

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSTBAH 23 (2)
137-292 (1977)

1977

tom 23 nr 2



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 „Postęпах Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawdziwość 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 okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

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

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści z podaniem stron publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. 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 do-
różnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Jalunus

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1977 TOM 23 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Pstbah 23(2)
(138-292) (1977)

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Członkowie: M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice)

J. Gregorczyk (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellebogen (Wrocław)

A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań)

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman-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. Skankiel-Kramska (Warszawa),

I. Szumiel (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1977

Nakład 2250 (2136+114)

Oddano do składania 6.I.77

Ark. wyd. 11,75, ark. druk. 9,75

Podpisano do druku w maju 1977 r.

Pap. druk. sat. kl. III, 70 g, 70×100

Druk ukończono w maju 1977 r.

Zam. nr 28/77

F-9

Cena zł 20,—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

MIROŚŁAWA PIECHOWSKA*)

Jednołańcuchowe frakcje dwułańcuchowego DNA

Single-Stranded Fractions of Double Stranded DNA

Spis treści

Wstęp

- I. Fragmenty jednołańcuchowe DNA bakteriofagów i wirusów zwierzęcych
 - I-1. DNA dojrzałych bakteriofagów
 - I-2. DNA w stadium replikacji
 - I-2.1. Drugorzędowa struktura superhelikalnego DNA i innych form replikacyjnych chromosomów kołowych
- II. Fragmenty jednołańcuchowe DNA wyodrębnionego z bakterii
 - II-1. DNA w stadium replikacji
 - II-2. Fragmenty jednołańcuchowe o nieustalonym pochodzeniu
 - II-3. Jednołańcuchowy DNA występujący w procesie rekombinacji
- III. Fragmenty jednołańcuchowe DNA wyodrębnionego z komórek zwierzęcych
 - III-1. DNA w stadium replikacji
 - III-2. Handlowy DNA wyodrębniony z grasicy cielęcej
 - III-3. DNA wyodrębniony ze starych organizmów zwierzęcych
- IV. Wnioski i uwagi końcowe

Contents

Introduction

- I. Single-stranded fragments in DNA of bacteriophages and animal viruses
 - I-1. DNA of mature bacteriophages
 - I-2. Replicating DNA
 - I-2.1. Secondary structure of supercoiled DNA and other replicative forms of circular chromosome
- II. Single-stranded fragments of DNA isolated from bacterial cells
 - II-1. Replicating DNA
 - II-2. Single-stranded fragments of unknown origin
 - II-3. Single-stranded DNA in recombination process
- III. Single-stranded fragments in DNA isolated from animal cells
 - III-1. Replicating DNA.
 - III-2. Commercial calf-thymus DNA
 - III-3. DNA isolated from old animals
- IV. Concluding remarks

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

Jak ogólnie wiadomo przeważająca większość chromosomów zawiera DNA o strukturze podwójnołańcuchowej. Wiadomo również, że dwułańcuchowe chromosomy niektórych bakteriofagów zakończone są krótkimi fragmentami jednołańcuchowymi, a ponadto przebiegające w komórkach roślin i zwierząt replikacja, transkrypcja, rekombinacja i reperacja DNA wymagają rozwinięcia podwójnej spirali i udziału w tych procesach pojedynczych łańcuchów. Mimo znajomości tych faktów używając DNA wyodrębniony z komórek o aktywnym metabolizmie zwykle zakładamy, że struktura wszystkich cząsteczek jest w pełni dwułańcuchowa i całkowicie uporządkowana. Czy zawsze tak jest naprawdę? Niektóre spostrzeżenia opisane w ostatnim dziesięcioleciu budzą pewne wątpliwości. W kilku następujących po sobie publikacjach, które ukazały się w roku 1966 i 1968, K i d s o n (1), O k a z a k i i współautorzy (2), oraz O i s h i (3) opisali fakty wykazujące, że nowosyntetyzowana frakcja DNA, wyodrębnionego z *Escherichia coli* lub *Bacillus subtilis*, występuje w formie cząsteczek jednołańcuchowych. W latach późniejszych fragmenty jednołańcuchowe znaleziono nie tylko w DNA bakterii kilku rodzajów lecz również w replikującym się DNA bakteriofagów, wirusów zwierzęcych i komórek organizmów wyższych.

Poniżej opisano wykrywanie małych frakcji jednołańcuchowych w preparatach DNA o przeważającej strukturze dwułańcuchowej, podano charakterystykę tych frakcji jak również ich przypuszczalne pochodzenie. Omówiono jedynie strukturę DNA wyodrębnionego ze źródeł naturalnych, pominięto natomiast wszelkie zaburzenia struktury wywoływane celowo w badaniach *in vitro*.

I. Fragmenty jednołańcuchowe DNA bakteriofagów i wirusów zwierzęcych

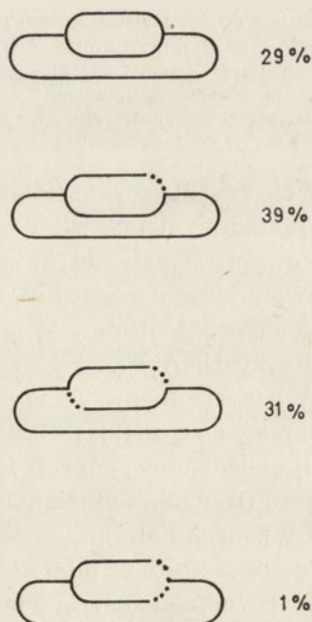
I-1. DNA dojrzałych bakteriofagów

Dwułańcuchowy DNA wyodrębniony z dojrzałych fagów ma z reguły doskonałą strukturę drugorzędową na całej długości chromosomu. Znanymi wyjątkami są tu chromosomy faga λ oraz innych fagów tej samej grupy, jak również fagów 186, P2 i 299 posiadające na obu końcach odcinki jednołańcuchowe, złożone z kilkunastu do dwudziestu nukleotydów. Odcinki te zwane „lepkimi końcami” są doskonale zbadane w chromosomie faga λ , a ich szczegółowy opis można znaleźć w wielu podręcznikach oraz innych obszernych publikacjach (np. 4,5). Główne cechy pojedynczych końców chromosomu faga λ są następujące: — ilościowa przewaga guaniny i cytozyny nad adeniną i tyminą, — zakończenie grupą fosforanową w pozycji 5', oraz — komplementarność sekwencji nukleotydowych dwu fragmentów jednołańcuchowych tego samego chromosomu. Ta ostatnia cecha odgrywa

ważną rolę po zakażeniu bakteryjnej komórki gospodarza ponieważ sparowanie pojedynczych końców fagowego DNA i wytworzenie wiązań fosfordwuestrowych pomiędzy końcowymi nukleotydami prowadzi do powstania charakterystycznej kołowej formy replikacyjnej. Forma kołowa jest doskonale sparowaną strukturą dwułańcuchową aż do czasu wytworzenia pętli replikacyjnej opisanej w następnym rozdziale.

I-2. DNA w stadium replikacji

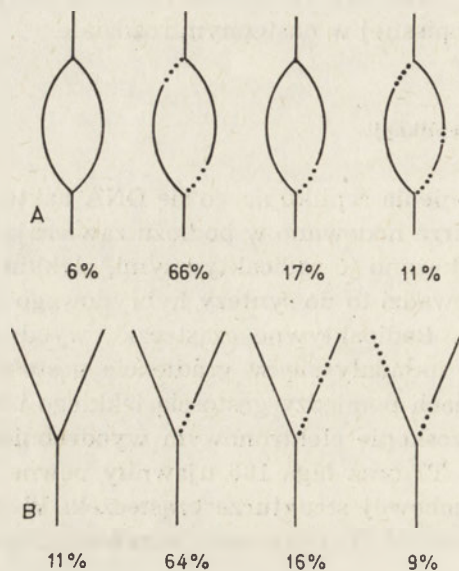
W celu wyodrębnienia replikującego się DNA bakteriofagów, bakteryjne komórki gospodarza hodowano w podłożu zawierającym ciężkie izotopy H^2 i N^{15} po czym zakażano je radioaktywnymi, „lekkimi” fagami zawierającymi H^1 i N^{14} . Prowadzi to do syntezy hybrydowego (lekki : ciężki) DNA w czasie replikacji. Radioaktywne cząsteczki, wyodrębniane w różnych stadiach replikacji, układały się w gradiencie gęstości chlorku cezu we wszystkich położeniach pomiędzy gęstością lekkiego i hybrydowego DNA. Obserwacje w mikroskopie elektronowym wyodrębnionego w ten sposób DNA fagów λ , T4 i T7 oraz faga 186 ujawniły pewne jednoniciowe fragmenty w dwułańcuchowej strukturze cząsteczek. W przypadku fagów λ Sch n ö s i I n m a n (6,7) wykrywali jednołańcuchowy DNA po jednej



Ryc. 1. Schemat obrazu chromosomów fagów λ otrzymanego przez Inmana i Sch n ö ssa w mikroskopie elektronowym (7).

Liczby wyrażane w procentach określają częstość występowania poszczególnych form wśród 82 fotografowanych cząsteczek. — — — DNA dwułańcuchowy, ●●● — DNA jednołańcuchowy.

lub obu stronach pętli replikacyjnych przy czym dwa takie odcinki najczęściej znajdowały się w pozycji *trans* przy przeciwległych widełkach pętli (Ryc. 1). Częsteczki replikującego się DNA fagów T7 były wykrywane przez Wolfsona i Dreslera (8) w formie pętli lub widełek o frag-



Ryc. 2. Schemat obrazu replikującego się DNA fagów T7 otrzymanego przez Wolfsona i Dreslera w mikroskopie elektronowym (8).

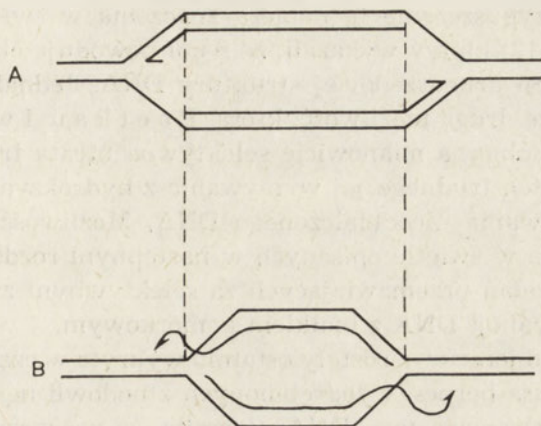
Liczby wyrażone w procentach określają częstość występowania poszczególnych form cząsteczek. A — rodzaje struktur występujące wśród 53 oglądanych pętli replikacyjnych. B — rodzaje struktur występujące wśród 45 widełek replikacyjnych. — — — DNA dwułańcuchowy, ●●● — DNA jednołańcuchowy.

mentach jednołańcuchowych znajdujących się najczęściej przy przeciwległych stronach pętli lub po jednej stronie widełek (Ryc. 2A i B). Wielkość fragmentów jednołańcuchowych sięgała do kilkunastu procent długości, choć większość reprezentowała kilka procent długości chromosomu. Zawierały więc one zatem około 500 nukleotydów w przypadku DNA λ , i około 1500 nukleotydów w przypadku DNA T7.

Jednołańcuchowy DNA bakteriofagów T4 wykrywany był przez De-liusa, Howe i Kozińskiego (9) w innej postaci, a mianowicie jako odgałęzienia („wąsy”) zwisające w pozycji *trans* przy przeciwległych widełkach pętli replikacyjnej (Ryc. 3). Jednołańcuchowe wąsy zniknęły pod działaniem egzonukleazy I wyodrębnionej z *E. coli*, która trawi jednoniciowy DNA od końca 3'-OH, co oznaczało, że miały one zakończenia charakterystyczne dla nowosyntetyzowanego DNA. Podobne wyniki otrzymali Chatteray i Inman (10) badając DNA fagów 186.

Kilka hipotez dotyczących mechanizmu powstawania jednoniciowych fragmentów wewnątrz dwułańcuchowych cząsteczek omówione zostanie w dalszym ciągu artykułu. Przypuszcza się, że jednoniciowe odgałęzienie

(„wąsy”) mogą powstawać podczas wyodrębnienia DNA w wyniku przesuwania się łańcuchów na skutek usunięcia białek usztywniających strukturę pęt i replikacyjnej (9,11 i Ryc. 3). Przy opisie interpretacji obrazów otrzymanych z mikroskopu elektronowego należy zwrócić uwagę na fakt, że



Ryc. 3. Pętla replikacyjna DNA fagów T4, (9).

A — hipotetyczna struktura pętli replikacyjnej wewnątrz komórki. B — schemat struktury oglądanej w mikroskopie elektronowym.

— — DNA dwułańcuchowy, - - - DNA pojedynczołańcuchowy.

zdolność rozdzielcza mikroskopu pozwala uwidocznąć odcinek DNA nie krótszy niż złożony ze stu nukleotydów. Ponadto jest bardzo prawdopodobne, że sposób oczyszczania DNA i nawet pipetowania roztworów, może wpływać na końcowy obraz obserwowany w mikroskopie elektronowym głównie z powodu stosunkowo dużej wrażliwości jednoniciowego DNA na siły ścinające. Przy takich możliwościach powstawania artefaktów szczególnie wartościowe są obrazy całych, niepopękanych chromosomów faga λ otrzymane przez Inmana i Schnösa (6,7 i Ryc. 1).

Przyпускаł się z powodu wpływu warunków wyodrębniania DNA Schlegel i Thomas (11), w przeciwieństwie do Wolfsona i Dreslera (8), znajdowali jednoniciowe fragmenty nie tylko wewnątrz lecz i na końcach dwułańcuchowych cząsteczek replikującego się DNA fagów T7. Strukturę cząsteczek identyfikowali oni na podstawie mikroskopii elektronowej jak również zachowania w trakcie chromatografii na hydroksyapatycie oraz wrażliwości na egzo- i endonukleazy degradujące wybiórczo jednołańcuchowe fragmenty, używając przy tym DNA wyodrębnionego z dojrzałych fagów jako kontrolnego preparatu o strukturze w pełni dwułańcuchowej.

Szczególne uwagę na zależność struktury DNA od metody jego oczyszczania zwracają Paetkau i wsp. (12), którzy wyodrębniali pulsowo-znakowany radioaktywny, noworeplikowany DNA fagów T7. W preparatach traktowanych fenolem część nowosyntetyzowanego DNA autorzy

uznawali za jednołańcuchowy na podstawie słabego wiązania z hydroksyapatytem. W preparatach nietraktowanych fenolem frakcja wiążąca się słabo z hydroksyapatytem była siedmiokrotnie mniejsza. Interpretując ten fakt P a e t k a u i wsp. przypuszczali, że fenol denaturuje nowosyntetyzowane fragmenty których struktura drugorzędowa może być słabsza niż reszty DNA. Przypuszczenie to nabiera znaczenia w świetle obserwacji L e n g a i wsp. (13) którzy wykazali, że fenol powoduje obniżenie temperatury denaturacji drugorzędowej struktury DNA. Jednakże wchodzi tu w rachubę jeszcze druga możliwość, którą P a e t k a u i wsp. uważają za mniej prawdopodobną, a mianowicie selektywna utrata frakcji jednołańcuchowej na skutek trudnego jej wymywania z hydroksyapatytu w przypadku frakcjonowania nieodbiałzonego DNA. Możliwość ta wydaje się godna rozważenia w świetle opisanych w następnym rozdziale tego artykułu wyników badań przemawiających za selektywnym związaniem jednołańcuchowej frakcji DNA z białkiem komórkowym.

Fragmenty jednoniciowe zostały ostatnio wykryte w cząsteczkach DNA zwierzęcego wirusa herpes, wyodrębnionych z hodowli nerki królika (14). Mikroskopia elektronowa tego DNA ujawniła, że we wczesnych stadiach po infekcji wirusowej niektóre cząsteczki dwułańcuchowe miały jeden lub dwa końce jednoniciowe, a później pojawiały się cząsteczki dwu- lub trzykrotnie dłuższe od całego chromosomu wirusa, jak również i formy kołowe, które przypuszczalnie powstawały przez łączenie się komplementarnych końców jednoniciowych. Wiele cząsteczek wyodrębnionych z późniejszego okresu zawierało pętle z fragmentami jednoniciowymi znajdującymi się w położeniu trans przy przeciwległych rozwidleniach łańcucha. Te ostatnie struktury były bardzo podobne do pętli replikacyjnych DNA fagów T7, przedstawionych na rycinie 2, oraz do analogicznych form DNA *Drosophila* opisanych w III części tego artykułu i przedstawionych na rycinie 4. Autorzy omawianej pracy — J e a n i B e n - P o r a t — sądzili, że obserwowane przez nich pętle są strukturami związanymi z replikacją wirusowego DNA, natomiast fragmenty jednołańcuchowe, znalezione na końcach cząsteczek, mogą powstawać w wyniku trawienia DNA przez bliżej nieokreśloną egzonukleazę komórek gospodarza.

