowa zależna od 3', 5'-cAMP	(74)
Kinaza fosforylazowa	(74)
Klostrypaina	(88)
Kolagenaza	(88)
Syntetaza glikogenowa	(74, 83)
Syntetaza glutaminowa	(81)
Syntetaza tymidylanowa	(13, 15)
Syntetazy aminoacylo-tRNA	(46)
Tryptofanaza	(69)
Urydyliotransferaza UTP—białko P	(81)

Obecność grupy polarnej na wolnym końcu ligandu (na przykład Sepharose, NH—(CH₂)_nNH₂) pozwala na dodatkową kontrolę adsorpcji hydrofobowej. Zależnie od ładunku tej grupy, pH środowiska i punktu izoelektrycznego wiążanego białka, oddziaływanie hydrofobowe może ulegać wzmocnieniu przez siły elektrostatycznego przyciągania (75, 77, 78) lub osłabieniu przez siły elektrostatycznego odpychania (61, 79, 80).

Adsorpcja białek na adsorbentach hydrofobowych zawierających grupy polarne może pod działaniem soli w wysokim stężeniu ulegać stymu-

lacji (69, 70, 79), podobnie jak na adsorbentach pozbawionych ładunku. Jako skutek oddziaływań elektrostatycznych może występować jednak sytuacja odwrotna, jeżeli określone białka wiążą się z adsorbentem w niskiej a uwalniają w wysokiej sile jonowej (71, 74—76). Wynikiem oddziaływań polarnych może być także silne desorbujące działanie zmian pH eluentu (61, 71). Oczywiście niezależnie od obecności ładunku desorbującego działa również zwiększenie hydrofobowości eluentu (61, 71, 76), jak i obecność detergentów (61, 71).

Tabela 1 zawiera przykłady białek oczyszczonych omawianą techniką.

III. Chromatografia na unieruchomionych jonach metali ciężkich

Porath i wsp. (89) zaproponowali ostatnio wykorzystanie przy rozdziale białek faktu tworzenia przez hystydynę i cysteinę kompleksów z jonami metali ciężkich. Kompleksy te, zwłaszcza w przypadku jonów miedziowych i cynkowych, są stosunkowo trwałe. Wspomniani autorzy unieruchomili jony Cu^{2+} i Zn^{2+} , stosując w tym celu Sepharose związaną z ligandem o własnościach chelatujących i na tak przygotowanych adsorbentach prowadzili chromatografię białek surowicy krwi, stosując przy elucji zmiany pH, siły jonowej oraz dodatek EDTA do eluentu. Uzyskane wyniki wskazują na przydatność proponowanej techniki przy rozdziale białek.

Artykuł nadszedł 20.8.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 27.9.1976.

PISMIENICTWO

1. Starkenstein E., (1910), *Biochem. Z.*, **24**, 210—215.
2. Holmbergh O., (1933), *Biochem. Z.*, **258**, 134—138.
3. Lerman L. S., (1953), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **39**, 232—236.
4. Arsenis C., McCormick D. B., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3093—3097.
5. Arsenis C., McCormick D. B., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 330—334.
6. Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 636—643.
7. Axén R., Porath J., (1966), *Nature* **210**, 367—369.
8. Cuatrecasas P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059—3065.
9. Wilchek M., Jakoby W. B., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 3—10.
10. O'Carra P., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1289—1294.
11. O'Carra P., Barry S., Griffin T., (1974), *Methods in Enzymology*, **34**, 108—126.
12. Slavík K., Žižkowský V., Slavíková V., Fort P., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1173—1184.
13. Slavík K., Rode W., Slavíková V., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4222—4227.
14. Pohl J., (1975), Dissertation Thesis, Charles University, Prague, Czechoslovakia.