I-2.1. Drugorzędowa struktura superhelikalnego DNA i innych form replikacyjnych chromosomów kołowych

Fragmenty jednołańcuchowe superhelikalnych cząsteczek wykrywano głównie bardzo czułą metodą pomiaru wiązania formaldehydu lub wodorotlenku metylortęciowego przez niesparowane zasady łańcucha DNA. Wykorzystywano przy tym fakt, że formaldehyd wiąże się z wolnymi grupami aminowymi zasad purynowych i pirymidynowych, a wodorotlenek metylortęciowy reaguje z azotem pierścienia tych zasad. W czasie reakcji z dru-

gim z wymienionych związków grupa metylortęciowa zastępuje proton przy N₃ tyminy oraz N₁ guaniny, a w specjalnie dobranych warunkach może również przyłączyć się do innych atomów azotu pierścieni guaniny, adeniny i cytozyny. Zarówno wiązanie formaldehydu jak i wodorotlenku metylortęciowego powoduje, proporcjonalną do zakresu reakcji, zmianę absorpcji DNA w ultrafiolecie, a ponadto wiązanie wodorotlenku metylortęciowego powoduje zwiększenie gęstości (w gradiencie gęstości siarczanu cezu z bromkiem etydionowym) i szybkości sedimentacji DNA. Mierząc zakres zmian własności DNA po pisanych reakcjach Deana i Lebowitz (15) oraz Beermana i Lebowitz (16) wykazali, że około czterech procent zasad nie jest sparowane w superhelikalnej kołowej formie replikacyjnej DNA fagów Φ X174 i PM2. Badacze ci sądzili, że naruszenie drugorzędowej struktury jest wynikiem dodatkowych skrętów superheliksu ponieważ kołowy DNA nie posiadający struktury trzeciorzędowej nie wykazywał obecności niesparowanych zasad (16). Oczywiście jest, że w przeciwieństwie do mikroskopii elektronowej, pomiary wiązania wodorotlenku metylortęciowego lub formaldehydu nie informują o rozmieszczeniu niesparowanych zasad w chromosomie. Przypuszcza się, że są one zgrupowane w jednym rejonie ponieważ endonukleaza wyodrębniona z *Neurospora crassa* — enzym o wybiórczym powinowactwie do jednołańcuchowego DNA — przekształca superhelikalny DNA Φ X174 lub PM2 w zrelaksowaną formę kołową, a w przypadku prowadzenia reakcji w obecności formaldehydu (utrwalającego rozluźnioną strukturę) powstają liniowe cząsteczki o pełnej długości chromosomu (17,18,19). Rozmieszczenie cięć enzymatycznych w populacji chromosomów jest przypadkowe co najprawdopodobniej świadczy o przypadkowym rozmieszczeniu rejonów jednołańcuchowych w poszczególnych cząsteczkach (19).

Za pomocą innego enzymu trawiącego wybiórczo jednołańcuchowe cząsteczki, endonukleazy S₁, badano replikacyjne formy niektórych wirusów zwierzęcych. Okazało się wówczas, że superhelikalny DNA SV40 (20,21) lub polyoma (22) w pierwszym etapie reakcji jest przekształcany przez enzym w zrelaksowaną formę kołową, a później w liniowe cząsteczki o pełnej długości chromosomu. I w tym wypadku również wrażliwość na enzym uważa się za konsekwencję naruszenia drugorzędowej struktury przez skręty superheliksu ponieważ cząsteczki kołowe i zamknięte, lecz niesuperhelikalne nie zmieniały się pod wpływem endonukleazy. W przeciwieństwie do opisanego powyżej DNA fagów Φ X174, rejon dostępny dla enzymu znajdowano tylko w dwu lub trzech położeniach w cząsteczkach DNA polyoma (22).

Warto zaznaczyć, że inni badacze otrzymywali negatywny wynik kontroli wybiórczości działania endonukleazy S₁ na superhelikalny DNA (23, 24,25) używając w tym celu zrelaksowanej zamkniętej dwułańcuchowej formy kołowej DNA faga fd przygotowanej syntetycznie, lub zrelaksowanej otwartej formy kołowej DNA wirusa SV40 otrzymanej z superheliksu

przez jedno cięcie endonukleazą. Stwierdzono wówczas, że endonukleaza S_1 robi kilka cięć w takich cząsteczkach wobec czego wyciągnięto wniosek, że enzym nie wymaga bezwzględnej obecności jednołańcuchowych rejonów w substracie.

Przyczyny rozbieżności pomiędzy wynikami różnych grup badaczy stają się co najmniej częściowo zrozumiałe w świetle wnikliwych badań wybiórczości działania endonukleazy S_1 przeprowadzonych przez Wiegand i wsp. (26). Wykazały one bowiem, że enzym ten rzeczywiście jest zdolny do cięcia DNA nie mającego luki (ang. *gaps*) w drugorzędowej strukturze, lecz tylko w miejscu leżącym naprzeciw przerwanego wiązania fosfodwuestrowego w komplementarnym łańcuchu. Wiegand i wsp. stwierdzili ponadto, że endonukleaza S_1 znacznie szybciej trawi pętle jednołańcuchowe niż miejsca leżące naprzeciw przerw w wiązaniach fosfodwuestrowych i również szybciej zachodzi przekształcenie form superhelikalnych w formy zrelaksowane niż wytworzenie cząsteczek liniowych. Obserwacje te mogą tłumaczyć przyczyny cięcia, które wystąpiło w zrelaksowanej, dwułańcuchowej otwartej formie kołowej DNA SV40 w doświadczeniach grupy Sauera (23—25) nadal jednak pozostaje niejasna przyczyna podatności dwułańcuchowej zamkniętej formy kołowej DNA fd otrzymanej syntetycznie. Fakt wrażliwości tej formy DNA byłby możliwy do pogodzenia z poprzednio cytowanymi wynikami (23,26), gdyby niektóre preparaty endonukleazy S_1 były zanieczyszczone nukleazą działającą na doskonale sparowany, dwułańcuchowy DNA.

Za istnieniem jednołańcuchowych fragmentów w superhelikalnym DNA przemawia dodatkowo kilka faktów. Jednym z nich jest obserwacja, że taka forma DNA wirusa SV40 lub DNA faga PM2 stanowi dobrą matrycę dla niektórych polimeraz RNA zależnych od DNA, wyodrębnionych z grasicy cielęcej, podczas gdy relaksowana forma kołowa lub liniowa jest bardzo złą matrycą dla tych enzymów. Równocześnie wiadomo, że badane polimerazy nie mogą syntetyzować RNA na nieuszkodzonych dwułańcuchowych cząsteczkach natomiast dobrze transkrybują pojedyncze nici DNA. Podobne obserwacje poczyniono badając bakteryjną polimerazę RNA wyodrębnioną z *E. coli*, dla której również złą matrycą jest dwułańcuchowy DNA. Enzym ten (a właściwie jego rdzeń — „*core*”) dobrze katalizuje syntezę RNA na superhelikalnej formie DNA SV40, źle natomiast — na formie liniowej (27). Ponadto okazało się, że polimerazy wyodrębnione z grasicy cielęcej tworzą trwałe kompleksy z superhelikalnym DNA SV40, a nie tworzą takich połączeń z liniowymi cząsteczkami, przy czym DNA związany z polimerazą traci wrażliwość na endonukleazę S_1 (28). Wszystkie te obserwacje przemawiają za wiązaniem się badanych polimeraz RNA z jednołańcuchowymi fragmentami cząsteczek DNA o strukturze superhelikalnej.

Oprócz wyżej wymienionych znane są jeszcze dwa następujące fakty świadczące o naruszeniu struktury drugorzędowej w cząsteczkach posiadających strukturę trzeciorzędową. Po pierwsze wskazuje na to charakter

widma dichroizmu kołowego superhelikalnego DNA świadczące o zaburzeniu dwułańcuchowej struktury, które zależy od liczby skrętów superheliksu przypadających na jednostkę długości DNA (29); po drugie także białko 32, o wybiórczym powinowactwie do jednołańcuchowego DNA, przyłącza się do superhelikalnego DNA SV40 powodując utworzenie jednej pętli jednołańcuchowej widocznej w mikroskopie elektronowym. W takich samych warunkach praktycznie nie obserwuje się przyłączania białka 32 do zrelaksowanej, kołowej formy DNA SV40 (30).

Ogólnie biorąc pomimo cytowanych rozbieżności pomiędzy obserwacjami niektórych badaczy, zgodność wyników otrzymanych za pomocą kilku różnych metod analizy przemawia za występowaniem pewnych deformacji struktury drugorzędowej w superhelikalnych cząsteczkach DNA. Pomimo zgodności poglądów dotyczących jakości zjawiska, ilościowe oznaczenie niesparowanych zasad za pomocą wiązania formaldehydu lub wodorotlenku metylortęciowego jest kwestionowane przez Wanga (18). Wątpi on w możliwość dobrania takich stężeń, które zapewniałyby reakcję wyłącznie z jednoniciowym DNA. Ponadto według jego wyników szybkość trawienia superhelikalnego DNA przez wybiórcze nukleazy jest około 500 razy mniejsza od trawienia DNA jednołańcuchowego, jak również DNA superhelikalny nie spełnia roli matrycy dla polimerazy I w warunkach właściwych dla syntezy na cząsteczkach jednołańcuchowych.

Luki w dwułańcuchowej strukturze znaleziono ponadto w niesuperhelikalnej replikacyjnej formie II DNA faga Φ X174, wyodrębnionej z bakterii. Luki tych jest kilka i znajdują się głównie w minusowym łańcuchu syntetyzowanym na pojedynczej nici DNA wnikającej do komórki w czasie infekcji fagiem. Eisenberg i Denhardt (31) wykryli to za pomocą polimerazy DNA włączającej znakowane nukleotydy w przerwy cząsteczek dwułańcuchowych.

II. Fragmenty jednołańcuchowe DNA wyodrębnionego z bakterii

II-1. DNA w stadium replikacji

We wstępie tego artykułu wspomniano publikacje Kidsona (1), Okazaki i wsp. (2) oraz Oishi i wsp. (3) opisujące wykrywanie jednołańcuchowego DNA w preparatach wyodrębnionych z *E. coli* lub *B. subtilis*. W badaniach tych stosowano pulsowe (np. 5 do 30-sekundowe) znakowanie radioaktywną tymidyną w celu napiętnowania nowosyntetyzowanych fragmentów chromosomu. Cały DNA oczyszczano standardowymi metodami opartymi na odbiałczaniu fenolem po czym poddawano go ekstrakcji przeciwprądowej w układzie dwufazowym (1), lub adsorpcji i elucji na kolumnie z hydroksypatyty lub też wirowaniu w gradiencie gęstości chlorku cezu. W takich warunkach — pozwalających odróżnić DNA jednołańcuchowy od dwułańcuchowego — frakcja znakowana pulsowo zachowywała się jak denaturowany DNA, w przeciwieństwie do reszty prepa-

ratu wykazującej własności natywnych, dwułańcuchowych cząsteczek. Ponadto nowosyntetyzowany DNA był wybiórczo wrażliwy na egzonukleazę I wyodrębnioną z *E. coli* i trawiącą jedynie zdenaturowane cząsteczki (2,3). Jednołańcuchowy DNA stanowił około 0,05 do 0,1% całości preparatu. Jego długość według Oishi, odpowiadała zawartości 800 do 1000 nukleotydów, a według Okazaki i wsp., od 1000 do 2000 nukleotydów w cząsteczce. Czas istnienia nowosyntetyzowanych jednołańcuchowych cząsteczek DNA jest krótki: w ciągu kilku minut są one wydłużane i przekształcane w cząsteczki dwułańcuchowe, początkowo z przerwami w ciągłości podwójnego łańcucha, a później w pełni stają się dwułańcuchowe (32). W wydłużaniu nowych łańcuchów u *E. coli* najprawdopodobniej uczestniczy polimeraza I, ponieważ w mutancie o obniżonej aktywności tego enzymu proces przebiega wolniej niż w normalnych komórkach (33). Ostatnio wykazano (34), że w komórkach *B. subtilis* do wydłużania łańcuchów konieczna jest aktywna polimeraza III. Wykazano też, że jednołańcuchowe fragmenty nie mogą renaturować się między sobą. Oznacza to, że cząsteczki te nie zawierają komplementarnych sekwencji nukleotydowych, a więc nie są syntetyzowane na przeciwległych fragmentach nici komplementarnych.

Autorzy omawianych powyżej prac przypuszczają, że nowosyntetyzowany DNA początkowo istnieje w komórce w postaci krótkich nici (fragmenty Okazaki) w kompleksie z białkiem czy białkami układu replikacyjnego. Białka te mają utrzymywać nowy fragment DNA w połączeniu z jego matrycowym łańcuchem lecz trwałość takiej struktury może być mniejsza niż normalnej dwułańcuchowej cząsteczki. Oddzielenie „nowego” łańcucha może w tym przypadku następować w wyniku usunięcia białka skomplexowanego z DNA. Otrzymywałoby się wówczas wolne cząsteczki jednołańcuchowe i ich komplementarne odpowiedniki tkwiące w ciągłej strukturze dwułańcuchowej reszty chromosomu. Zgodnie z tym rozumowaniem wykrycie wolnych „nowych” cząsteczek byłoby możliwe po nadaniu im dużej radioaktywności pozwalającej dostrzec znikomą frakcję zachowującą się inaczej niż reszta preparatu, natomiast wykrycie ich komplementów wymagałoby szczególnych warunków, w których nie przeszkadzałoby sąsiedztwo ściśle zespolonego z nimi dwułańcuchowego DNA. Najprawdopodobniej te właśnie „stare” łańcuchy są widziane w mikroskopie elektronowym.

II-2. Fragmenty jednołańcuchowe o nieustalonym pochodzeniu

Jednołańcuchowe rejony występujące w dwułańcuchowych cząsteczkach wykrywali Harris i Barr (35,36) oraz LeClerc i Setlow (37) w DNA wyodrębnionym z *B. subtilis* i *Haemophilus influenzae*. W przypadku DNA *B. subtilis* pozycja DNA w lekko alkalicznym (nie denaturującym) gradiencie gęstości chlorku cezu wykazywała 5-procentową zawartość jednołańcuchowych rejonów w cząsteczkach dwułańcuchowych. W przypadku *H. influenzae* podobną, około 5-procentową zawartość jedno-

łańcuchowego DNA, zidentyfikowano na podstawie zachowania preparatu na kolumnie z pochodnej celulozy, odróżniającej natywne i denaturowane cząsteczki, jak również na podstawie wrażliwości na endonukleazę S_1 . Kilkakrotnie większe ilości: 10 do 20% DNA wrażliwego na endonukleazę S_1 znaleziono w naszym laboratorium w preparatach wyodrębnianych z *B. subtilis* 168 thy^- (38). Obserwowano przy tym, że niecałkowicie odbiałczy preparat, zawierający około 1% białek komórkowych połączonych z cząsteczkami DNA, nie wykazywał zupełnie (lub wykazywał małą) wrażliwości na endonukleazę S_1 . Podobnie było w przypadku preparatu potraktowanego enzymami proteolitycznymi, które trawiąc białka pozostawiały jeszcze oligopeptydy związane z DNA. Dopiero po ich usunięciu fenolem kilkanaście procent DNA stawało się wrażliwe na enzym trawiący cząsteczki jednołańcuchowe. Na podstawie tych obserwacji przypuszcza się, że bliżej nieokreślone białko chroni jednołańcuchową frakcję DNA przed trawieniem endonukleazą S_1 . Przyczyny dużej zawartości jednoniciowego DNA w naszych preparatach nie są jeszcze wyjaśnione. Możliwe że jest ona świadectwem szczególnych właściwości badanego szczepu bakterii.

II-3. Jednołańcuchowy DNA występujący w procesie rekombinacji

W procesie transformacji bakterii fragment jednej nici transformującego DNA zastępuje odpowiedni fragment DNA biorcy w dwuniciowej strukturze chromosomu, a zatem warunkiem pomyślnego przebiegu rekombinacji powinno być przejściowe wytworzenie jednoniciowych struktur DNA dawcy i biorcy. Badania wykazały, że po pobraniu dwuniciowych cząsteczek przez komórki *Diplococcus pneumoniae* i *B. subtilis* znajdują się w nich jednołańcuchowe cząsteczki DNA dawcy (39).

Ponadto z komórek *B. subtilis* w pracowni Venemy (40) wyodrębniono ostatnio fragmenty DNA biorcy z przyłączonymi fragmentami DNA dawcy: kompleksy te mają rejony jednołańcuchowe i są uważane za przejściowe produkty rekombinacji.

Fragmenty jednołańcuchowe znajdowano również w DNA wyodrębnionym z samych bakterii kompetentnych, to jest bakterii zdolnych do pobrania DNA i ulegania transformacji. Są przypuszczenia że te właśnie frakcje mogą odgrywać rolę w rekombinacji z pobranymi cząsteczkami egzogenego DNA (36,37,41). Pogląd ten opiera się na dwóch następujących faktach: frakcja jednołańcuchowa wzrasta w tym samym czasie, gdy pojawia się kompetencja w populacji bakterii, z których wyodrębnia się badany DNA; w DNA pochodzącym z bakterii zdolnych do pobrania DNA, lecz niezdolnych do rekombinacji, nie wykrywano frakcji jednołańcuchowej. Drugi z wymienionych faktów wydaje się niepodważalny w granicach czułości metod użytych do wykrycia jednołańcuchowego DNA, natomiast pierwszy fakt prawdopodobnie świadczy tylko o częściowym związku między równoczesnymi procesami. Podstawę do takiego poglądu stanowią

wyniki doświadczeń wykonanych ostatnio w naszym laboratorium (38). Wykazały one, że nie ma różnicy w zawartości jednołańcuchowego DNA w preparatach wyodrębnionych z frakcji bakterii kompetentnych i niekompetentnych pochodzących z tej samej populacji *B. subtilis*. Ponadto jednoniciowy DNA znaleziono we wszystkich fazach wzrostu hodowli bakteryjnej zarówno w fazie kompetencji jak i wówczas gdy populacja nie była w ogóle zdolna do ulegania transformacji. Tak więc wyniki nasze przemawiają przeciw związkowi między obecnością jednołańcuchowego DNA biorcy a kompetencją, rozumianą jako zdolność do pobrania DNA i rekombinacji, natomiast nie przeczą przypuszczalnej roli jednołańcuchowego DNA biorcy w samym procesie rekombinacji.

W procesie koniugacji występującym u bakterii, DNA dawcy jest również wcielany w formie jednołańcuchowej do chromosomu biorcy, ale cząsteczki o takiej strukturze można wykryć jedynie w mutantach biorców o zaburzonej replikacji DNA (42) lub w koniugacji z tymino-zależnymi mutantami dawców w warunkach głodu tyminowego (43).

III. Fragmenty jednołańcuchowe DNA wyodrębnionego z komórek zwierzęcych

III-1. DNA w stadium replikacji

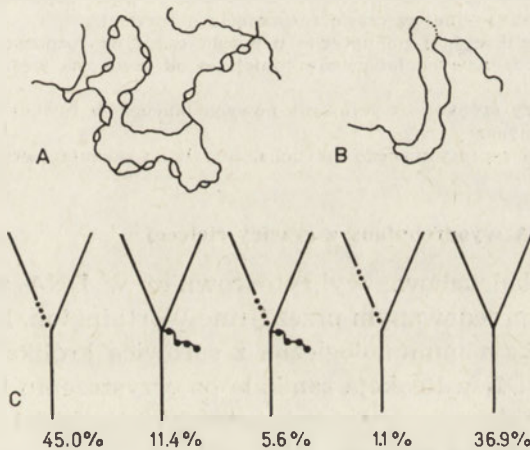
Podobnie jak w przypadku bakterii, pulsowo znakowany, nowosyntetyzowany DNA wyodrębniony z komórek zwierzęcych zachowuje się tak jak frakcja jednoniciowa pod względem powinowactwa do hydroksypapatytu czy nitrocelulozy. Wykazano to w przypadku DNA wyodrębnionego z limfocytów ludzkich (44), regenerującej wątroby szczura (45), komórek raka Ehrlicha (46,47,48) oraz komórek HeLa (49,50). Dwie grupy badaczy (48,50) zwracają jednak uwagę na to, że obecność cząsteczek jednołańcuchowych uzależniona jest od metody wyodrębniania DNA tak że pozornie niewielka modyfikacja postępowania może spowodować pojawienie się nowosyntetyzowanego DNA w formie dwułańcuchowej.

W doświadczeniach Probst i Jenke (48) na przykład cząsteczki jednołańcuchowe pojawiały się wówczas gdy liza komórek i jąder komórkowych przebiegała równocześnie z dysocjacją nukleoproteidów. Zmiana kolejności procesów, to znaczy zniszczenie struktury jąder przed dysocjacją nukleoproteidów, prowadziła do otrzymywania nowosyntetyzowanego DNA w formie cząsteczek dwułańcuchowych. Probst i Jenke przypuszczali zatem, że nowosyntetyzowany DNA znajduje się w komórce w formie dwułańcuchowej, jednakże w połączeniu z czynnikami destabilizującymi drugorzędową strukturę. Mogłyby nimi być białka rozwijające, które prawdopodobnie biorą udział w replikacji DNA komórek zwierzęcych (51).

Według wyżej cytowanych publikacji masa cząsteczkowa nowosyntetyzowanego DNA, wyodrębnianego w formie jednołańcuchowej, wynosiła od

$0,3 \times 10^6$ do około 7×10^6 daltonów podczas gdy przeważająca reszta DNA miała masę cząsteczkową wynoszącą od kilkunastu do dwudziestu kilku milionów daltonów. Biorąc pod uwagę dynamiczną postać nowosyntetyzowanego DNA i jego wrażliwość na siły ścinające — wahania wielkości cząsteczek można przypisać różnicom w czasie znakowania i sposobach wyodrębniania DNA stosowanych przez różnych badaczy.

W roku 1974 Kriegstein i Hogness (52) opublikowali piękne obrazy DNA otrzymane w mikroskopie elektronowym. Preparat ten wyodrębniono z dzielących się jąder komórkowych *Drosophila*, a zdjęcia przedstawiają fragmenty odpowiadające około 20% DNA zawartego w jednym chromosomie, który w całości zawiera 2,1 cm DNA. Jedna dziesiąta oglądanych cząsteczek posiada oczka o fragmentach jednoniciowych a przy rozgałęzieniach cząsteczek widoczne są również wąsy jednoniciowe (Ryc. 4). Wąsy te znikają pod wpływem trawienia egzonukleaza I — enzymem o wybiórczym powinowactwie do denaturowego DNA. Średnia długość jednołańcuchowych fragmentów DNA *Drosophila* odpowiadała zawartości 200 nukleotydów.



Ryc. 4. Schemat obrazu DNA *Drosophila* otrzymanego przez Kriegsteina i Hognessa w mikroskopie elektronowym (52).

A — Fragment DNA z „oczkami”.

B — Oczko z najczęściej spotykanym rozmieszczeniem fragmentów jednołańcuchowych.

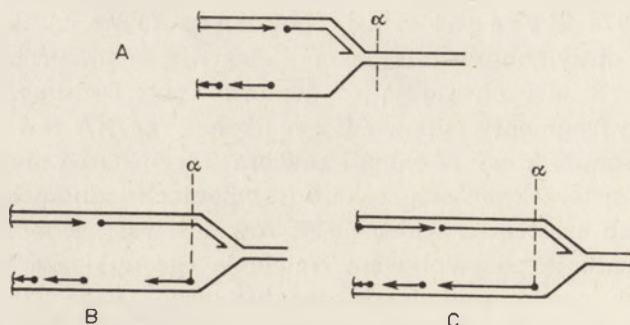
C — Wszystkie typy widełek spotykane w „oczkach” DNA *Drosophila*. Liczby wyrażone w procentach określają częstość występowania poszczególnych typów wśród 360 fotografowanych widełek.

— — DNA dwułańcuchowy, ●●●● — DNA jednołańcuchowy.

Na podstawie kilku cech Kriegstein i Hogness uważają „oczka” za pętle replikacyjne DNA: długość ich obu ramion jest identyczna, co może być wynikiem komplementarności rozsuniętych łańcuchów; obraz mikroskopowy jest podobny do autoradiogramów replikującego się DNA; DNA wyodrębniony z dzielących się jąder zawiera sto razy więcej oczek niż DNA z jąder nie dzielących się.

Według przypuszczeń Kriegsteina i Hognessa jednołańcu-

chowe fragmenty mogą gromadzić się wówczas gdy wydłużanie nowosyntetyzowanych fragmentów DNA przebiega wolniej niż wędrówka widełek replikacyjnych (Ryc. 5) natomiast „wąsy” jednoniciowe mogłyby powstawać w wyniku wzajemnego przemieszczania się łańcuchów w pętli replikacyjnej.



Ryc. 5. Model Kriegersteina i Hognessa replikacji DNA tłumaczący powstawanie fragmentów jednołańcuchowych wewnątrz pętli replikacyjnych (52).

A — Fragment pętli replikacyjnej w czasie rozpoczęcia obserwacji.

B — Fragment pętli replikacyjnej po upływie pewnego czasu od rozpoczęcia obserwacji przy szybkości wydłużania nowych łańcuchów mniejszej od szybkości wędrówki widełek replikacyjnych.

C — Odpowiednik B przy szybkości wydłużania nowych łańcuchów równej szybkości wędrówki widełek replikacyjnych.

α — Miejsce rozpoczęcia syntezy nowego łańcucha. Strzałka wskazuje kierunek syntezy (5'—3').

III-2. Handlowy DNA wyodrębniony z grasicy cielęcej

Fracje jednołańcuchowe wykryto również w DNA wyodrębnionym z grasicy cielęcej sprzedawanym przez firmę Worthington. Fracje te ujawniła dodatnia reakcja immunologiczna z surowicą królika uodpornionego na denaturowany DNA. Reakcja zanikała po oczyszczeniu DNA na kolumnie z metylowanej albuminy na ziemi okrzemkowej oddzielającej cząsteczki w pełni dwułańcuchowe od reszty DNA (53).

III-3. DNA wyodrębniony ze starych organizmów zwierzęcych

Spośród publikacji dotyczących jednołańcuchowego DNA komórek zwierzęcych na uwagę zasługuje również praca Chetsangi i wsp. (54) nawiązująca do badania mechanizmu molekularnego procesu starzenia się organizmów. Według nich tylko jeden procent DNA wyodrębnionego z wątroby młodych myszy ulega strawieniu endonukleazą S_1 (enzym trawiący wybiórczo DNA jednołańcuchowy), a aż czternaście do dwudziestu pięciu procent DNA jeżeli preparat pochodzi z myszy starych. Nagromadzenie jednołańcuchowego DNA mogłoby być zatem jedną z cech, a być może i przyczyn, starzenia się organizmu. To spostrzeżenie nie znalazło potwierdzenia w innym układzie doświadczalnym; a mianowicie zawsze tylko kil-

ka procent DNA wyodrębnionego z ludzkich jajników ulega strawieniu endonukleazą S_1 , bez względu na to, czy pochodzi on z jajników przed czy po menopauzie.

IV. Wnioski i uwagi końcowe

Ogólnie biorąc fragmenty jednołańcuchowe DNA znaleziono dotychczas w czterech formach: jako wolne cząsteczki, w postaci odgałęzień łańcucha zwisających z pętli replikacyjnej, jako fragment ciągłej struktury starego łańcucha matrycowego, oraz jako bliżej nieokreślone rozluźnienie drugorzędowej struktury w superhelikalnych cząsteczkach.

Czytelnik dochodzący do ostatniej części artykułu nabrał już zapewne przekonania, że pochodzenie i rola jednołańcuchowej frakcji DNA są tylko częściowo wyjaśnione. Związek jednołańcuchowych fragmentów z replikacją DNA nie budzi wątpliwości, dużo mniej natomiast wiadomo o związkach z rekombinacją, transkrypcją i naprawą uszkodzeń. Te ostatnie mogą powstawać w komórkach pod wpływem ultrafioletu, promieni X lub innych czynników otoczenia. Istnieją ponadto spontaniczne uszkodzenia materiału genetycznego będące następstwem błędów polimerazy, enzymatycznej dezaminacji cytozyny w łańcuchu DNA lub depurynacji. Wycinanie uszkodzeń przez wyspecjalizowane w tym enzymy powinno prowadzić do pojawienia się niesparowanych zasad, a nawet dłuższych jednołańcuchowych fragmentów w strukturze DNA. Na przykład można oczekiwać obecności jednołańcuchowych struktur komplementarnych z oligomerów zawierających fotodimery, wycinanych z chromosomów bakteryjnych. Trudności w wykryciu takich odcinków w wyodrębnionym DNA wynikają z faktu, że odsłanianie jednoniciowych fragmentów *in vivo* następuje najprawdopodobniej niemal równocześnie z syntezą ich komplementów. Aktualne i wyczerpujące wiadomości na temat naprawy DNA znajdzie czytelnik w przeglądzie Pietrzykowskiej i Shugara (56).

Wydaje się prawdopodobne, że działanie układów naprawiających DNA ma związek z opisaną w tym artykule odosobnioną obserwacją obecności 25% materiału wrażliwego na endonukleazę S_1 w DNA wyodrębnionym z wątroby starych myszy. Przypuszcza się bowiem, że w starych organizmach następuje obniżenie wydajności procesów naprawy co mogłoby prowadzić do nagromadzenia pośrednich produktów reperacji.

Trudności w wykrywaniu jednołańcuchowych struktur DNA oczekiwanych w innych procesach, a szczególnie w rekombinacji przypuszczalnie są spowodowane równoczesnym ich powstawaniem i zakrywaniem przez komplementarne łańcuchy rekombinujących cząsteczek (57,58).

Jak zwykle przy analizie materiału wyodrębnionego z komórek nasuwa się pytanie w jakim stopniu badane cząsteczki odzwierciedlają stan DNA *in vivo*? Pewnych zmian w strukturze można oczekiwać w wyniku usuwa-

nia białek oddziałujących z DNA w jego naturalnym środowisku. Za najbardziej prawdopodobne źródło artefaktów uważa się pierwszy etap wyodrębniania DNA, w którym zachodzi rozpuszczanie powłok komórkowych. Naruszenie struktury komórek może bowiem stwarzać warunki do oddziaływania DNA o pulsującej strukturze drugorzędowej (59,60) z obecnymi w komórkach białkami denaturującymi (51,61) i w konsekwencji doprowadzić do pojawienia się pojedynczych łańcuchów w wyodrębnionym DNA.

Niektórzy badacze wyrażają inne przypuszczenie, a mianowicie że jednołańcuchowe fragmenty mogą też powstawać w wyniku działania nukleaz uaktywnianych w czasie rozpuszczania komórek.

Mimo wszystkich wymienionych zastrzeżeń istnieje mocny argument przemawiający za istnieniem jednołańcuchowego DNA w nieuszkodzonej komórce. Jest nim naturalny mechanizm „wyłączenia” replikacji DNA komórek zwierzęcych przez wirus ospy. Mechanizm ten polega na wprowadzeniu przez wirion dwu nukleaz działających wyłącznie na jednoniciowy DNA (62,63). Oczywiście jest, że skuteczność działania tych nukleaz wymaga istnienia substratu w komórkach.

W opisie poszczególnych badań zwracano uwagę czytelnika na zależność wykrywania jednołańcuchowych fragmentów od sposobu wyodrębniania DNA. Pewne światło zdają się rzucać na to dwie z pośród cytowanych obserwacji. Pierwsza z nich poczyniona przez Petka u i wsp. (12 i I część tego artykułu) wykazująca, że traktowanie fenolem warunkuje wykrycie jednoniciowego DNA. Druga obserwacja, zrobiona w naszym laboratorium (38 i II część tego artykułu) wykazująca równoczesność usuwania przez fenol białek związanych z DNA i pojawiania się wrażliwości na działanie wybiórcze enzymu w stosunku do jednołańcuchowych cząsteczek. Oba te fakty podtrzymują cytowane w tym artykule i często wyrażane przypuszczenie, że jednołańcuchowy DNA pochodzi z frakcji chromosomu związanej z jakimś szczególnym białkiem.

Artykuł nadszedł 25.11.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 16.12.1976

PIŚMIENNICTWO

1. Kidson C., (1966), *J. Mol. Biol.*, **17**, 1—9.
2. Okazaki R., Okazaki T., Sakabe K., Sugimoto K., Sugino A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 598—605.
3. Oishi M., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 329—336.
4. Watson J., (1975), *Biologia Molekularna Genu*, PWN, Warszawa.
5. Jarmolinsky M. B., (1971) w *The Bacteriophage* red. Hershey A.D., str. 97—113, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A.
6. Schnös M., Inman R. B., (1970), *J. Mol. Biol.*, **51**, 61—73.
7. Inman R. B., Schnös M., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 319—325.
8. Wolfson J., Dressler D., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2682—2686.

9. Delius H., Howe C., Koziński A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 3049—3053.
10. Chatteraj D. K., Inman R. B., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1768—1771.
11. Schlegel R. A., Thomas Jr. C. A., (1972), *J. Mol. Biol.* **68**, 319—345.
12. Paetkau V., Langman L., Miller Jr. R. C., (1975), *J. Mol. Biol.*, **98**, 719—737.
13. Leng M., Drocurt J.-L., Helène C., Ramstein J., (1974), *Biochimie* **56**, 887—891.
14. Jean J.-H., Ben-Porat T., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2674—2678.
15. Dean W. W., Lebowitz J., (1971), *Nature New Biology*, **231**, 5—8.
16. Beerman T. A., Lebowitz J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **79**, 451—470.
17. Kato A. C., Bartok K., Fraser M. J., Denhardt D. T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **308**, 68—78.
18. Wang J. C. (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 797—816.
19. Bartok K., Denhardt D. T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 530—535.
20. Méchali M., de Recondo A.-M., Girard M., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1306—1320.
21. Beard P., Morrow J. F., Berg P., (1973), *J. Virol.* **12**, 1303—1313.
22. Germond J.-E., Vogt V. M., Hirt B., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 591—600.
23. Chowdhury K., Gruss P., Waldeck W., Sauer G., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 709—716.
24. Waldeck, Chowdhury K., Gruss P., Sauer G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **425**, 157—167.
25. Chowdhury K., Sauer G., (1976), *FEBS Letters* **68**, 68—70.
26. Wiegand R. C., Godson G. N., Radding C. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8848—8855.
27. Mandel J.-L., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 367—378.
28. Hossenlopp P., Oudet P., Chambon P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 397—411.
29. Maestre M. F., Wang J. C., (1971), *Biopolymers*, **10**, 1021—1030.
30. Delius H., Mantell N. J., Alberts B., (1972), *J. Mol. Biol.*, **67**, 341—350.
31. Eisenberg S., Denhardt D. T., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 984—988.
32. Oishi M. (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 691—698.
33. Okazaki R., Arisawa M., Sugino A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2954—2957.
34. Anderson J. J., Ganesan A. T., (1976), *J. Mol. Biol.*, **106**, 285—295.
35. Harris W. J., Barr G. C., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 245—255.
36. Harris W. J., Barr G. C., (1971), *Mol. Gen. Genetics* **113**, 313—330.
37. LeClerc J. E., Setlow J. K., (1975), *J. Bacteriol.*, **122**, 1091—1102.
38. Piechowska M., Piwnicka M., Venema G., (1977), *Modern Trends in Bacterial Transformation and Transfection*, red. A. Portoles, str. 135—142, Elsevier/North-Holand Biomedical Press B. V.
39. Hotchkiss R. D., Gabor M., (1970), *Ann. Rev. Genetics*, **4**, 193—224.
40. Buitenwerf J. (1976) Abstracts of Communications, 3rd European Meeting on Bacterial Transformation and Transfection September 1976, Granada, Spain.
41. Yasbin R. E., Wilson G. A., Young F. E., (1975), *J. Bacteriol.* **121**, 296—304.
42. Siddiqi O., Fox M. S. (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 101—123.
43. Sarathy P. V., Siddiqi O., (1973), *J. Mol. Biol.* **78**, 443—451.