15. Rode W., Zielińska Z. M., Slavik K., Slaviková V., (1976), *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 925—927.
16. Weetall H. H., (1973), *Separ. Purif. Methods*, **2**, 199—229.
17. Mosbach K., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1294—1296.
18. Levin Y., Pecht M., Goldstein L., Katchalski E., (1964), *Biochemistry*, **3**, 1905—1913.
19. Manecke G., (1964), *Naturwissenschaften*, **51**, 25—34.
20. Manecke G., Günzel G., (1967), *Naturwissenschaften*, **54**, 531—533.
21. Turková J., Hubálková O., Křiváková M., Čoupek J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 1—9.
22. Inman J. K., Dintzis H. M., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4074—4082.
23. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 259—278.
24. Cuatrecasas P., Anfinsen C. B., (1971), *Methods in Enzymology* **22**, 345—378.
25. Cuatrecasas P., (1972), *Adv. in Enzymol.*, **36**, 29—89.
26. Guilford H., (1973), *Chem. Soc. Rev.*, **2**, 249—270.
27. Parikh I., March S., Cuatrecasas P., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 77—102.
28. Porath J., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 13—30.
29. Turková J., (1974), *J. Chromatogr.*, **91**, 267—291.
30. Weetall H. H., Filbert A. M., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 59—72.
31. Slavik K., (1975), *Chem. Listy*, **69**, 339—378.
32. Berman J. D., Young M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 395—398.
33. Miller J. V., Jr., Cuatrecasas P., Thompson E. B., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1014—1018.
34. Steers E., Cuatrecasas P., Pollard H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 196—200.
35. Wilchek M., (1973), *FEBS Letters*, **33**, 70—72.
36. March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P., (1974), w *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, red. Dunlap R. B., str. 3—14. Plenum Press, New York and London.
37. Wilchek M., (1974), w *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, red. Dunlap R. B. str. 15—31. Plenum Press, New York and London.
- 37a. Nishikava A. H., Bailon P., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **168**, 576—584.
38. Wilchek M., Miron T., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 72—76.
39. Sica V., Nola E., Parikh I., Puca G. A., Cuatrecasas P., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 36—39.
40. Axén R., Ernback S., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 351—360.
41. Svensson B., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 167—169.
42. Barry S., Griffin T., O'Carra P., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1319—1322.
43. Cohen L. A., (1974), *Methods in Enzymology*, **343**, 102—108.
44. Inman J. K., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 30—58.
- 44a. Sundberg L., Porath J., (1974), *J. Chromatogr.*, **90**, 87—98.
45. Er-el Z., Zaidenzaig Y., Shaltiel S., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 383—390.
46. Jakubowski H., Pawełekiewicz J., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 150—154.
47. Bartkowiak S., Pawełekiewicz J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **272**, 137—140.
48. O'Carra P., Barry S., Griffin T., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 289—290.
49. Barry S., O'Carra P., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 595—607.
50. O'Carra P., Barry S., Griffin T., (1974), *FEBS Letters*, **43**, 169—175.

51. O'Carra B., Barry S., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 281—285.
52. O'Carra P., Barry S., Corcoran E., (1974), *FEBS Letters*, **43**, 163—168.
53. Cuatrecasas P., Wilchek M., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 235—239.
54. Anfinsen C. B., (1969), w Molecular Organization and Biological Function, red. Allen J. M. Harper and Row, New York, str. 1.
55. Hofstee B. H. J., (1967), *Nature*, **213**, 42—44.
56. Dixon M., Webb C., (1964), *Enzymes*, II wyd., Academic Press, New York, str. 255.
57. Baker B. R., (1967), *Design of Active-Site-Directed Irreversible Inhibitors*, John Wiley and Sons, New York.
58. Karush F., (1962), *Adv. Immunol.*, **2**, 1—40.
59. Singer S. J., (1965), w *The Proteins*, II wyd., 3, red. Neurath H., str. 269—357. Academic Press, New York.
60. McClure W. O., Edelman G. M., (1966), *Biochemistry*, **5**, 1908—1919.
61. Yon R. J., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 765—767.
62. Gillam I., Millward S., Blew D., von Tigerstrom M., Wimmer E., Tener G. M., (1967), *Biochemistry*, **6**, 3043—3056.
63. Osterman L. A., (1971), *Anal. Biochem.*, **43**, 254—258.
64. Weiss H., Bücher T., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **17**, 561—567.
65. Porath J., Janson J. -C., Laas T., (1971), *J. Chromatogr.*, **60**, 167—177.
66. Porath J., Szondberg L., Fornstadt N., Olsson I., (1973), *Nature*, **245**, 465—466.
67. Hjertén S., Rosengren J., Pahlman S., (1974), *J. Chromatogr.*, **101**, 281—288.
68. Nishikawa A. H., Bailon P., (1975), *Anal. Biochem.*, **68**, 274—280.
69. Raibaud O., Högberg-Raibaud A., Goldberg M. E., (1975), *FEBS Letters*, **50**, 130—134.
70. Yon R. J., Simmonds R. J., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 281—290.
71. Hjertén S., (1973), *J. Chromatogr.*, **87**, 325—331.
72. Hofstee B. H. J., (1973), *Anal. Biochem.*, **52**, 430—448.
73. Hofstee B. H. J., (1974), w *Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography*, red. Dunlap R. B. str. 43—58. Plenum Press, New York and London.
74. Jennissen H. P., Heilmeyer, Jr., M. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 754—760.
75. Jost R., Miron T., Wilchek M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 75—82.
76. Shaltiel S., (1974), *Methods in Enzymology*, **34 B**, 126—140.
77. Hofstee B. H. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 751—757.
78. Shaltiel S., Er-el Z., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 778—781.
79. Rimerman R. A., Hatfield G. W., (1973), *Science*, **182**, 1268—1270.
80. Yon R. J., (1974), *Biochem. J.*, **137**, 127—130.
81. Shaltiel S., Adler S. P., Purich D., Caban C., Senior P., Stadtman E. R., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 3397—3402.
82. Henderson G. B., Shaltiel S., Snell E. E., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4335—4338.
83. Shaltiel S., Ames G. F., Noel K. D., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 174—179.
84. Mevarech M., Leicht W., Werber M. M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2383—2387.
85. Er-el Z., Shaltiel S., (1974), *FEBS Letters*, **40**, 142—145.
86. Palm D., Shaltiel S., (1975), *FEBS Letters*, **55**, 178—182.