44. Fox R. M., Mendelsohn J., Barbosa E., Goulian M., (1973), *Nature New Biology*, **245**, 234—237.
45. Berger Jr. H., Irvin J. L., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **65**, 152—159.
46. Sato S., Tanaka M., Sugimura T., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 43—48.
47. Sato S., Ariake S., Saito M., Sugimura T., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **49**, 270—277.
48. Probst H., Jenke H.-S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 800—806.
49. Painter R. B., Schaefer A., (1969), *Nature*, **221**, 1215—1217.
50. Habener J. F., Bynum B. S., Shack J., (1970), *J. Mol. Biol.*, **49**, 157—170.
51. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2133—2141.
52. Kriegstein H. J., Hogness D. S., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 135—139.
53. Tan E. M., Natali P. G., (1970) *J. Immunol.*, **104**, 902—906.
54. Chetsanga C. J., Boyd V., Peterson L., Rushlow K., (1975), *Nature*, **253**, 130—131.
55. Sheid B., Pedrinan L., Lu T., Nelson Jr. J. H., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1131—1133.
56. Pietrzykowska I., Shugar D., (1977), w *Comprehensive Biochemistry*, wydawcy M. Florkin i E. H. Stotz, Elsevier Publishing Co., The Netherlands, (w druku).
57. Broker T. R., Lehman I. R., (1971), *J. Mol. Biol.* **60**, 131—149.
58. Meselson M. S., Radding C. M. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 358—361.
59. von Hippel P. H., Wong K.-Y., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 587—613.
60. Shikama K., Miura K.-I., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **63**, 39—46.
61. Alberts B. M., Frey L., (1970), *Nature (Lond.)*, **227**, 1313—1318.
62. Parkhurst J. R., Peterson A. R., Heidelberger C., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3200—3204.
63. Pogo B. G. T., Dales S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1726—1729.

KATARZYNA KAŃSKA-BRUDZYŃSKA*), ZOFIA WALTER**)

Struktura chromatyny

Chromatin Structure

Spis treści

- I. Sposoby badań chromatyny
- II. Udział białek w strukturze chromatyny
 - II-1. Rola histonów
 - II-2. Model Kornberga
 - II-3. Współczesne modele podjednostki chromatyny
 - II-4. Struktura nukleosomu
 - II-5. Rodzaj nukleosomów
 - II-6. Rola histonu H1
 - II-7. Rola białek niehistonowych
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. Structure of chromatin — experimental approach
- II. Protein participation in chromatin structure
 - II-1. The role of histones
 - II-2. Kornberg's model
 - II-3. Contemporary models of chromatin subunit
 - II-4. Nucleosom's structure
 - II-5. Kinds of nucleosomes
 - II-6. The role of histone H1
 - II-7. The role of nonhistone proteins
- III. Conclusion

*) Mgr, **) Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: poli (A)-RNA — cytoplazmatyczny, informacyjny kwas rybonukleinowy zakończony sekwencją kwasu poliadenylowego; cDNA — kwas dezo-ksyrybonukleinowy zsyntetyzowany przez odwrotną transkryptazę na matrycy poli (A)-RNA.

I. Sposoby badań chromatyny

Ostatnie lata przyniosły szybki i burzliwy rozwój poglądów i hipotez dotyczących struktury chromatyny. Powodem „burzy” były dane eksperymentalne sugerujące podjednostkową strukturę chromatyny. Wyniki te, uzyskane z trawienia chromatyny i chromatynowego DNA przy pomocy nukleaz, z dyfrakcji promieni rentgenowskich oraz z obrazów chromatyny w mikroskopie elektronowym, w znacznym stopniu podważyły model włókienkowej struktury chromatyny. Model włókienkowej struktury chromatyny był przedmiotem wielu prac przeglądowych (1,2,3,4,5,6). Zasadniczego element stanowiła — zaproponowana przez Pardon a i Wilkin s a (7) — superspirala nukleohistonowa o średnicy 100Å i o skoku 120 Å. Powstał on na podstawie wyników szczegółowej analizy obrazów chromatyny w mikroskopie elektronowym. Należy jednak zaznaczyć, że wygląd chromatyny w mikroskopie zależy w dużej mierze od sposobu barwienia i utrwalania preparatów. Konieczność usunięcia wody z próbek przygotowanych do badań powoduje zakłócenia w strukturze chromatyny i zniekształca jej obraz w mikroskopie elektronowym (2). Decydujące znaczenie ma sposób preparowania chromatyny. Obrazy elektronomikroskopowe chromatyny izolowanej łagodnymi metodami stały się zupełnym zaskoczeniem, przedstawiały bowiem globularne cząstki przypominające wyglądem koraliki nanizane na sznurek (8, 9). Globularne cząstki mają wielkość 70 Å i masy cząsteczkowe około 160 000. Według Olins i Olins (9) pojedyncza globularna cząstka posiada po jednej cząsteczce każdego rodzaju histonów w ilości wagowo równoważnej z ilością DNA. Poszczególne cząstki, nazwane przez autorów ciąłkami „v” połączone są ze sobą za pomocą odcinków DNA (10, 11) szczególnie wrażliwych na działanie nukleaz (12, 13). Taka koncepcja budowy chromatyny, która powstała na podstawie obrazów z mikroskopu elektronowego wymagała dalszych potwierdzeń, gdyż trudno było udowodnić, że koralikowy wygląd struktury chromatyny nie jest artefaktem. W 1971 roku Clark i Felsenfeld (14) wykazali, że około 50% DNA w chromatynie nie ulega trawieniu przez nukleazy. DNA wrażliwy na działanie nukleaz odpowiada tzw. „otwartym” obszarom chromatyny, w przeciwieństwie do nukleazo-odpornych, „zablokowanych” obszarów (14). Rozróżnienie obszarów „otwartych” lub „zablokowanych” DNA dotyczy ich dostępności dla nukleazy, a jednocześnie nie wyklucza możliwości, że pewna część obszarów „otwartych” jest luźno pokryta białkami chromosomalnymi. Clark i Felsenfeld przyjęli, że trawienie nukleazą gronkowcą prowadzi do wytworzenia serii segmentów DNA pokrytych białkami oraz pozbawionych białka. Określona przez nich masa cząsteczkowa obu typów segmentów wynosi po 75 000. Oznacza to, że obszary chronione przez białka są niezwykle krótkie — rzędu 100—200 par zasad. Elementy pozbawione białka stanowią połączenie

między elementami bogatymi w białko i są wrażliwe na atak nukleolityczny.

Dalsze badania z użyciem nukleaz potwierdziły podjednostkową strukturę chromatyny. Najczęściej stosowano w badaniach endonukleazę z wątroby szczura (15), nukleazę gronkowcową (16, 17, 18), DN-azę I i nukleazę z *Micrococcus* (19). Produkty trawienia chromatyny powstałe po określonych czasach inkubacji analizuje się na podstawie szybkości migracji w elektroforezie na żelu poliakrylamidowym. Wielkość fragmentów określa się przez kalibrowanie w stosunku do odpowiedniego wzorca wewnętrznego wędrującego w żelu razem z próbkami. Stosując podobną procedurę przy użyciu endonukleazy i chromatyny z wątroby szczura uzyskano pasma DNA migrujące w żelu tak, jakby były wielokrotnościami podstawowej jednostki (15). W dalszym etapie badań określono, że wielkość tej podjednostki wynosi 205 ± 15 par zasad (16, 20). Także nukleaza gronkowcowa i DN-aza I trawią DNA chromatyny do odcinków liczących 190—200 par zasad (16, 17, 18). Przy przedłużonym trawieniu chromatyny spada długość podstawowego fragmentu DNA do 150 par zasad lub mniej (16, 17). Podobnie, wyizolowany podstawowy fragment monomeryczny poddany trawieniu dostarcza dodatkowych pasm DNA świadczących o dalszej degradacji (17, 21, 22). Jak wykazał Van Hold e (19) pozostały nukleazoodporny fragment ma długość 140 par zasad. Autor ten wyraził przypuszczenie, że dodatkowo ulegający trawieniu DNA może odpowiadać „odstępnikowemu” (*ang. spacer*) DNA widocznemu między ciąkami „v” w mikroskopie elektronowym (9, 10, 11). Całkowita długość DNA, w myśl tej koncepcji popartej przekonywującymi danymi doświadczalnymi (19), wynosi 180 par zasad, przy czym na fragment monomeryczny przypada odcinek 140 nukleotydowy a na element łączący poszczególne monomery — 40 nukleotydowy. Pewne różnice w długościach fragmentów DNA mogą pochodzić z różnych warunków trawienia przy odmiennych siłach jonowych, gdyż zgodnie z danymi G r i f f i t h a (23), chromatyna w roztworach o niskich siłach jonowych przyjmuje postać bardziej rozluźnioną z wyraźnie widocznymi odcinkami DNA łączącego podjednostki chromatyny. Być może w roztworach o wyższych siłach jonowych odcinki te zachodzą na siebie i stają się mniej dostępne dla nukleazy. Ostatnio ugruntowało się jednak przekonanie, że długość odcinka DNA przypadająca na nukleosom (monomeryczny fragment chromatyny) zależy od źródła z jakiego izoluje się chromatynę np. nukleosomy z grzybów mają 165-nukleotydowe fragmenty DNA, podczas gdy z erytrocytów kurcząt fragmenty 210-nukleotydowe (24). Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich przypadkach, niezależnie od źródła pochodzenia, długość odcinka DNA nukleosomu odpornego na nukleazę jest stała i wynosi 140 par zasad. Sądzi się obecnie, że obserwowane rozbieżności w określeniu par zasad wynikają z różnic w długości fragmentów DNA łączących poszczególne nukleosomy. Fragmenty te posiadają prawdopodobnie miejsca wiązania histonu H1 i —

być może — także innych białek mających zdolności do sieciowania DNA. Stopień upakowania DNA w odcinkach łączących nukleosomy zależy wobec tego od ilości miejsc akceptorowych dla histonu H1 (24).

Podjednostka chromatyny sedimentuje przy 11—12 S, co odpowiada masie cząsteczkowej 176 000 (20, 25) i zgadza się z wartościami uzyskanymi dla ciałek „v” w mikroskopie elektronowym (8, 9).

Dwuniciowy odcinek DNA pomiędzy ciałkami „v” jest nie tylko wrażliwy na działanie nukleaz, ale także na działanie ultradźwięków (26). Z chromatyny rozbitej ultradźwiękami można otrzymać pojedyncze ciałka „v”, których analiza wykazała obecność 200 nukleotydowych odcinków DNA i równoważnej wagowo ilości białka.

W chwili obecnej znacznie więcej danych przemawia za modelem koralikowej struktury chromatyny niż za poprzednio wysuwaną koncepcją budowy włókienkowej (4, 7). Należy włączyć tu ostatnie wyniki uzyskane z badań przy użyciu techniki niskokątowej dyfrakcji promieni X (27) i metody rozpraszania neutronowego (28), które nie tylko potwierdzają hipotezę globularnej struktury chromatyny, lecz mówią także o wewnętrznym upakowaniu nukleosomów (29).

W roku 1974 zaproponowano dwa modele podjednostkowej struktury chromatyny (30, 31). Oba modele są zgodne w tym, że oddziaływania między cząsteczkami histonów określają strukturalną integralność podstawowych fragmentów chromatyny.

II. Udział białek w strukturze chromatyny

II-1. Rola histonów

Ścisłe połączenie histonów z DNA nasuwa przypuszczenie, że właśnie te białka biorą udział w utrzymywaniu struktury chromosomu. Poprzednio przypisywano histonom rolę regulatorów aktywności genetycznej. Ze względu na małą heterogenność, brak specyficzności tkankowej i gatunkowej zdeprecjonowano ich rolę jako czynników determinujących ekspresję genową. Sądzi się natomiast, że histony mogą uczestniczyć w tym procesie w sposób niespecyficzny przez proste przykrycie nieaktywnych obszarów DNA lub przez wywołanie w nich zmian strukturalnych. Charakterystyczne cechy histonów przemawiają raczej za tą drugą koncepcją. W wielu dobrze poznanych komórkach eukariotycznych powtarza się zestaw pięciu głównych frakcji histonowych: F1 (H1), F2 (H2A), F2b (H2B), F3 (H3), F2a1 (H4). W niektórych komórkach mogą występować inne frakcje histonowe, np. w erytrocytach ptasich znajduje się lizyno-bogaty, tkankowo-specyficzny histon F2c (H5).

Mała różnorodność histonów i ilości prawie równoważne wagowo w stosunku do DNA stanowią poparcie dla tezy o ich raczej strukturalnym

znaczeniu. Wybitnie konserwatywna struktura (mała zmienność sekwencji aminokwasów w toku ewolucji), zwłaszcza odnosząca się do histonów H3 i H4, każe sądzić, że każdy aminokwas w łańcuchach tych białek ma istotne znaczenie dla ich funkcji. Są to więc funkcje o uniwersalnym znaczeniu dla komórek eukariotycznych i dotyczą — jak wolno wnioskować — tworzenia, zachowania i kontroli struktury chromosomów w ciągu życia komórki.

Porównanie obrazów dyfrakcyjnych promieni X chromatyny natywnej i rekonstruowanej z DNA i mieszaniny pięciu oczyszczonych frakcji histonowych wskazuje wyraźnie na ich wzajemne podobieństwo. Usunięcie z kompleksu histonu H1 nie zmienia charakterystycznego obrazu dyfrakcji promieni X (32, 33, 34) podobnie zresztą jak histonu H5 (F2c) z chromatyny erytrocytów kurczęcia (33). Wydaje się, że H1 nie bierze bezpośrednio udziału w tworzeniu podstawowej struktury chromatyny, jakkolwiek na pewno obecność pięciu frakcji wpływa na przestrzenne upakowanie chromosomu. Ekstrakcja wszystkich histonów z wyjątkiem histonu H1 prowadzi natomiast do całkowitej utraty struktury podstawowej. Te obserwacje przemawiają za inną rolą histonu H1 w chromosomie (np. w kontrakcji, kurczeniu żelu chromatynowego) (35).

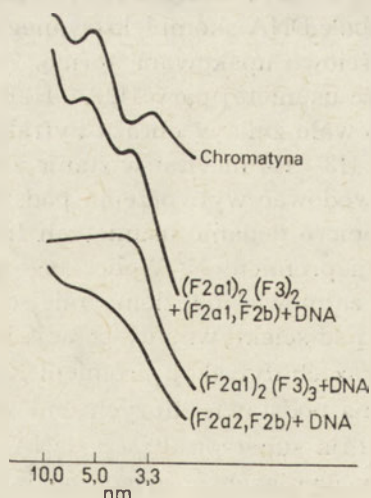
Z badań nad rekonstrukcją chromatyny i selektywną dysocjacją poszczególnych frakcji histonowych z chromatyny, śledzonych przy użyciu dyfrakcji i niskokątowego rozpraszania promieni X wynika, że wszystkie cztery frakcje histonowe (poza H1) są jednakowo ważne w tworzeniu podstawowej struktury. Kompleksy DNA z parami histonów H2A—H2B i H2B—H3 nie wykazywały cech charakterystycznych dla widma natywnej chromatyny (36), podobnie jak kompleksy z H2A, H3, H4 lub H2A, H3 ze śladami H4. Po selektywnym usunięciu H2A i H2B (36) pojawia się rozciągnięta forma DNA obok DNA skompleksowanego z histonami H3 i H4 zachowującego swą częściowo upakowaną formę. Zwiększenie ilości pary histonów H3 i H4 o ilość usuniętej pary H2A—H2B do stosunku histony/DNA = 1:1, nie powodowało zmiany obrazu dyfrakcji promieni X, wskazując, że para histonów H3—H4 nie jest w stanie zastąpić usuniętych histonów H2A, H2B i spowodować wytworzenia podstawowej struktury natywnej chromatyny. Dopiero dodanie usuniętych frakcji przywraca właściwe spektrum dyfrakcji promieni X. Wobec tego pary histonów H2A—H2B i H3—H4 muszą zajmować oddzielne miejsca na cząsteczce DNA. W toku dalszych badań nad selektywną dysocjacją histonów z chromatyny i śledzeniu zmian w obrazach dyfrakcji promieni X, Skidmore i wsp. (34) otrzymali wyniki, na podstawie których wnioskowali, że tylko obecność histonu H4 wywołuje superspiralizację DNA. Dane te nie znalazły jednak potwierdzenia w wynikach doświadczeń innych badaczy.

Warto zanotować, że dodanie histonu całkowitego (mieszaniny pięciu głównych frakcji histonowych) z grasicy cielejącej do DNA z faga lambda

czy T7, tworzy struktury dające takie same obrazy dyfrakcji promieni X jak natywna chromatyna z grasicy cielejącej (36, 37).

Dalsze badania biochemiczne przyniosły nowe dane o oddziaływaniu histon—histon i histon—DNA. Śledząc wzajemne interakcje histonów w roztworach, zauważono mianowicie ich tendencję do tworzenia dużych agregatów (rzędu 10^6) (38, 39). Energie niektórych oddziaływań między histonami są ogromne jak np. histonów H3 i H4. Powstawanie wysokocząsteczkowych agregatów histonowych stwierdzono także podczas preparowania ich dotychczasowymi, raczej drastycznymi metodami, jak ekstrakcja kwasem, frakcjonowanie przez strącanie etanolem i acetonem, czy strącanie chlorkiem guanidyny. Zastosowanie łagodnej metody otrzymania histonu całkowitego i frakcjonowanie go na kolumnie z Sephadex G-100 (40) pozwoliło na otrzymanie dwóch frakcji histonów: H1, H3, H4 i H2A, H2B — prawie równoważnych wagowo (41). Po wytrąceniu czystej frakcji H1, badano przy pomocy sieciowania (*cross-linking*) i sedymentacji wzajemne stosunki ilościowe w poszczególnych parach histonów H3, H4 i H2A, H2B. Ciężar cząsteczkowy produktów reakcji sieciowania histonów H3 i H4 wyznaczony przez kalibrację do odpowiednich wzorców wewnętrznych w trakcie elektroforezy na żelu poliakryloamidowym z dodatkiem SDS oraz wyznaczony ze współczynników sedymentacji wyniósł 53 900. Z teoretycznych obliczeń wynika, że taką masę cząsteczkową posiada kompleks dwóch cząsteczek histonu H3 z dwiema cząsteczkami histonu H4. Histony H3 i H4 występują więc w kompleksie tetramerowym o wzorze sumarycznym $(H3)_2(H4)_2$ (41). Histony preparowane metodami konwencjonalnymi były zdolne do utworzenia tetrameru tylko w 20%.

Nie wykazano podobnych regularności badając drugą frakcję histonów: H2A, H2B. W doświadczeniach sieciowania uzyskano produkty tworzące



Ryc. 1. Obraz dyfrakcji promieni X natywnej chromatyny i zrekonstruowanej z różnych rodzajów histonów i DNA (32).

mono-, di-, tri- aż do heptamerów histonów. Kornberg (41) przyjmuje, że histony te tworzą krótkie łańcuchy, typu $(-H2A, H2B)_n$ lub $(-H2A, H2A, H2B, H2B-)_n$ poprzez odwracalną polimeryzację. Porównanie obrazów dyfrakcji promieni X natywnej chromatyny z obrazami dyfrakcyjnymi chromatyny rekonstruowanej z tetrameru $(H3)_2(H4)_2$, oligomeru H2A—H2B oraz DNA wykazuje ich wyraźne podobieństwo (Ryc. 1). Jest to jednocześnie przekonujący argument za istnieniem tetrameru w jądrze komórkowym.

II-2. Model Kornberga

Na podstawie wyżej przedstawionych danych wynikających z obrazu chromatyny w mikroskopie elektronowym, z trawienia chromatyny nukleazami, z dyfrakcji promieni X oraz na podstawie danych dotyczących wzajemnych interakcji histon—histon i histon—DNA, Kornberg (30) zaproponował model struktury chromatyny, w którym włókno chromatynowe jest przedstawione jako łańcuch globularnych, powtarzających się podjednostek. Połączenie podjednostek nadawać ma chromosomom elastyczność niezbędną przy zmianie konformacji umożliwiającej zachodzenie replikacji czy transkrypcji. Każda podjednostka składać się ma z rdzenia histonowego utworzonego przez tetramer $(H3)_2(H4)_2$. Obecność takiego tetrameru w powtarzającej się podjednostce autor uważa za powszechną w komórkach eukariotycznych, ze względu na niezwykłą konserwatywność sekwencji aminokwasowych obu tych rodzajów histonów. Według modelu Kornberga histony H2A, H2B wyznaczają odległość pomiędzy poszczególnymi tetramerami wzdłuż włókna chromatyny. Długość odcinka DNA zabezpieczonego przez tetramer odpowiada długości 200 par zasad a długość łączącego DNA wyznacza oligomer H2A, H2B. DNA w rdzeniu histonowym jest ściśle upakowany, podczas gdy łączący DNA przyjmuje bardziej rozciągniętą formę.

Nie udało się jeszcze wyjaśnić, czy nie DNA przebiega wewnątrz rdzenia histonowego, czy też go oplata. Kornberg w swoim modelu przyjął początkowo za Pardonem i Wilkinsem (7), że DNA jest otoczony białkami. Mirzabekow i Mielnikowa (42), badając dostępność DNA w chromatynie przy pomocy metylowania trytowanym dwumetylosiarczanem stwierdzili, że metylacji ulega N-7 guaniny znajdującej się w głównym rowku DNA, N-3 adeniny znajdującej się w mniejszym rowku DNA i N-1 adeniny dostępnej tylko w jednoniciowym DNA. Wyniki te sugerują, że zasady nukleotydowe zawarte w mniejszym rowku DNA są w pełni dostępne dla metylecji a zawarte w większym są jedynie częściowo chronione przez histony. Łatwy dostęp czynnika metylującego do obu rowków DNA sugeruje, że DNA być może jest nawinięty na rdzeń histonowy.

II-3. Współczesne modele podjednostki chromatyny

Koncepcja Kornberga była pierwszą próbą logicznego powiązania faktów wynikłych z badań struktury chromatyny. Model Kornberga opierał się na założeniu, że cały DNA pozostaje w kompleksie z histonami. W przeciwieństwie do pierwotnej koncepcji Kornberga w przedstawionym równoległym modelu według *van Holda* (31) podjednostka chromatyny zawiera 140-nukleotydowy odcinek DNA (o masie cząsteczkowej 87 000) nawinięty na rdzeń histonowy oraz 40-nukleotydowy odcinek DNA łączący nukleosomy pozbawiony białka i wrażliwy na działanie nukleaz. Ta hipoteza pozostaje w zgodzie z zaobserwowanym przez *Clarka i Felsena* (14) naprzemiennym ułożeniem odcinków DNA bogatych w białko i pozbawionych białka. Według modelu Kornberga cały DNA miał być pokryty histonami H2A, H2B, H3 i H4, nie było więc miejsca na przyłączenie histonu H1, a jak wiadomo, histon H1 oddziałuje bezpośrednio z DNA (35, 43, 44). W koncepcji Kornberga nie wyjaśniona pozostawała także ilość DNA przypadająca na nukleosom. Według współczesnych modeli podjednostki chromatyny rdzeń histonowy tworzy kompleks złożony z ośmiu cząsteczek histonów: 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 i 2 H4, na który zależnie od organizmu nawinięty jest DNA o długości od 140 do 200 par zasad. Odcinek DNA łączący podjednostki zawiera miejsca wiązania histonu H1 i być może, niektórych białek niehistonowych (24, 28, 31). Potwierdzeniem słuszności modelu *van Holda* było otrzymanie przez zespół *Georgieva* nukleosomów w postaci krystalicznej, które zawierały DNA o długości 140 par zasad (45).

II-4. Struktura nukleosomu

Analiza sekwencji aminokwasowych czterech głównych typów histonów wykazała znaczną asymetrię w rozłożeniu ładunków elektrycznych wzdłuż włókna polipeptydowego. N-końcowy segment histonów H2A, H2B, H3, H4 zawiera znaczną liczbę aminokwasów zasadowych oraz aminokwasów destabilizujących strukturę helikalną jak prolina, lizyna, arginina, glicyna, seryna czy metionina. Natomiast C-końcowy obszar histonów H3 i H4 oraz środkowy region H2A i H2B zawierają wiele aminokwasów apolarnych i aminokwasów sprzyjających tworzeniu heliksu jak walina, leucyna, amidy kwasu glutaminowego i asparaginowego czy fenyloalanina. Przypuszczano, że obszary apolarne są miejscami oddziaływań między cząsteczkami histonów, podczas gdy segmenty zasadowe służą jako miejsca interakcji histon—DNA. Silna interakcja między parami histonów H2A i H2B oraz H2B i H4 prowadząca do utworzenia dimerów (46), podobnie jak i występowanie tetrameru $(H3)_2(H4)_2$ (41), potwierdzają słuszność takiego rozumowania. Badania *Bradbury'ego* (43) przy zastosowaniu techniki

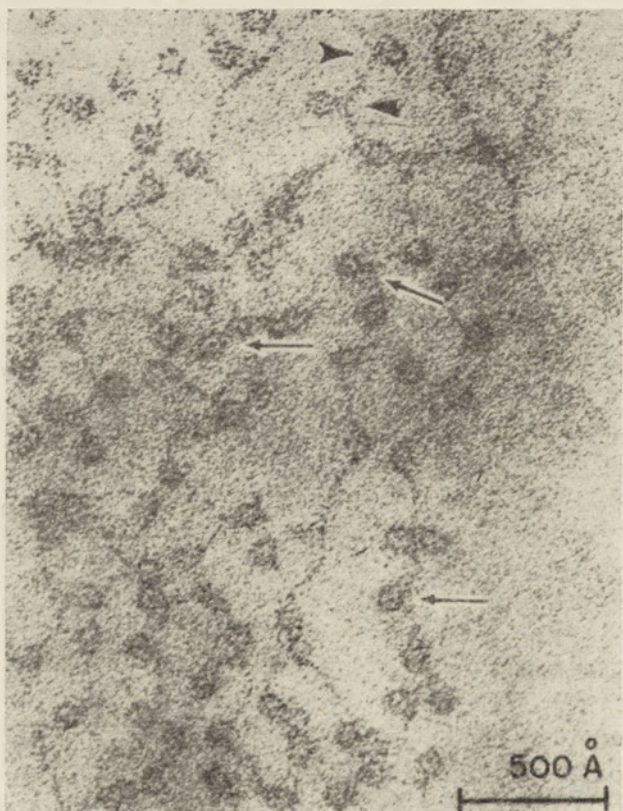
jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) oraz rozpraszania neutronowego, poparły hipotezę o wzajemnych oddziaływaniach obszarów apolarnych w histonach, potwierdzając jednocześnie, że międzycząsteczkowe interakcje histonów H2A i H2B oraz H3 i H4 prowadzą do specyficznego, precyzyjnego dopasowania się tych białek. Zasadowe, wolne ramiona specyficznych kompleksów wyżej wymienionych par histonów służą jako pierwszorzędowe miejsca wiązania DNA. Podobne wnioski wysnuć można z prac *Weintrauba i van Lente* (18, 47) nad trawieniem chromatyny trypsyną, z których wynika, że tylko niewielka część białek obecnych w chromatynie ulega trawieniu. Szczegółowa analiza wykazała, że całkowitej degradacji ulega histon H1 (H5 w przypadku erytrocytów kurzych) i tylko 20—30-aminokwasowe odcinki z zasadowych, N-końców cząsteczek histonów H3, H4, H2A i prawdopodobnie H2B. Pozostałe odcinki cząsteczek histonów są odporne na działanie proteolityczne. Wynika stąd, że histony łączą się ze sobą C-końcami cząsteczek i że te odcinki ochraniają inny obszar DNA (około 80-nukleotydu) niż N-końce histonów. Utrata 20—30 aminokwasów z N-końców cząsteczek powoduje znaczny spadek stałych sedymentacji podjednostek nukleosomowych z 11S do 5S, podczas gdy masa cząsteczkowa obniża się tylko z 176 000 do 158 000. Przypuszcza się więc, że tak znaczny spadek wartości stałej sedymentacji bez towarzyszącego spadku masy cząsteczkowej wynika ze zmian konformacji nukleosomu. Zasadowe fragmenty N-końców histonów mają więc istotny wpływ na upakowanie DNA na rdzeniu białkowym.

II-5. Rodzaje nukleosomów

Najnowsze zdjęcia ciałek „v” z pod mikroskopu elektronowego ujawniły ich morfologiczne zróżnicowanie. Wykazano znaczne odchylenia w położeniu niektórych nukleosomów w stosunku do nici łączącego DNA. Około 50% ciałek „v” jest bocznie połączona z DNA (Ryc. 2). Stwierdzono również w wielu nukleosomach centralnie położoną plamę o szerokości około 15 Å odpowiadającą prawdopodobnie otworowi wewnątrz ciała „v” (27, 45) (rys. 2).

Pojawiły się także prace mówiące o zróżnicowaniu nukleosomów pod względem składu histonów. Grupa *Georgieva* (45) wyizolowała i oczyściła przez ultrawierowanie w gradiencie sacharozy oraz elektroforezę w żelu poliakryloamidowym, dwa rodzaje monosomów (monomeryczne nukleosomy) cięższych i lżejszych oraz trzy rodzaje disomów. Cięższe monosomy, poruszające się wolniej w elektroforezie w żelu poliakryloamidowym, zawierały wszystkie główne typy histonów łącznie z histonem H1 oraz 200 nukleotydu odcinek DNA, podczas gdy lżejsze monosomy szybko migrujące w żelu poliakryloamidowym nie zawierały histonu H1 i składały się z odcinka DNA o długości 170 par zasad. Porównując zawartość histo-

nu H1 w dimerach nukleosomów stwierdzono występowanie w nich dwu lub jednej cząsteczki H1 lub w ogóle brak tego histonu. Autorzy przypuszczają, że histon H1 wiąże się z krótkim 30-nukleotydomowym odcinkiem nukleosomalnego DNA. Odcinek ten może być usunięty jako kompleks H1—DNA nie zmieniając podstawowej struktury chromatyny.



Ryc. 2. Koralkopodobny obraz włókien chromatyny jąder erytrocytów kurczych w mikroskopie elektronowym.

Strzałki wskazują ciała „v” z centralnie położoną plamą barwnika (octan uranylu). Główki strzałek wskazują ciała „v” bocznie połączone z nicią DNA (81).

II-6. Rola histonu H1*)

Histon H1 nie bierze bezpośredniego udziału w tworzeniu podstawowej jednostki strukturalnej chromatyny i w modelach nukleosomów jest umieszczany poza globularną cząstką. Wiele danych wskazuje, że histon H1 odgrywa rolę w kondensacji chromatyny oraz wywołanej przez roz-

*) Bardziej szczegółowe informacje na temat roli histonu H1 znajdzie Czytelnik w artykule A. Niedźwiedzkiej i A. Kalińskiego, *Post. Biochem.*, **23** (2) str. 175—188.

twory soli mineralnych kontrakcji żelu chromatynowego (35, 43, 48). Jak zauważono rozpuszczalność chromatyny w roztworach wodnych soli spada osiągając minimum między 0,1 a 0,2 M NaCl (lub HCl oraz w zakresie od 2—100 mmoli/l $MgCl_2$, $CaCl_2$, lub $MnCl_2$). Przy stężeniu 0,15 M NaCl żel chromatynowy kurczy się osiągając 10% swojej początkowej objętości. W roztworach o niskich siłach jonowych cząsteczka H1 pozostaje w ścisłym kompleksie z chromatyną. Przy wzroście siły jonowej wysoko zasadowe odcinki N-końcowe i C-końcowe histonu H1 pozostają związane z DNA, podczas gdy pozostałe obszary cząsteczki stają się wolne. Przy 0,15 M NaCl następuje konformacyjna zmiana dotycząca jedynie apolarnego, centralnego obszaru cząsteczki H1 między 76 a 106 aminokwasem, która powoduje powstanie ścisłego połączenia między dwoma cząsteczkami histonu H1 bez przerywania wiązania z DNA, co wywołuje kontrakcję żelu chromatynowego. Stwierdzono również, że zmiany ufosforylowania cząsteczki H1 wiążą się z kondensacją chromatyny, na co wskazują następujące fakty: (a) w późnej fazie G_2 , tuż przed mitozą, wzrasta ilość ufosforylowanego histonu H1, (b) w roztworach o niskiej sile jonowej (0,05 M NaCl) ufosforylowany histon H1 ma zdolność kurczenia żelu chromatynowego (43, 48).

Powyższe fakty wskazują, że rola histonów w chromatynie dotyczy przede wszystkim zmian kondensacji, „upakowania” nici DNA w jądrze komórkowym. DNA w kompleksie z oktamerem histonowym w nukleosomie jest siedmiokrotnie krótszy od długości wolnego DNA (11, 23). Obecność zaś histonu H1 w kompleksie prowadzi do kondensacji włókna chromatynowego złożonego z szeregu nukleosomów (49). Atrakcyjność modelu podjednostkowego chromatyny polega również na tym, że odcinki zasadowe histonów oddziaływające z DNA są jednocześnie miejscami preferencyjnie modyfikowanymi chemicznie (metylowanymi, fosforylowanymi, acetylowanymi). Ponieważ cały DNA komórki jest wiązany tylko przez pięć rodzajów histonów — to chemiczna modyfikacja którejkolwiek z frakcji histonów może w decydujący sposób wpłynąć na interakcję z DNA w całym genomie lub jego części. Tego rodzaju modyfikacje mogą stanowić mechanizm kontroli struktury chromatyny w ciągu życia komórki (43).

II-7. Rola białek niehistonowych

Białka niehistonowe i ich udział w funkcji chromatyny był przedmiotem wielu prac przeglądowych (50, 51, 52, 53). Jednakże niewiele wiadomo o udziale tych białek w strukturze chromatyny. Białka niehistonowe są grupą białek ściśle związanych z chromosomami eukariotów cechującą się wybitną heterogennością (54, 55, 56). Definiuje się je jako te białka, które po ekstrakcji histonów z oczyszczonej chromatyny izolują się razem z DNA.

Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym wykazuje obecność od 20 do 115 frakcji w zależności od źródła z jakiego izolowano te białka i od czułości metody rozdzielczej. Masa cząsteczkowa poszczególnych polipeptydów waha się w granicach od 10 000 do 100 000 (56, 55). Heterogenność i tkankowa specyficzność białek niehistonowych czyniła nieprawdopodobnym, by białka te kandydowały do roli białek strukturalnych chromatyny. Porównania profilów chromatograficznych i elektroforetycznych białek niehistonowych z tkanek różnych zwierząt wykazało przede wszystkim różnice ilościowe (50, 57, 58). 50—70% całości białek niehistonowych występuje powszechnie (50, 57, 58). Wynika stąd, że białka te mogą spełniać rolę strukturalną w chromatynie lub pośrednio uczestniczyć w jej przekształceniach ze stanu skondensowanego (jak w mitozie) do rozluźnionego (chromatyna interfazowa).