87. Geren C. R., Magee S. C., Ebner K. E., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 149—155.
88. Kula M. R., Hatef-Haghi D., Tauber-Finkelstein M., Shaltiel S., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 389—396.
89. Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G., (1975), *Nature*, **258**, 598—599.

KOMUNIKAT

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznał doroczne nagrody za najlepsze publikacje z zakresu biochemii ogłoszone w 1975 r.

Nagrodę im. Karola Jakuba Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną przyznano zespołowi: Dawid Shugar, Mirosława Piechowska i Anna Sołtyk za dwa artykuły pt. „Fate of heterologous deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis*” i „Heterologous deoxyribonucleic acid uptake and complexing with cellular constituents” ogłoszone w *Journal of Bacteriology* (1975) tom 122 str. 610—622 i tom 124 str. 1429—1438.

Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy opublikowany w kwartalniku *Postępy Biochemii* otrzymał Witold Jachymczyk za pracę pt. „Rola kompleksów mRNA z białkiem w regulacji procesu translacji”, *Postępy Biochemii* (1975) tom 21, str. 119—147.

SPRAWOZDANIA

XVI posiedzenie Rady FEBS

(Hamburg, 25 i 31 lipca 1976 r.)

Najwyższą władzą Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych jest jej Rada (FEBS Council), w skład której wchodzi przedstawiciele wszystkich zrzeszonych Towarzystw. Rada zbiera się normalnie raz w roku, z reguły w czasie trwania dorocznych zjazdów FEBS. Ponieważ w 1976 r. nie odbył się zjazd FEBS, Rada zebrała się na swe doroczne posiedzenie przy okazji X Międzynarodowego Kongresu Biochemicznego w Hamburgu. Posiedzenie rozpoczęło się 25 lipca rano (przed otwarciem Kongresu) i dokończyło swych obrad po zamknięciu Kongresu, 31 lipca po południu. W posiedzeniu wzięli udział delegaci 21 towarzystw biochemicznych (nie przysłały swych reprezentantów towarzystwa biochemiczne Islandii, Irlandii, Portugalii, Rumunii i Węgier), członkowie Komitetu Wykonawczego FEBS (Executive Committee) oraz w charakterze obserwatorów G. Semenza (organizator I Sympozjum FEBS), C. Liébecq (redaktor *Eur. J. Biochem.*) i W. J. Whelan (sekretarz generalny IUB). Polskie Towarzystwo Biochemiczne reprezentował na posiedzeniu Rady jego prezes, Lech Wojtczak.

W pierwszym punkcie porządku dziennego Rada przyjęła, z drobnymi poprawkami, protokół z poprzedniego zebrania, które odbyło się w lipcu 1975 r. w Paryżu (tekst protokołu został wcześniej rozesłany do zrzeszonych Towarzystw). W związku z powtarzającą się od szeregu lat nieobecnością przedstawicieli Portugalii i Rumunii Rada postanowiła zwrócić się do towarzystw biochemicznych tych krajów z apelem o żywszy udział w pracach Federacji. Rada przyjęła następnie do wiadomości decyzję dwóch towarzystw biochemicznych Grecji w sprawie wspólnego przedstawicielstwa obu towarzystw w Federacji. Decyzja ta zakończyła trwającą od kilku lat niejasną sytuację greckich biochemików w FEBS. Prof. van Deenen, Sekretarz Generalny FEBS, poinformował następnie o wstępnych rozmowach z biochemikami tureckimi w sprawie ich akcesu do Federacji.

Prof. J. P. Ebel złożył ostateczne sprawozdanie z X Zjazdu FEBS w Paryżu w 1975 r. W Zjeździe wzięło udział 2700 uczestników; 35% uczestników miało poniżej 30 lat.