Jedną z głównych frakcji białek niehistonowych stanowią białka bogate w lizynę (59, 60). Budową przypominają one histony lecz ujemny ładunek cząsteczki wskazuje, że są to białka niehistonowe. Badania interakcji między tą grupą białek (oznaczanych przez autorów jako HMG 1 i 2) a DNA, śledzonych przy użyciu jądrowego rezonansu magnetycznego (61) wykazały, że w roztworach o niskich siłach jonowych zasadowa część cząsteczki bogata w lizynę i zawierająca wszystkie aminokwasy aromatyczne wiąże się bezpośrednio z DNA, podczas gdy kwaśny odcinek łańcucha pozostaje wolny i może reagować z innymi białkami. Ich powiązanie z DNA w małym stopniu hamuje transkrypcję *in vitro*, w przeciwieństwie do histonów, których wiązanie do DNA uniemożliwia inicjację transkrypcji. Białka te nie wykazują specyficzności ani tkankowej ani gatunkowej a ich ilość (10^4 — 10^5 cząsteczek na jądro) potwierdza przypuszczenie, że większość z nich jest zaangażowana w utrzymywanie podstawowej struktury chromatyny (59, 60).

Podobnie jak w przypadku histonów rola strukturalna białek niehistonowych mogłaby dotyczyć ich wpływu na konformację cząsteczki DNA. Jednakże kompleksowanie białek niehistonowych z DNA *in vitro* tylko w nikłym stopniu zmienia przestrzenne ułożenie cząsteczek DNA. Stwierdzono natomiast, że wydzielone spośród białek niehistonowych białka o masie cząsteczkowej 70 000 i 55 000 mają istotny wpływ na konformację DNA (62). Po usunięciu histonów i większości białek niehistonowych z chromatyny DNA zachowywał superspiralizację i pofałdowanie jeżeli pozostawał nadal w kompleksie z białkami 70 000 i 55 000 daltonów. Autorzy przypuszczają więc, że obok rdzenia histonowego w globularnej podjednostce chromatyny białka niehistonowe mogą być również odpowiedzialne za upakowanie cząsteczki DNA.

Białka niehistonowe mogą także pośrednio uczestniczyć w przekształceniach stanu „upakowania” DNA. Oddziałując z histonami lub chemicznie je modyfikując, zmieniają interakcję histony —DNA (63) tak, jak

ma to miejsce np. w przypadku fosforylacji histonu H1. Należy zaznaczyć, że enzymy metabolizmu histonów, w tym również fosfokinazy histonowe, należą do białek niehistonowych. W podobny sposób działają kurczliwe białka chromatyny zidentyfikowane niedawno jako aktyna i miozyna wśród głównych frakcji białek niehistonowych jąder wątroby szczura (58), grascicy cielęcej (64), komórek HeLa S₃ (65) i *Physarum polycephalum* (57). Białka te mają zdolność przekształcania chromatyny w heterochromatynę (chromatynę skondensowaną, nieaktywną matrycowo), gdyż stwierdzono kilkakrotny wzrost zawartości aktyny i miozyny w skondensowanych chromosomach metafazowych w porównaniu z chromatyną interfazową (57, 65). Z powodu ich obecności w heterochromatynie początkowo sądzono, że spełniają one rolę negatywnych regulatorów aktywności genetycznej. Ponieważ białka te występują w liczbie $3,7 \times 10^5$ — $1,2 \times 10^6$ cząsteczek na jądro (57), wydaje się nieprawdopodobne, by regulowały aktywność genetyczną przez specyficzne wiązanie z DNA, lecz raczej przez spowodowanie takiej zmiany w strukturze (kondensacja) która inaktywuje chromatynę.

Obok głównych, powszechnie występujących frakcji białek niehistonowych, istnieje niewielka ich część, która wykazuje cechy specyficzności tkankowej (54, 66) oraz wysokiego powinowactwa do DNA (67, 68). Białka tej ostatniej grupy można znaleźć frakcjonując całość białek niehistonowych na kolumnach z DNA-celulozy (69, 70). Około 70% całości białek nie wiąże się ze złożem DNA-celulozy, 25% białek zostaje zatrzymana na kolumnie. Lecz 2% białek niehistonowych łączy się tylko z sekwencjami homologicznego DNA. Ta 2% frakcja zawiera białka preferencyjnie wiążące się z średnio-często powtarzającymi się (71) i unikalnymi sekwencjami DNA (53). Jak się wydaje białka te mają raczej funkcje regulatorowe niż strukturalne w chromatynie.

Od dawna istnieje pogląd, że część białek niehistonowych jest włączona w specyficzną regulację w chromosomach eukariotów (53, 72). Regulacja ta dotyczy przede wszystkim pozytywnej i negatywnej kontroli transkrypcji (52, 73, 74, 75, 76, 77).

Z badań nad dostępnością DNA dla metylacji wynika, że białka niehistonowe nie chronią ani mniejszego ani większego rowka heliksu DNA, ponieważ ich usunięcie z chromatyny nie wywołuje zmian w metylacji chromatynowego DNA. Wydaje się, że większość z nich nie oddziałuje bezpośrednio z DNA (42).

Białka niehistonowe bez wątpienia odgrywają strukturalną, enzymatyczną i regulacyjną rolę w procesie aktywności genetycznej. Wskazuje na to wyższa proporcja białek niehistonowych w aktywnej matrycowo części genomu w stosunku do nieaktywnej (71), ich synteza w specyficznych czasach w cyklu komórkowym (78), a przede wszystkim fakt, że w ich obecności następuje przekształcenie struktury chromatyny w postać skondensowaną lub rozluźnioną.

III. Uwagi końcowe

W modelu „koraliowej” struktury chromatyny występuje naprzemienne ułożenie odcinków DNA bogatych i ubogich w białko. Powstaje pytanie, czy globularne cząstki zawierają specyficzne sekwencje zasad, czy też rozmieszczenie tych sekwencji w obu elementach (nukleosomie i odcinku łączącym) jest przypadkowe? Istnieją dane na temat preferencyjnego łączenia się histonów z określonymi sekwencjami DNA np. histon arginino-bogaty z frakcją G+C DNA (79) czy histon H1 z frakcją A+T DNA (80). Jak wykazano ostatnio (81) histony w roztworach o niskich siłach jonowych mogą wykazywać specyficzność w stosunku do pewnych sekwencji DNA, która jednak zanika przy wyższych siłach jonowych. Do niedawna uważano, że kompleksy DNA—histony blokowały dostęp do matrycy polimerazie RNA zależnej od DNA co uniemożliwiało transkrypcję (82, 83, 84). Jednakże oktamer histonowy w nukleosomie nie blokuje transkrypcji nukleosomalnego DNA. Porównania kinetyki hybrydyzacji DNA komplementarnego do cytoplazmatycznego poli (A)-RNA z DNA wyizolowanym z podjednostek chromatyny lub DNA wyizolowanym bezpośrednio z jąder wykazało, że większość sekwencji powtarzających się i unikalnych mRNA jest obecna w nukleosomalnym DNA (85, 86). Wobec tego włączenie DNA w podjednostkę chromatyny nie zapobiega jego transkrypcji (86). Badania transkrypcji podjednostek chromatyny ludzkich limfocytów przez polimerazę RNA zależną od DNA z *E. coli*, potwierdziły, że kompleks DNA-oktamer histonowy zachowuje aktywność matrycową w 22% w porównaniu z nukleosomalnym DNA pozbawionym histonów. Z drugiej strony, nukleosomalny DNA nie zawiera specyficznych sekwencji nukleotydowych, gdyż DNA komplementarny do cytoplazmatycznego, informacyjnego poli(A)-RNA zsyntetyzowany przez odwrotną transkryptazę (cDNA) hybryduje w tym samym stopniu z nukleosomalnym DNA jak i z całkowitym jądrowym DNA, a także ponieważ nie stwierdzono występowania którejkolwiek z klas sekwencji DNA (powtarzających się lub unikalnych) ze zwiększoną częstotliwością w nukleosomalnym DNA. Powyższe dane pozwalają na wytworzenie dynamicznego obrazu struktury chromatyny, w której sekwencja DNA przypadająca na nukleosom nie jest ściśle ustalona i zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego komórki występując albo w nukleosomie albo też w odcinku łączącym nukleosomy.

Artykuł nadszedł 7.6.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 22.12.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Ris H., (1969) w Handbook of Molecular Cytology red. Lima de Faria str. 221—249, North-Holland Publ. Comp. Amsterdam—London.
2. Ris H., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 7—23.
3. Olszewska M. J., (1974) *Post. Biol. Kom.*, **1**, 1—13.

4. Bram S., Ris H., (1971) *J. Mol. Biol.*, **55**, 325—336.
5. Bram S., Ris H., (1972), *Biochemie*, **54**, 1005—1011.
6. Ris H., Kubai D. F., (1970) *Ann. Rev. Genet.*, **4**, 263—294.
7. Pardon J. F., Wilkins M. H. F., (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 115—124.
8. Olins A. L., Olins D. E., (1973) *J. Cell. Biol.*, **59**, 252a
9. Olins A. L., Olins D. E., (1974) *Science*, **183**, 330—332.
10. Langmore J. P., Wooley J. C., (1974) *J. Cell. Biol.*, **63**, 185a.
11. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P., (1975) *Cell*, **4**, 281.
12. Van Holde H. E., Sahasrabuddhe C. G., Shaw Ramsay B., Van Bruggen E. F. J., Arnberg A., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1365—1370.
13. Ramsay Shaw B., Corden J. L., Sahasrabuddhe C. G. Van Holde K. E., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1193—1198.
14. Clark R. J., Felsenfeld G., (1971) *Nature New Biology*, **229**, 101—106.
15. Hewish D., Burgoyne L., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 504—510.
16. Noll M., (1974) *Nature*, **251**, 249—252.
17. Axel R., Melchior W., Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4101—4105.
18. Weintraub H., Van Lente F., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 291—307.
19. Van Holde K. E., Ramsay Shaw B., Lohr D., Herman T. M., Kovacic R. T., (1975) *FEBS-Proceedings of the Tenth Meeting, Paris*, **38**, 57—72.
20. Burgoyne L., Hewish D., Mobbs J., (1974) *Biochem. J.* **143**, 67—72.
21. Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1975) *Biochemistry*, **14**, 2915—2920.
22. Axel R., (1975) *Biochemistry*, **14**, 2921—2925.
23. Griffith J., (1975) *Science* **187**, 1202—1206.
24. Newmark P., (1976) **261**, 544—545.
25. Sahasrabuddhe C. G., Van Holde K. E., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 152—156.
26. Senior M. B., Olins A. L., Olins D. E., (1975) *Science*, **187**, 173—175.
27. Olins A. L., Olins D. E., Senior M. B., (1976) *J. Cell. Biol.*, **68**, 787—792.
28. Baldwin J. P., Boseley P. G., Bradbury E. M., Ibel K., (1975) *Nature*, **253**, 245—249.
29. Boseley P. G., Bradbury E. M., Butler-Browne G. S., Carpenter B. G., Stephens R. M., (1976) *Eur. J. Biochem.*, **62**, 21—31.
30. Kornberg R. D., (1974) *Science*, **184**, 868—871.
31. Van Holde K. E., Sahasrabuddhe C. G., Ramsay Shaw B., (1974) *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1597.
32. Murray K., Bradbury E. M., Crane-Robinson C., Stephens R. M., Haydon A. J., Peacocke A. R., (1970) *Biochem. J.*, **120**, 859—871.
33. Bradbury E. M., Molgaard H. V., Stephens R. M., Johns E. W., Bolund Z. A., (1972) *Eur. J. Biochem.*, **31**, 474—482.
34. Skidmore C., Walker I. O., Pardon J. R., Richards B. M., (1973) *FEBS Letters*, **32**, 175.
35. Bradbury E. M., and The Biophysic Group (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 131—148.
36. Bolund L. A., Johns E. W., (1973) *Eur. J. Biochem.*, **35**, 546—553.
- 36a. Garret R. A., (1968) *J. Mol. Biol.*, **38**, 244—247.
37. Baldwin J. P., Bradbury E. M., Butler-Browne G. S., Stephens R. M., (1973) *FEBS Letters*, **34**, 133.
38. Edwards P. A., Schooter K. V., (1969) *Biochem. J.*, **114**, 227—235.
39. Barclay A. B., Eason R., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 37—46.

40. Van der Westhuyzen D. R., von Holt C., (1971) *FEBS Letters* 14, 333.
41. Kornberg R. D., Thomas J. O., (1974) *Science*, **184**, 865—868.
42. Mirzabekow A., Melnikova K., (1974) *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 379—384.
43. Bradbury E. M., (1975) FEBS-Proceedings of the Tenth Meeting, Paris 1975, **38**, 81—92.
44. Bradbury E. M., Danby S. E., Chapman G. E., Rattle N. W. E., (1975) *Eur. J. Biochem.*, **52**, 605—613.
45. Georgiev G. P., Samarina O. P., Ryskov A. P., Varshavsky A. J., Ilyin Yu., (1975) FEBS-Proceedings of the Tenth Meeting, Paris 1975, **38**, 101—124.
46. D'Anna J. A. Jr., Isenberg I., (1974) *Biochemistry*, **13**, 4992—4997.
47. Weintraub H., Van Lente F., (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4249—4253.
48. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W., (1973) *Nature*, **241**, 123—130.
49. Barrett T., (1976) *Nature*, **260**, 576—578.
50. Kiliańska Z., Kłyszczko-Stefanowicz L., (1973) *Post. Biochem.*, **19**, 533—557.
51. Kłyszczko-Stefanowicz E., Polanowska Z., (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 601—628.
52. Paul J., Gilmour R. S., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 181—192.
53. Allfrey U. G., Inoue A., Karn J., Johnson E. M., Good R. A., Hadden J. W., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 199—219.
54. Shelton K. R., Neelin J. M., (1971) *Biochemistry*, **10**, 2342—2348.
55. Elgin S. C. R., Bonner J., (1970) *Biochemistry*, **9**, 4440—4447.
56. Mac Gilliuray A. J., Rickwood D., (1974) *Eur. J. Biochem.*, **41**, 181—190.
57. LeSturgeon W. M., Forer A., Yang Y. Z., Bertram J. S., Rush H. P., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 529—552.
58. Douvas A. S., Harrington Ch. A., Bonner J., (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3902—3906.
59. Johns E. W., Goodwin G. H., Walker J. M., Sanders C., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 95—107.
60. Shooter K. U., Goodwin G. H., Johns E. W., (1974) *Eur. J. Biochem.*, **47**, 263—270.
61. Cary P. D., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., Jauaherian K., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976) *Eur. J. Biochem.*, **62**,
62. Ide T., Nakane M., Anzai K., Andoh T., (1975) *Nature*, **258**, 445—446.
63. Tashiro T., Kurokawa M., (1975) *Eur. J. Biochem.*, **60**, 569—572.
64. Ohnishi T., Kanamura H., Yamamoto T., (1964) *J. Biochem. (Tokyo)*, **56**, 6—15.
65. LeSturgeon W. M., Wray W., Rush H. P., (1973) *Exp. Cell. Res.* **79**, 487—492.
66. Wu F. C., Elgin S. C. R., Hood L. E., (1973) *Biochemistry*, **12**, 2792—2797.
67. Wakabayashi K., Wang S., Hnilica L. S., (1974) *Biochemistry*, **13**, 1027—1032.
68. Wakabayashi K., Hnilica L. S., (1973) *Nature New Biology*, **242**, 153—155.
69. Van den Broek M. W. J., Noorden L. D., Sevall J. S., Bonner J., (1973) *Biochemistry*, **12**, 229—236.
70. Kleinsmith L. J., Heidema J., Carroll A., (1970) *Nature*, **226**, 1025—1027.
71. Bonner J., (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 315—327.
72. Frenster J. N., (1965) *Nature*, **206**, 680—683.

73. Gilmour R. S., Paul J., (1969) *J. Mol. Biol.*, **40**, 137—139.
74. Kamiyama M., Wang T. Y., (1970) *Biochem. Biophys. Acta*, **228**, 563—576.
75. Kamiyama M., Dastugue B., Defer N., Kruh J., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 576—583.
76. Kostraba N. C., Wang T. Y., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 169—180.
77. Shea M., Kleinsmith L. J., (1973) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 473—477.
78. Borun T. N., Steins G. S., (1972) *J. Cell. Biol.*, **52**, 308—315.
79. Clark R. J., Felsenfeld G., (1972) *Nature New Biology*, **240**, 226—229.
80. Sponar J., Sormova Z., (1972) *Eur. J. Biochem.*, **29**, 99—103.
81. Steinmetz M., Sreeck R. E., Zachau H. G., (1975) *Nature*, **258**, 447—449.
82. Hoare T. A., Johns E. W., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **247**, 408—411.
83. Mirsky A., Silverman B., Panda N. C., (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3243—3246.
84. Silverman B., Mirsky A., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1326—1330.
85. Lacy J., Axel R., (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3978—3982.
86. Kuo M. T., Sahasrabudde C. G., Saunders G. F., (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1573—1575.