Rada zatwierdziła propozycje zjazdów Federacji aż do 1981 roku. Przedstawiają się one następująco:

1977 r. — XI Zjazd w Danii (Kopenhaga) w dniach 14—19 sierpnia,

1978 r. — XII Zjazd w NRD (Drezno) w dniach 2—8 lipca,

1979 r. — Specjalny Zjazd w Jugosławii (kwiecień) poświęcony zagadnieniom praktycznych zastosowań biochemii (w 1979 roku odbywać się będzie XI Międzynarodowy Kongres Biochemiczny w Toronto i dlatego zrezygnowano z organizacji zwyczajnego zjazdu FEBS),

1980 r. — XIII Zjazd w Izraelu w dniach 24—29 sierpnia,

1981 r. — XIV Zjazd w Wielkiej Brytanii.

W latach 1982—1984 zjazdy FEBS odbędą się prawdopodobnie w Belgii, Grecji i ZSRR.

Przedstawiciele Duńskiego Towarzystwa Biochemicznego podali, że wpisowe na przyszły Zjazd wynosić będzie: normalne—600 koron duńskich, ulgowe (dla studentów i młodych biochemików)—300 koron i dla osób towarzyszących (bez prawa udziału w części naukowej)—50 koron. Organizatorzy planowali zamieścić w materiałach zjazdowych jedynie streszczenia referatów sympozjalnych, natomiast w przypadku doniesień plakatowych ograniczyć się wyłącznie do podania ich tytułów. Wywołało to żywy sprzeciw ogromnej większości Rady, która przegłosowała apel do organizatorów o wydanie również streszczeń doniesień plakatowych.

Na dwa dni przed posiedzeniem Rady zakończyło się w Zurichu I Sympozjum FEBS na temat biochemii transportu przez błony biologiczne. Prof. Semenza złożył sprawozdanie z przebiegu tego sympozjum. Przyjęto również zgłoszenia sympozjów na 1977 r., m.in. w Pradze na temat antymetabolitów i w Atenach na temat bioenergetyki. Sekretarz Generalny FEBS podał następnie do wiadomości kalendarzyk odczytów im. Ferdynanda Springera, wygłaszanych przez wybitnych biochemików odwiedzających kraje należące do FEBS. M.in. Polskę odwiedzi w listopadzie 1976 r. dr J. P. Changeux z Instytutu Pasteura w Paryżu.

Prof. van Deenen poinformował także, że Komitet Wykonawczy przyznał w 1976 r. Dyplom Honorowy FEBS profesorowi Feodorowi Lynenowi. Dyplom ten, stanowiący rodzaj honorowego członkostwa FEBS, przyznawany jest za wybitne zasługi dla Federacji. Rada postanowiła, aby w przyszłości towarzystwa biochemiczne zrzeszone w FEBS zgłaszały kandydatury do Dyplomu, który będzie — jak dotychczas — przyznawany przez Komitet Wykonawczy. Poinformowano również, że Komitet Wykonawczy postanowił przyznać doroczne Nagrody Jubileuszowe (FEBS Anniversary Prizes) za wyróżniające się referaty sympozjalne wygłoszone na ubiegłorocznym Zjeździe E. M. Bradbury'emu (Portsmouth, Wielka Brytania) i G. Gerischowi (Bazylea, Szwajcaria).

Prof. Max Gruber w imieniu Komisji Kursów FEBS złożył sprawozdanie z działalności w zakresie organizacji kursów. Od ostatniego zebrania Rady w lipcu 1975 r. odbyło się 6 kursów. Na podstawie nadesłanych do Komisji opinii uczestników prof. Gruber pozytywnie ocenił m.in. kurs pod nazwą „Bioenergetyka Mitochondriów” zorganizowany w Warszawie w czerwcu 1976 r. Rada zaaprobowала również projekty kursów na 1977 r. (wykaz kursów na najbliższą przyszłość ukaże się w je-siennym wydaniu Biuletynu FEBS).

Rada zaaprobowала sprawozdanie finansowe Federacji rozesłane wcześniej do wszystkich Towarzystw członkowskich. Dochody Federacji z tytułu składek wpła-canych przez towarzystwa biochemiczne wynoszą około 2000 funtów brytyjskich rocznie. Składka ta obliczana jest w wysokości 0,10 funta od każdego członka To-warzystwa. Jest ona przeznaczana głównie na opłacenie druku i wysyłki Biuletynu FEBS otrzymywanego dwa razy do roku przez wszystkich biochemików zrzeszonych w Towarzystwach członkowskich FEBS oraz na wydatki sekretariatu Federacji. Znacznie większe są wpływy z dwóch czasopism FEBS-u. *European Journal of Biochemistry* odprowadził do kasy Federacji za 1975 r. ponad 14.000 £, a *FEBS Letters* ponad 20.000 £. Sumy te są przeznaczone przede wszystkim na dofinansowywanie kursów FEBS, stypendia dla młodych biochemików uczestniczących w tych kursach oraz dotacje dla organizatorów sympozjów. Na cele kursów (FEBS Advanced Courses) wydano w 1975 r. 7.000 £, a w pierwszym półroczu 1976 r. — 11.000 £. Na stypendia dla młodych biochemików (Youth Travel Fund) przeznaczono 7.000 £ w 1975 r. i tyleż samo w pierwszym półroczu 1976 r. I Sympozjum FEBS w Zurichu w 1976 r. kosztowało Federację około 2.000 £. Ze stypendiów w 1975 r. skorzystało 69 młodych biochemików (w tym 4 z Polski), a w pierwszym półroczu 1976 r. —

50 osób (jedna z Polski). Warto podkreślić, że doroczne zjazdy FEBS są w zasadzie imprezami samowystarczalnymi finansowo i nie obciążają budżetu Federacji.

Prof. S. M. Rapoport, przewodniczący Komitetu Wydawniczego, przedstawił sprawozdanie z działalności obu wydawnictw Federacji. W 1975 r. w *European Journal of Biochemistry* przyjęto do druku 757 prac, co stanowiło 62% nadesłanych maszynopisów. Średni czas od otrzymania ostatecznej wersji do ukazania się pracy w druku wynosił 125 dni. Najwięcej wydrukowanych prac pochodziło z RFN (24%), Francji (14%) i Wielkiej Brytanii (12,5%). Prace z Polski stanowiły 1,1%, czyli nieco mniej niż z Danii (1,2%), Finlandii (1,3%) i ZSRR (1,2%). FEBS Letters zamieściły w 1975 r. 926 prac, co stanowiło 56% nadesłanych maszynopisów. Prac z Polski było 1,55%.

W związku z upływającą w przyszłym roku kadencją trzech członków Komitetu Wykonawczego Rada dokonała wyboru ich następców. Na stanowisko Skarbnika wybrany został jednomyślnie ponownie prof. S. D. Datta (Londyn). Na stanowisko Sekretarza Generalnego (na miejsce prof. van Deenena urzędującego obecnie) szereg towarzystw (m.in. Polskie Towarzystwo Biochemiczne) zgłosiło kandydaturę prof. J. P. Ebela z Francji, obecnego Przewodniczącego Federacji. Ponieważ jednak prof. Ebel funkcji tej nie przyjął z powodu nadmiernego obciążenia innymi obowiązkami organizacyjnymi, Rada wybrała w wyniku dwukrotnego głosowania prof. Yomtova z Bułgarii. Przewodniczącym Komisji Kursów (Advanced Courses Committee) wybrany został członek tej Komisji, G. Bernardi z Paryża. Do Komisji postanowiono również dokooptować prof. Kazimierza Zakrzewskiego z Polski.

Następne, siedemnaste posiedzenie Rady FEBS wyznaczono na 17 sierpnia 1977 r. w Kopenhadze.

L. Wojtczak

III Wszechzwiązkowe Sympozjum „Struktura i funkcja aktywnych centrów enzymów”

Puszczino nad Oką (ZSRR), 9—12 sierpnia, 1976 r.

W dniach 9—12 sierpnia 1976 r. w Centrum Biologicznym w Puszczino odbyło się III-cie Wszechzwiązkowe Sympozjum na temat budowy i funkcji aktywnych miejsc enzymów. Organizatorem naukowym Sympozjum był prof. A. E. Braunstein z Instytutu Biologii Molekularnej w Moskwie. W sympozjum wzięło udział około 100 pracowników naukowych z ZSRR oraz dziewięciu zaproszonych gości z kilku krajów europejskich. W czasie Sympozjum wygłoszono 15 referatów oraz przedstawiono 60 prac w formie plakatowej.

Zasadniczym tematem obrad była struktura i mechanizm działania niektórych oksydoreduktaz, hydrolaz i liaz. Ponadto referowano prace dotyczące wyznaczania czasu przemian w aktywnym centrum enzymów, energii aktywacji, tworzenia kompleksów enzymatycznych oraz dyskutowano udział poszczególnych technik w badaniach enzymologicznych.

Zmiany elektronowe i konformacyjne w centrum aktywnym dehydrogenaz modelowo zobrazował C.—I. Brändén (Szwecja). W przypadku tych enzymów postulowano, że zmiany konformacyjne są wynikiem wiązania apoenzymu z koenzymem, i że są to zmiany lokalne zachodzące w obszarze 3—4Å. Wiązania wodorowe dehydrogenaz stanowią system przenoszący elektrony (*charge relay system*) z hydrofobowej części na powierzchnię enzymu.

W referatach dotyczących hydrolaz wykazano, że w aktywnym centrum pepsyny

reszty kwasu asparaginowego związane są wiązaniami wodorowymi. Podstawienie grup aminowych substratu grupami karboksylowymi powodowało zmianę substratu w inhibitor tego enzymu (N. S. Andreeva i V. K. Antonov, ZSRR). Przy zastosowaniu chemicznych modyfikacji zlokalizowano ugrupowania chromoforowe w asparaginazie z *Escherichia coli* i wykazano udział tyrozyny (o pK 8) w aktywnym centrum enzymu (R. A. Zhagats, ZSRR).