ALEKSANDRA NIEDŹWIECKA^{*)}, ANDRZEJ KALIŃSKI^{**)}

Rola histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny

Role of Histone H1 in the Structure and Function of Chromatin

Spis treści:

Wprowadzenie

- I. Właściwości wyizolowanej cząsteczki histonu H1 i w kompleksie nukleo-histonowym
- II. Oddziaływania między histonem H1 a pozostałymi składnikami chromatyny
- III. Rola strukturotwórcza histonu H1 w budowie chromatyny
- IV. Udział histonu H1 w regulacji cyklu komórkowego

Contents

Introduction

- I. Properties of isolated molecule of histone H1 and those in nucleohistone complex
- II. Interactions between histone H1 and other constituents of chromatin
- III. Structural role of histone H1 in chromatin
- IV. Role of histone H1 in the regulation of cell cycle

Jednym z aktualnych i szeroko dziś opracowywanych zagadnień pozostaje ustalenie współzależności między strukturą chromatyny a procesami, które powodują, że w komórce rozpoczyna się replikacja DNA prowadząca w rezultacie do podziału mitotycznego. Już od dawna, ze względu na silną asocjację histonów z DNA, przypisywano im dużą rolę (1). Obecnie nie uważa się już histonów za główne czynniki regulacji aktywności genowej, chociaż przypisuje im się funkcję niespecyficznych represorów aktywności matrycowej chromatyny (2, 3, 4). Wysoce konserwatywna struktura pierwszorzędowa histonów sugeruje, że białka te uczestniczą w procesach zachowanych w sposób niezmienny w toku ewolucji. Postuluje się, że histony są niezbędne do organizowania jądrowego DNA

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

w określone, periodycznie powtarzające się struktury i kontroli ich w czasie życia komórki (5, 6, 7, 8). Kontrola taka może być sprawowana drogą postsyntetycznych modyfikacji chemicznych tych białek, wpływając przez to na charakter ich oddziaływań z DNA.

Spośród pięciu histonów występujących w chromatynie komórek eukariotycznych szczególnie właściwości przedstawia histon H1. Wyróżnia się on wysoką mikroheterogennością, nietworzeniem kompleksów z pozostałymi histonami oraz odmiennym charakterem wiązania się z DNA. Właściwości te pozwalają na ujmowanie roli histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny niezależnie od innych histonów, których podobne zachowanie się w kompleksie nukleohistonowym sugeruje spełnianie zbliżonej roli w genomie eukariotycznym.

W ostatnich latach w *Postęпах Biochemii* opublikowano artykuły na temat występowania, budowy i metabolizmu histonów (5) oraz struktury nukleohistonu (6). Niniejszy artykuł poświęcono udziałowi histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny.

I. Właściwości wyizolowanej cząsteczki histonu H1 i w kompleksie nukleohistonowym

W odróżnieniu od wysoce konserwatywnej struktury pierwszorzędowej histonów: H4 (9, 10), H3 (11), H2A (12), H2B (13), w cząsteczce histonu H1 obserwowano duże różnice w sekwencji aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. Wykazano, że białko to posiada pewien stopień specyficzności tkankowej i gatunkowej (14). W cząsteczce histonu H1 znajduje się dużo lizyny (27⁰/0), alaniny (24⁰/0) i proliny (9⁰/0). Aminokwasy te stanowią około 60⁰/0 wszystkich aminokwasów w cząsteczce białka (5,14). Rozkład aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym histonu H1 różni się od charakterystycznego ich rozmieszczenia w pozostałych histonach. W histonach H2A, H2B, H3 i H4 obserwuje się grupowanie aminokwasów o charakterze zasadowym w N-końcowych odcinkach cząsteczki, zaś aminokwasów o charakterze hydrofobowym i hydroksyaminokwasów w ich C-końcowych fragmentach. Taki rozkład sprzyja powstawaniu, indukowanych przez sole nieorganiczne zmian konformacyjnych cząsteczki, polegających na zdolności do przyjmowania struktury α -heliksu w C-końcowych fragmentach łańcucha polipeptydowego (16—18). Natomiast rejon końca aminowego cząsteczek histonów, niezdolny do tworzenia takiej struktury jest przypuszczalnie miejscem połączenia histonów z DNA wiązaniami jonowymi (19).

Histon H1, w odróżnieniu od pozostałych histonów, posiada dwa zasadowe obszary: pierwszy — w rejonie N-końca zawierający 35 aminokwasów i drugi w C-końcowym fragmencie łańcucha polipeptydowego cząsteczki obejmujący 110 aminokwasów. Odcinek środkowy zawiera większość niepolarnych, kwaśnych i tylko dwie zasadowe reszty aminokwaso-

we. Fragmenty cząsteczki histonu H1 charakteryzujące się przewagą aminokwasów zasadowych mają małą zdolność do przyjmowania struktury α -heliksu. Sprzyja również temu fakt, że spośród 22 reszt proliny znajdujących się w cząsteczce 16 występuje w jej C-końcowym odcinku umożliwiając występowanie rozciągniętej konfiguracji tego fragmentu (15, 20, 21). Natomiast fragment środkowy cząsteczki (przypuszczalnie od 35 do 106 reszty aminokwasowej) może tworzyć strukturę globularną (22, 23). Ostatnie badania sugerują, że granica globularnej struktury w histonie H1 występuje pomiędzy 107 a 122 resztą aminokwasową (24). Wydaje się prawdopodobne, że rejony końca aminowego i karboksylowego cząsteczki biorą udział w połączeniu z DNA wiązaniami jonowymi (24), zaś środkowy fragment cząsteczki może brać udział w innego typu oddziaływaniach (17, 24, 25).

W roztworach wodnych cząsteczki histonu H1 nie wykazują tendencji do tworzenia agregatów z innymi histonami, podczas gdy pozostałe histony tworzą ze sobą specyficzne kompleksy (26—29).

Histon H1 wykazuje możliwości wzajemnych oddziaływań pomiędzy niepolarnymi fragmentami ich łańcuchów polipeptydowych (17, 25). Bradbury i wsp. (30) postulują szczególną rolę takich oddziaływań w procesie kondensacji i dekondensacji chromatyny. Inną cechą wyróżniającą histon H1 spośród pozostałych histonów jest jego wyraźnie inne zachowanie się w kompleksie nukleohistonowym. Pomimo posiadania najwyższego ładunku dodatniego, histon H1 najłatwiej oddysocjowuje z chromatyny pod wpływem roztworów soli czy też rozcieńczonych kwasów (25, 31, 32). Można go na przykład całkowicie usunąć z chromatyny stosując 0,6 M NaCl (25, 33) lub 0,1 M MgCl₂ (31), podczas gdy w tym stężeniu soli pozostałe histony pozostają związane w kompleksie. W roztworach detergentów jonowych, na przykład w dezoksycholanie sodu, histon ten oddysocjowuje jako ostatni z histonów, przy najwyższym stężeniu detergentu (34).

W związku z możliwością selektywnego oddysocjowania histonu H1 z chromatyny szczególną uwagę zwrócono na te właśnie fragmenty kompleksów nukleoproteidowych, z których usunięto to białko. Wpływ usunięcia histonu H1 z kompleksu nukleoproteidowego na właściwości fizykochemiczne nukleohistonu zostanie omówiony w rozdziale III poświęconym jego roli strukturotwórczej.

W chromatynie histon H1 jest białkiem najbardziej podatnym na degradację enzymami proteolitycznymi (35–37), co sugeruje jego najbardziej zewnętrzne, spośród histonów, ułożenie w nukleohistonie.

Wymienione wyżej właściwości wyizolowanej cząsteczki histonu H1, jak i różniące się od pozostałych histonów właściwości jej w kompleksie nukleohistonowym sugerują, że zarówno pod względem miejsca występowania jak i funkcji białko to zajmuje szczególną pozycję w chromatynie.

II. Oddziaływania między histonem H1 a pozostałymi składnikami chromatyny

Zasadniczymi oddziaływaniami między histonami a DNA są wiązania jonowe grup zasadowych aminokwasów: lizyny, argininy, histydyny z resztami fosforanowymi DNA. Oprócz nich stwierdzono także występowanie oddziaływań hydrofobowych między histonami a DNA (38, 39), a także i między samymi cząsteczkami histonów (40, 41). Badania wpływu detergentów (42), roztworów mocznika (38, 39), czy też temperatury (38) na przebieg oddysocjowywania histonów z chromatyny wykazują, że różny jest udział poszczególnych oddziaływań w kompleksie nukleohistonowym. I tak stwierdzono na przykład (42), że zniesienie wszystkich oddziaływań hydrofobowych w chromatynie przez dodatek niejonowego detergentu (np. Tritonu X-100) prowadzi do wzrostu ilości oddysocjowanych histonów przy niższej sile jonowej roztworu oraz do zniesienia selektywności ich dysocjacji pod wpływem NaCl. Dodanie tego detergentu nie zmienia jedynie przebiegu dysocjacji histonu H1. Sugeruje to, że w porównaniu ze wszystkimi pozostałymi histonami histon H1 wykazuje najmniej oddziaływań niejonowych. Mały wpływ oddziaływań hydrofobowych w utrzymaniu tego białka w chromatynie jest także skutkiem niewielkiej liczby fragmentów spiralnych w jego cząsteczce, co wynika z dużej zawartości proliny (39, 43).

Badania wpływu częściowego zablokowania wolnych grup aminowych aminokwasów w histonie H1, na trwałość jego wiązania w chromatynie i w kompleksach utworzonych z DNA, wykazują słabsze związanie histonu H1 w badanych preparatach, proporcjonalnie do stopnia zablokowania wolnych grup aminowych tego białka (44). Jednakowy wpływ stopnia acetylacji histonu H1 na przebieg jego oddysocjowywania pod wpływem NaCl z chromatyny i kompleksów z DNA sugeruje, że histon ten wiąże się w chromatynie głównie jonowo w wyniku bezpośredniego oddziaływania wolnych grup aminowych aminokwasów zasadowych białka z grupami fosforanowymi DNA (44). Bezpośrednie połączenie histonu H1 w chromatynie z DNA sugerują też Bradbury i wsp. (45) na podstawie analizy porównawczej chromatyny i kompleksów histonu H1 z DNA metodą jądrowego rezonansu magnetycznego. W jednej z ostatnich prac badacze ci (46) wnioskujeją, że histon H1 wiąże się z DNA głównie C-końcowym fragmentem cząsteczki.

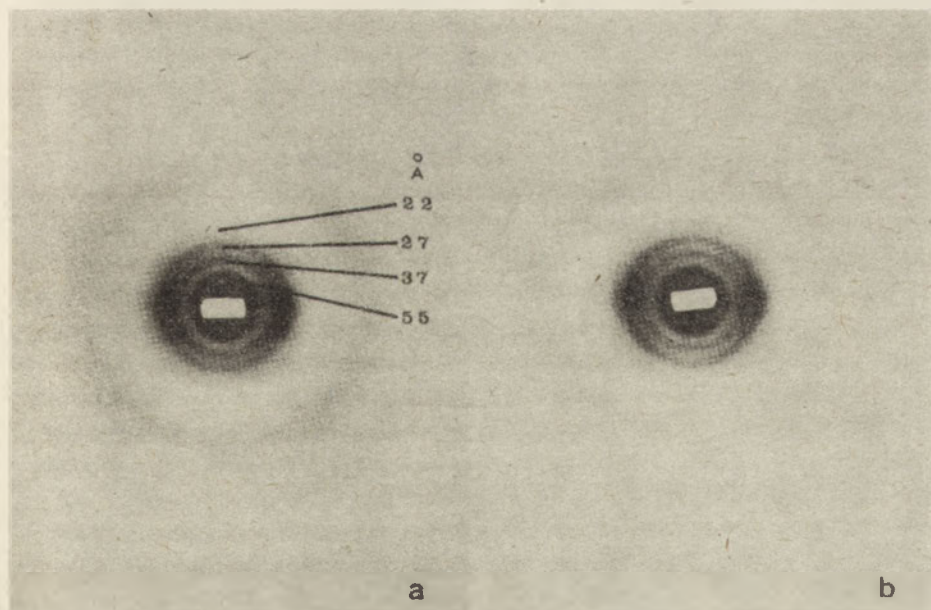
Jonowe głównie związanie histonu H1 w chromatynie nie wyklucza jego udziału w oddziaływaniach białko—białko. W tego rodzaju oddziaływaniach biorą udział zdolne do przyjmowania struktury α -heliksu środkowe fragmenty cząsteczki (47). Rola ich w strukturze chromatyny zostanie przedstawiona w następnym rozdziale.

Nie ma dotąd w literaturze danych na temat oddziaływań histonu H1 z innymi składnikami chromatyny. Wpływ acetylacji histonu H1 na trwa-

łość jego połączeń w chromatynie i w kompleksach z DNA sugerują brak takich oddziaływań (44). Wskazuje na to również brak oddziaływań histonu H1 z innymi histonami w roztworach (48). Ostatnio Bradbury i wsp. (46) sygnalizują możliwość oddziaływań globularnych fragmentów histonu H1 z podjednostką chromatyny, jednakże nie precyzują jakiego mają one być rodzaju i z którymi składnikami podjednostki.

III. Rola strukturotwórcza histonu H1 w budowie chromatyny

Wyniki badań hydrodynamicznych (49—51) oraz dane otrzymane z pomiarów dichroizmu kołowego chromatyny (52, 53) wyraźnie wskazują, że histon H1 nie wpływa ani na konformację cząsteczek chromatyny w roztworze, ani na stopień upakowania w nich łańcucha DNA. Analiza obrazów rentgenograficznych uzyskiwanych z dyfrakcji promieni X na włóknach i żelach nukleohistonu (54, 55) potwierdza fakt, że histon H1 nie uczestniczy w utrzymywaniu określonej trzeciorzędowej struktury DNA w chromatynie. Tą trzeciorzędową strukturą DNA może być, postulowana kilka lat temu przez wielu badaczy, superspirala (55, 56). Rycina 1 przedstawia rentgenogramy wykonane w pracowni Pardon a i Richardsa w 1973 roku (55); zaznaczono na nich refleksy charakterystyczne dla nukleohistonu (22 Å, 27 Å, 37 Å, 55 Å). Obrazy dyfrakcyjne nukleohistonu

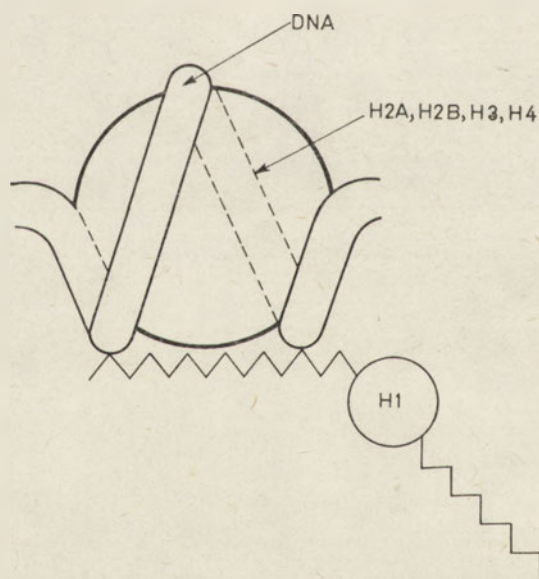


Ryc. 1. Rentgenogramy nukleohistonu: a) z kompletnym zestawem histonów przy względnej wilgotności preparatu 95% oraz b) po usunięciu histonu H1 przy względnej wilgotności 98% (wg 55).

22 Å, 27 Å, 37 Å, 55 Å — refleksy charakterystyczne dla nukleohistonu.

z całym kompleksem pięciu frakcji histonowych oraz nukleohistonu, z którego selektywnie usunięto histon H1 zawierają ten sam zespół refleksów o identycznych intensywnościach. Badania rentgenograficzne nukleohistonu i wyniki analizy otrzymywanych obrazów dyfrakcyjnych omówiono już w *Postęпах Biochemii* (6).

Badania ostatnich trzech lat wyraźnie wykazały, że chromatyna, podobnie jak i chromosomy metafazalne, jest zbudowana z periodycznie powtarzających się struktur (7, 27, 57, 58, 59, 60). Analiza przebiegu trawienia chromatyny nukleazami wskazała też, że prawie 85—90% materiału genetycznego organizmów eukariotycznych stanowi układ powtarzających się okresowo cząstek nukleoproteidowych tzw. podjednostek chromatynowych określanych również mianem nukleosomów. Do chwili obecnej niewiele wiadomo o budowie podjednostki chromatynowej i roli jaką odgrywa w jej strukturze histon H1. Według Kornberga (7, 27) podjednostka chromatynowa składa się z ośmiu cząsteczek histonów uorganizowanych w dwa tetramery (jeden tetramer zbudowany z dwóch dimerów histonów: H3 z H4 oraz drugi tetramer z dimerów: H2A z H2B), wokół którego owinięty jest łańcuch DNA zawierający 200 par zasad. Według tej koncepcji histon lizynobogaty H1 nie wchodzi w skład nukleosomu. Baldwin i wsp. (60) w wyniku zastosowania metody rozpraszania neutronów uzyskali dane, z których wnioskują, że histon H1 nie jest składnikiem pod-



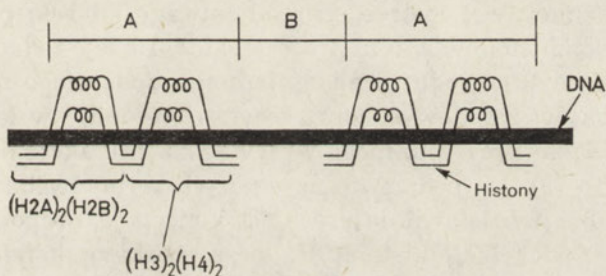
Ryc. 2. Hipotetyczny model budowy podjednostki chromatynowej i roli histonu H1 w chromatynie wg Baldwina i wsp. (60).