Tematyką Sympozjum objęto również enzymy uczestniczące w biosyntezie białka. Scharakteryzowano właściwości fizykochemiczne kinazy histonowej, wyizolowano fragment aktywnego miejsca enzymu oraz określono powierzchnię miejsca katalitycznego i regulatorowego. W omawianiu mechanizmu działania kinazy histonowej E. S. Severin (ZSRR) zasugerował model budowy histonu. A. R. Fersht (W. Brytania) wyjaśnił mechanizm enzymatycznej hyperspecyficzności w procesie aminoacylacji tRNA, natomiast B. P. Gottkh i A. A. Kravetsky (ZSRR) zaproponowali schemat wiązania peptydylotransferazy w rybosomach.

Niezależnie od charakterystyki poszczególnych enzymów, podczas Sympozjum analizowano kinetyczne (L. Dolapchiev, Bułgaria) i energetyczne (D. S. Chernavskii, ZSRR) aspekty katalizy enzymatycznej. Wiązanie substratu w aktywnym centrum enzymów ma zasadnicze znaczenie w wytwarzaniu energii niezbędnej do obniżenia bariery aktywacji. Badania relaksacji pozwoliły na oznaczenie czasu trwania przejściowych kompleksów enzym—substrat, oraz umożliwiły określenie czasu przemian elektronowych i konformacyjnych (P. Fasella, Włochy). T. Keleti (Węgry) przedstawił możliwości tworzenia wysokocząsteczkowych kompleksów białko—białko odgrywających rolę w regulacji aktywności niektórych enzymów.

Dużo uwagi w obradach poświęcono kompleksowemu zastosowaniu wielu metod i nowoczesnych technik fizykochemicznych takich jak: widma różnicowe, fluorescencja, fosforescencja, dichroizm kołowy, rentgenografia, chemiczne relaksacje oraz elektronowy rezonans paramagnetyczny i jądrowy rezonans magnetyczny. Ponadto dyskutowano znaczenie metod chemicznych modyfikacji i unieruchamiania enzymów w badaniu mechanizmu katalizy enzymatycznej (G. Muszyńska, Polska).

W końcowym etapie Sympozjum odbyła się dyskusja dotycząca różnic i podobieństw w strukturze aktywnych centrów enzymów w roztworze i w stanie krystalicznym. Bezpośrednim powodem tej dyskusji były badania prowadzone w pracowni B. L. Vallee (USA) wykazujące występowanie, warunkującego aktywność, kompleksu Zn—tyrozyna w aktywnym centrum karboksypeptydazy A. W stanie krystalicznym enzymu cynk nie tworzy kompleksu z tyrozyną. Wyniki tych prac zmuszają do zastanowienia się do jakiego stopnia badania krystalograficzne odzwierciedlają strukturę centrum aktywnego enzymu w roztworze.

Obrady odbywały się w przyjemnej atmosferze przy pełnej frekwencji uczestników.

G. Muszyńska

Kolokwium nt. „Biosynteza koenzymów folianowych”

2—3 września 1976, Dublin, Irlandia

Przy okazji 564 Zjazdu Biochemical Society w Dublinie Dr John M. Scott zorganizował kolokwium zatytułowane „Biosynteza koenzymów folianowych”, w ramy którego włączono również liczne kwestie metodyczne.

Inauguracyjny wykład dr J. M. Scotta (Trinity College, Dublin, Irlandia) dotyczył identyfikacji wewnątrzkomórkowych koenzymów folianowych niektórych bak-

terii i drożdży. Referent zwrócił główną uwagę na poliglutaminianowe pochodne, którym przypisuje się dziś szczególnie ważną rolę metaboliczną jako właściwym substratom lub inhibitorom, czynnym w interkonwersji fragmentów jednowęglowych związanych z tetrahydrofolianem. Problem metabolicznej roli poliglutaminianowych pochodnych tetrahydrofolianu podjął również w swym referacie J. R. Bertino (Yale University School of Medicine, New Haven, Conn., USA). J. C. Rabinowitz (University of California, Berkeley, California, USA) omówił między innymi dane wskazujące, że w wątrobie ssaków występuje białko, które — oczyszczone do homogenności — wykazuje właściwości dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej, cyklohydrolazy metenylotetrahydrofolianowej i syntetazy formylotetrahydrofolianowej. W materiale bakteryjnym są to trzy odrębne białka enzymatyczne.

Dr K. R. Harrap (Institute of Cancer Research, Belmont, Surrey, Anglia) omówił zjawisko naturalnej odporności niektórych komórek nowotworowych na działanie Methotrexatu (ametopteryny), stosowanego w chemioterapii niektórych schorzeń nowotworowych. Badanie kinetyki reakcji katalizowanej przez wysoko oczyszczone preparaty reduktazy dihydrofolianowej z komórek czterech linii wykazało, że enzym ten z komórek odpornych na obecność metotreksatu w środowisku cechuje wielokrotnie wyższą stałą inhibitorową od stałej enzymu z komórek nie odpornych na działanie tego antyfolianu. Dr Harrap przedyskutował też problem osłony komórek prawidłowych przed toksycznym działaniem metotreksatu w drodze podawania koenzymatycznych form tetrahydrofolianu.

W ramach kolokwium wygłoszono ponadto kilkanaście doniesień. Dwa z nich pochodziły z Zakładu Biochemii Komórki Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN — pierwszy n.t. regulacji syntetazy metioninowej w komórkach L przez witaminę B₁₂, folian i metioninę przedstawiła B. Grzelakowska-Sztabert, drugi n. t. oczyszczania syntetazy tymidylanowej przy pomocy chromatografii powinowactwa na kolumnie z Sepharose sprzężonej poprzez aminoetylowy odstępnik z tetrahydroametopteryną przedstawiła niżej podpisana.

Ogółem uczestniczyło w posiedzeniach 60—70 osób a żywa dyskusja świadczyła o dużym zainteresowaniu tematem kolokwium.

Z. Zielińska

RECENZJE

„Immunologische Arbeitsmethoden”

red. Helmut Friemal, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1976, wyd. I, 496 stron,
116 ilustracji.

Książka ta jest zbiorowym, przez 38 autorów, opracowaniem podstawowych metod stosowanych w immunologii. Zawiera 59 rozdziałów, w których opisano dokładnie techniki przeprowadzania testów serologicznych, oznaczania reakcji antygenów z przeciwciałami, rozdzielania i preparacji antygenów, immunoglobulin i przeciwciał, itp. Każdy z rozdziałów zaopatrzony jest w krótki, jasno napisany wstęp teoretyczny, jak również odnośniki literaturowe. Bardzo dobrze przedstawione są również różne metody elektroforetyczne i chromatograficzne w odniesieniu do białek, cukrów i lipidów, jak również w odniesieniu do komórek.

Książka wydana jest bardzo starannie, na bardzo dobrym papierze. Materiał zawarty w książce czyni ją godną polecenia każdemu laboratorium klinicznemu, zajmującemu się immunologią kliniczną. Jest ona również warta polecenia dla studentów wyższych lat wydziału biologii (biochemia) oraz jako wygodny zbiór przepisów dla instytutów badawczych.

Jakkolwiek książka wydana została w 1976 r., napisana została w 1973 r. Tak długi okres wydawniczy sprawił, że w międzyczasie zostały opracowane nowe testy, ewentualnie usprawnienia dotychczasowych metod, które nie zostały zamieszczone w omawianej książce.

J. Lisowski

„Praktische Chemie für Mediziner und Naturwissenschaftler”

red. H. G. Henning, W. Jugelt, G. Sauer, VEB Verlag Volk und Gesundheit —
Berlin 1976, III wydanie przerobione.

Recenzowana książka opracowana jest przez zespół autorów z Uniwersytetu Humbolta w Berlinie. Kolejne poprzednie wydania książki pochodzą z roku 1966 i 1970. Obecne III wydanie jak podkreślają we wstępie sami autorzy jest dość znacznie przerobione, przy czym przeróbki dotyczą praktycznie wszystkich rozdziałów podręcznika.

Książka zgodnie z intencjami autorów jest przeznaczona dla medyków i przyrodników, którzy w programach nauczania chemii spotykają się z zagadnieniami wszystkich dziedzin szerokiego przedmiotu i potrzebują podręcznika ujmującego problemy najczęstsze i najistotniejsze w sposób zwięzły niemal encyklopedyczny ze szczególnym uwzględnieniem strony praktycznej. Dlatego książka ujmuje zwięźle, praktyczne zagadnienia praw i procesów chemicznych, problemy metodyczne, podstawy analityczne i informacje o związkach chemii nieorganicznej i organicznej szczególnie istotnych w nauczaniu biologii i medycyny.

Ze względu na założony praktyczny charakter książki, szczególny nacisk położyli autorzy na demonstracje i ćwiczenia, czego wyrazem jest umieszczenie w tekście 442 ćwiczeń. Książka zawiera 5 rozdziałów poświęconych:

- I — wprowadzeniu do praktyki laboratoryjnej
- II — podstawom chemii fizycznej i nieorganicznej
- III — ilościowym zagadnieniom reakcji chemicznych
- IV — podstawom chemii organicznej i fizjologicznej
- V — metodom analitycznym

Książkę zamyka dodatek z zestawem podstawowych tabel chemicznych, tabel logarytmicznych i tablicę z okresowym układem pierwiastków. Książka omawia i interpretuje prawa chemiczne, zawiera opisy sposobów obliczeń chemicznych, opisy budowy stechiometrycznej związków nieorganicznych i organicznych, podaje podstawowe reakcje charakterystyczne dla poszczególnych grup związków chemicznych oraz zestawia szeroko reakcje istotne w analizie ilościowej i jakościowej. Przejrzystość i ładnie graficznie ilustruje najważniejsze reakcje chemiczne, podstawy kinetyki reakcji, praktyczne rozwiązania schematów zestawów laboratoryjnych i prostej aparatury analitycznej. Ponadto w tekście umieszczone są, po zakończeniu omówienia poszczególnych działów, pytania kontrolne.

Patrząc jednak na recenzowaną książkę oczami polskiego odbiorcy, uznać należy zestaw zawarty w podręczniku informacji za mocno odbiegający od potrzeb w nauczaniu naszych studentów medycyny i biologii. Książka zawiera wiele wiadomości, z którymi nasz student spotyka się na szczeblu szkoły średniej. Informacje zatem o najbardziej podstawowym wyposażeniu laboratorium, zasadach pracy w laboratorium, podstawach obliczeń — są zbyteczne. Opis podstawowych metod analitycznych jest często zbyt zwięzły dla wprowadzenia studenta w praktyczne aspekty i trudności pracy laboratoryjnej. Traktując nawet encyklopedycznie informacje praktyczne książki, odczuwa się, że w opisie poszczególnych zagadnień należałoby kosztem omawiania elementarnych podstaw, rozwinąć szerzej niektóre problemy coraz istotniejsze dla zrozumienia problemów chemii analitycznej i podstaw biologii molekularnej, co w dzisiejszym ujęciu kształcenia medyka i biologa odgrywa podstawową rolę. Niewątpliwie wartościowym uzupełnieniem książki byłaby szersza bibliografia (książka podaje 13 pozycji) co szczególnie dla odbiorców rozdziału V podręcznika, miałyby istotne znaczenie.

Recenzowana książka może być bardzo wartościowym opracowaniem dla kształcenia pomaturalnego techników chemików i analityków. Zwięzłość i przejrzystość książki pozwala szybko odnaleźć interesujące praktyczne zagadnienie i stosunkowo łatwo przypominąć sobie lub utrwalić niezbędne posiadane wiadomości.

J. Gregorczyk

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1977

ARTICLES IN POLISH

Volume 23

Number 1

G. Adler—Thyrotropin-Releasing Hormone (Dept. Biochem., Med. Center of Postgraduate Education, Warszawa)	3
W. Filipowicz—Initiation of mRNA Translation in Eukaryotes (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	21
K. Gonta-Grabiec—The Role of Polyprenols in Sugar Moiety Transfer (Inst. Biochem., Univ. Warsaw, Warszawa)	61
W. Rode—Thymidylate Synthetase (Dept. Cell. Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	81
B. Szukalski—Cellular and Subcellular Distribution of Enzyme Involved in Steroid Biosynthesis (Dept. Biochem., Inst. Psychoneurology, Warszawa)	95
W. Rode—Purification of Enzymes and Other Biologically Active Proteins. by Means of Chromatography on Low Molecular Substances Immobilized on Solid Supports (Dept. Cel. Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	113
Communication	128
Meeting Reports	129
Book reviews	134

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

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

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

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

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

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony olówkiem) 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” (ółówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

SPIS TREŚCI

G. Adler — Tyrocyliberyna	3
W. Filipowicz — Inicjacja translacji mRNA u organizmów eukariotycznych	21
K. Gońca-Grabiec — Rola poliprenoli w przenoszeniu reszt cukrowych	61
W. Rode — Syntetaza tymidylanowa	81
B. Szukalski — Komórkowa i subkomórkowa topografia enzymów sterydogenyzy	95
W. Rode — Oczyszczenie enzymów i innych białek biologicznie czynnych poprzez chromatografię na substancjach niskocząsteczkowych unieruchomionych w fazie stałej	113
Komunikat — Polskiego Towarzystwa Biochemicznego o nagrodach	128
Sprawozdania:	
XVI Posiedzenie Rady FEBS (Hamburg 25 i 31 lipca 1976) (L. Wojteczak)	129
III Wszechzwiązkowe Sympozjum „Struktura i funkcja aktywnych centrów enzymów” (Puszczyno nad Oką, 9—12 sierpnia 1975) (G. Muszyńska)	131
Kolekwium nt. Biosyntezy koenzymów ścianowych (2—3 września 1976, Dublin) (S. Zielińska)	132
Recenzje	134