Rdzeń globularny podjednostki tworzą cztery rodzaje histonów (H2A, H2B, H3, H4) oddziałując ze sobą niepolarnymi fragmentami łańcuchów polipeptydowych. Wokół rdzenia jest owinięty łańcuch DNA. Histon H1 leży na zewnątrz części globularnej pełniąc rolę mostka łączącego podjednostki.

jednostki chromatyny. Autorzy ci podobnie jak i wielu innych badaczy (61—64) uważają, że histon ten może pełnić rolę elementu łączącego podjednostki w obrębie tego samego lub różnych łańcuchów DNA, leżąc na zewnątrz części globularnej nukleosomu (Ryc. 2).

Zastosowanie nukleaz w badaniach struktury chromatyny wykazało, że około 50% DNA w tym kompleksie może podlegać działaniu DNazy ze *Staphylococcus aureus* (E.C.3.1.4.7), przy czym degradacja enzymatyczna obejmuje również część podjednostki. Najbardziej oporny na działanie nukleaz pozostaje fragment nukleoproteidowy podjednostki zawierający odcinek DNA o długości 120—140 par zasad (64, 65). Te odporne fragmenty nukleoproteidowe nazwano cząstkami „PS”. W skład histonowy cząstek „PS” wchodzi osiem cząsteczek histonów za wyjątkiem histonu H1 (66).

Powyższe dane uwzględnił Li (66) i w 1975 roku w swoim modelu budowy chromatyny zaproponował taką lokalizację histonu H1, dzięki której można wytłumaczyć dotychczasowe wyniki eksperymentalne z dyfrakcji promieni X, rozproszenia neutronów i hydrolizy DNA nukleazami w tym kompleksie nukleoproteidowym.



Ryc. 3. Proponowana przez Li (66) lokalizacja histonu H1 w chromatynie. Obszar A jest miejscem wiązania się dwóch tetramerów histonów $((H2A)_2(H2B)_2)$ oraz $(H3)_2(H4)_2$ z DNA, który przyjmuje postać superspirali. Obszar B stanowi ten fragment łańcucha DNA, który nie posiada superspiralnej struktury i jest połączony z histonem H1. Linia prostą zaznaczono rejon zasadowy histonów, a spiralną rejon hydrofobowy histonów.

Przedstawiony przez Li i projekt możliwej organizacji strukturalnej chromatyny zawierał w sobie popularną kilka lat temu postać superspirali DNA z uwzględnieniem występującego elementu symetrii, polegającego na powtarzaniu się określonych układów histonów. W swym modelu autor różnił dwa obszary wiązania się histonów z DNA (Ryc. 3). Te miejsca kwasu nukleinowego, z którymi wiążą się dwa uorganizowane tetramery histonów $((H2A)_2(H2B)_2)$ oraz $(H3)_2(H4)_2$ mają strukturę superspirali (zawierają 130—150 par zasad) i odpowiadają cząstkom „PS”. W tym obszarze chromatyny nie występuje histon H1, lecz występuje on z nie tworzącym superspirali fragmentem DNA o 35—45 parach zasad.

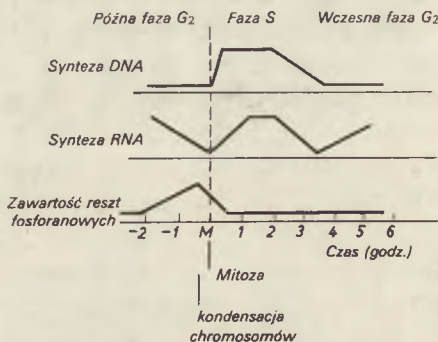
Ostatnio ukazały się doniesienia wskazujące, że usunięcie z chromatyny histonu H1 powoduje odsłonięcie 30—50 par zasad DNA (67, 68). Hydroliza nukleazą ze *Staphylococcus aureus* (E.C.3.1.4.7) chromatyny zawierającej

pięć rodzajów histonów oraz chromatyny po uprzednim oddysocjowaniu z niej histonu H1 wskazuje, że te właśnie 30—50 par zasad DNA są związane z tym histonem. Proponowany przez Li model budowy chromatyny znajduje potwierdzenie doświadczalne takiego umiejscowienia histonu H1 w chromatynie. Przemawia za tym również fakt, że białko to stanowi wraz z fragmentem DNA (30—50 par zasad) mostek łączący nukleosomy (68).

IV. Udział histonu H1 w regulacji cyklu komórkowego

Od dłuższego czasu przypisuje się histonowi H1 ważną rolę w kondensowaniu nici chromatynowych w wyniku tworzenia przez to białko wiązań poprzecznych tzw. *cross-links* (69—74). Ponieważ wykazano także, że wraz ze wzrostem stopnia skondensowania chromatyny zmniejsza się jej aktywność transkrypcyjna, sugerowało to, że histon H1 wywiera efekt represorowy poprzez kondensację chromatyny. Prowadzone od paru lat w pracowni Bradbury'ego (75) badania nad mechanizmem zmian stanu chromosomów w komórce, zwróciły uwagę na rolę postsyntetycznych modyfikacji histonów w tym procesie. Modyfikacje te (acetylacje, metylacje, fosforylacje) powodują zmianę ładunku dodatniego naładowanych reszt aminokwasów zasadowych oraz seryny i treoniny w łańcuchu polipeptydowym białka i przez to mogą wpływać na interakcje histony—DNA w genomie (76—79). Na podstawie uzyskanych wyników badań, Bradbury i wsp. (80) przedstawili interesującą koncepcję, proponującą powiązanie procesu fosforylacji histonu H1 ze zjawiskiem kondensacji chromosomów i identyfikującą aktywność fosforylacyjną jądra komórkowego z czynnikiem inicjującym mitozę w komórce (tzw. *mitotic — trigger*).

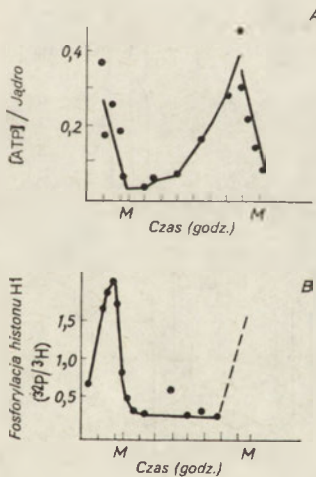
W większości przebadanych tkanek wykazano, że histon H1 ulega najłatwiej fosforylowaniu spośród wszystkich histonów (80—82); szczególnie



Ryc. 4. Synteza DNA i RNA a fosforylacja histonu H1 w poszczególnych fazach cyklu komórkowego *Physarum polycephalum* (82).

intensywną jego fosforylację obserwowano w tkankach, których komórki ulegają częstym podziałom (78, 83, 84). Szereg danych wskazuje, że istnieje związek pomiędzy fosforylacją histonu H1 a procesem wzrostu komórek i replikacją chromosomów (85—88). Badając cykl komórkowy śluzowca *Physarum polycephalum* Bradbury i wsp. (82) zaobserwowali zależność pomiędzy poziomem reszt fosforanowych w histonie H1 a syntezą RNA i DNA w jądrze (Ryc. 4).

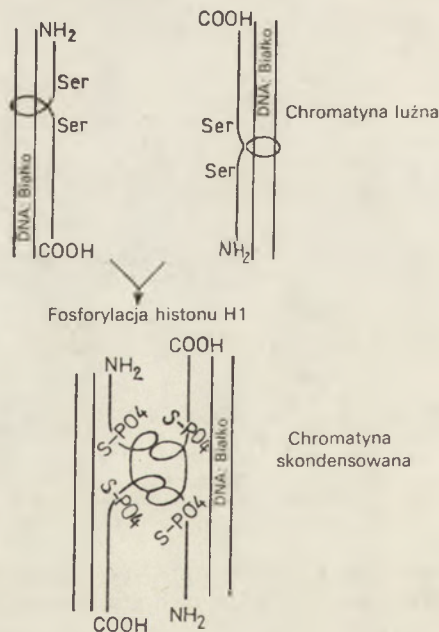
Maksimum fosforylacji histonu H1 przypadało przed rozpoczęciem mitozy, gdy chromatyna była skondensowana w zbite chromosomy, po czym następował spadek ilości wbudowywanych reszt fosforanowych do białka, aż do stałego poziomu przez cały czas trwania fazy S (synteza DNA). Sugeruje to, że fosforylacja histonu H1 może być etapem koniecznym do kondensacji chromatyny. W pracowni Bradbury'ego (80) wykazano, że aktywność enzymów: kinazy i fosfatazy histonu występujących jednocześnie w komórce reguluje zawartość reszt fosforanowych w histonie H1. Stosunek aktywności tych enzymów może zmieniać się w cyklu komórkowym i w tym przypadku wypadkowa aktywność fosforylacyjna może kontrolować ilość reszt fosforanowych wbudowywanych w cząsteczkę histonu H1. Wyniki badania aktywności fosforylacyjnej jąder *Physarum polycephalum* wyizolowanych w określonych stanach cyklu komórkowego w stosunku do egzogennego histonu H1 przedstawia rycina 5 (80).



Ryc. 5. Przebieg zmian w cyklu komórkowym: (A) — aktywności fosforylacyjnej jąder *Physarum polycephalum* po dodaniu do nich grasicowego histonu H1 oraz (B) — zawartości reszt fosforanowych w histonie H1 z *Physarum polycephalum* (wg 80). Jądra izolowano z *Physarum polycephalum* i po destrukcji ich ultradźwiękami inkubowano je w obecności (γ - ^{32}P)ATP, cyklicznego AMP oraz histonu H1 z grasicy docelowej. Reakcję przerywano dodając oziębionego kwasu trójchlorooctowego do stężenia końcowego 5%. Następnie histon H1 ekstrahowano i oznaczano jego radioaktywność.

Uzyskane przez Bradbury'ego i wsp. (80) zależności wykazują, że aktywność fosforylacyjna jąder zmienia się w czasie trwania cyklu komór-

kowego jednocześnie ze stopniem ufosforylowania histonu H1 od wartości minimalnych w fazie S do maksymalnych w późnej fazie G2. Maksimum aktywności fosforylacyjnej jąder wyprzedza nieco maksimum zawartości reszt fosforanowych w histonie H1 z *Physarum polycephalum*, co wskazuje, że zmiana zawartości reszt fosforanowych zależy od zmiany aktywności fosforylacyjnej jąder. Bradbury i wsp. (80) postulują, że czynnikiem białkowym bezpośrednio inicjującym mitozę jest kinaza histonu. Opisana wcześniej termolabilność tego czynnika potwierdza jego białkowy charakter (89). Według koncepcji tych autorów (80) (Ryc. 6) fosforylacja reszt seryny (w pozycji 37 i 105 (90)) na obu końcach histonu H1, czyli w obrębie fragmentów cząsteczki wiążących się silnie z DNA, powoduje odsunięcie znacznej części łańcucha polipeptydowego od kwasu nukleinowego na skutek wzajemnego odpychania się ujemnie naładowanych reszt fosforanowych DNA i fosfoseryny. Uwolniony w ten sposób fragment cząsteczki może oddziaływać z identycznym fragmentem histonu H1 odłączonym od innego miejsca na nici DNA. Tego rodzaju oddziaływania, tworząc wewnętrzne usieciowanie między włóknami nukleohistonu prowadzą w efekcie do kondensacji chromatyny w zbite chromosomy widoczne w mikroskopie bezpośrednio przed rozpoczęciem podziału jądra komórko-



Ryc. 6. Hipotetyczny schemat ilustrujący proces kondensacji chromosomów w jądrze komórkowym przed metafazą (wg 80).

wego. Koncepcja przypisująca taką funkcję fosforylacji histonu H1 jest zgodna z wcześniejszymi, nieinterpretowanymi tak obserwacjami Mohberga i Ruscha (91), dotyczącymi korelacji między cyklem komór-

kowym *Physarum polycephalum* a modyfikacją histonu H1. Przemawiają za nią te dane, że fosforylacja histonu H1 w chromatynie powoduje zmianę widma dichroizmu kołowego wskazującą na tworzenie skondensowanych obszarów (92). Również wpływ fosforylacji reszt seryny w histonie H1 w pozycji 37 i 105 na interakcję tego białka w DNA wykazuje słabsze wiązanie się z DNA ufosforylowanego histonu H1 niż nieufosforylowanego histonu H1 (93).

Przedstawione wyniki eksperymentalne ostatnich kilku lat nie wyjaśniają wyczerpująco roli histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny. Wskazują one jednak na odmienną od pozostałych histonów rolę strukturalną, a zarazem i biologiczną tego białka. Ostatnio coraz częściej sugeruje się udział histonu H1 w regulacji procesu transkrypcji chromatyny.

Artykuł nadszedł 22.11.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 18.12.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Murray K., (1964) w *The Nucleohistones*, red. Bonner J., POP Tsao Holden Day, San Francisco USA.
2. McClure M. E., Hnilica L. S., (1972), *Sub-Cell. Biochem.*, **1**, 311—332.
3. Bolund L. A., Johns W. E., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **35**, 546—553.
4. Cedar M., Felsenfeld G., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 237—254.
5. Kłyszewko L., Bartkowiak J., (1970), *Post. Biochemii*, **16**, 347—388.
6. Kaliński A., Mężykowski T., Jerzmanowski A., (1974), *Post. Biochemii*, **20**, 245—257.
7. Kornberg R. D., (1974), *Science*, **184**, 868—871.
8. Bradbury E. M., (1975), w *Structure and Function of Chromatin*, wyd. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, Oxford, Nowy Jork str. 131—155.
9. De Lange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 319—334.
10. Ogawa Y., Quagliarotti G., Jordan J., Taylor Ch., Sarbuch C. W., Busch H., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4387—4392.
11. De Lange R. J., Hooper J. A., Smith E. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3261—3274.
12. Yeoman L. C., Olson N. O. J., Sugano N., Jordan J., Taylor Ch., Starbuch W. C., Busch H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6018—6023.
13. Iwai K., (1970), *Nature*, **226**, 1056—1058.
14. Rall S. C., Cole R. D., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7175—7190.
15. Bustin M., Rall S. C., Stellwagen R. H., Cole R. D., (1969), *Science*, **163**, 391—393.
16. Bradbury E. M., Rattle H. W. E., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **27**, 270—281.
17. Boublik M., Bradbury E. M., Crane-Robinson C., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 486—497.
18. Bradbury E. M., Cary P. D., Crane-Robinson C., Riches P. L., Johns E. W., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 482—485.
19. Johns E. W., (1972), *Nature New Biology*, **237**, 87—88.
20. Bradbury E. M., Crane-Robinson C., Philips D. H. P., Johns E. W., Murray K., (1965), *Nature*, **205**, 1315—1316.

21. Bustin M., Rall R. C., Stellwagen R. H., Cole R. D. (1963), *Science*, **163**, 391—393.
22. Lewis P. N., Bradbury E. M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 153—159.
23. Bradbury E. M., (1975) w *Structure and Function of Chromatin*, wyd. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, Oxford, Nowy Jork str. 131—155.
24. Chepman G. E., Hartman P. G., Bradbury E. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 69—75.
25. Giannioni G., Peacocke A. R., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **68**, 157—161.
26. Roark D. E., Geoghagan T. R., Keller G. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 542—547.
27. Kornberg R. D., Thomas J. O., (1974), *Science*, **184**, 865—868.
28. D'Anna J. A., Isenberg I., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1035—1043.
29. Thomas J. O., Kornberg R. D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **2**, 2626—2672.
30. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **241**, 123—126.
31. Johns E. W., Forrester S., (1969), *Biochem. J.*, **111**, 371—374.
32. Ohlenbush H. H., Olivera B. M., Tuan D., Davidson N., (1967), *J. Mol. Biol.*, **25**, 299—315.
33. Toczko K., Kaliński A., Żukowska-Niedźwiedź A., (1975), *Acta Biochim. Polon.*, **22**, 251—256.
34. Smart J. F., Bonner J., (1971), *J. Mol. Biol.* **58**, 651—659.
35. Kurecki T., Toczko K., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 225—233.
36. Bram S., Ris H., (1971), *J. Mol. Biol.*, **55**, 325—336.
37. Chatterje S., Walker I. O., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 519—526.
38. Bartley J. A., Chalkley R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3647—3655.
39. Kaliński A., Toczko K., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 67—72.
40. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **243**, 123—126.
41. Ziccardi R., Schumaker V., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3231—3235.
42. Kaliński A., Toczko K., (1974), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**, 163—165.
43. Gabbay E. J., Stanford K., Baxter C. S., Kapicak L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4021—4029.
44. Żukowska-Niedźwiedź A., Toczko K., (1974), *Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol.*, **22**, 81—83.
45. Bradbury E. M., Danby S. E., Rattle H. W. E., Giancotti V. (1975), *Eur. J. Biochem.*, **57**, 97—105.
46. Chapman G. E., Hartman P. G., Bradbury E. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 69—75.
47. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **243**, 123—126.
48. Hardison R. C., Eichner M. E., Chalkley R., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1751—1770.
49. Henson P., Walker I. O., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **22**, 1—4.
50. Toczko K., Dobrzańska M., Chmielewska I., (1972), *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 19—24.
51. Kaliński A., Toczko K., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 103—108.

52. Hanlon S., Johnson R. S., Chan A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3963—3971.
53. Li H. J., Chang C., Evagelinou Z., Weiskopf M., (1975), *Biopolymers*, **14**, 211—226.
54. Bradbury E. M., Molgaard H. V., Stephens R. M., Bolund L. A., Johns E. W., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **31**, 474—482.
55. Skidmore C., Walker I. O., Pardon J. F., Richards B. M., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 175—178.
56. Pardon J. F., Wilkins M. H. F., (1972), *J. Mol. Biol.*, **68**, 115—124.
57. Hyde J. E., Walker I. O., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 405—421.
58. Finch J. T., Noll M., Kornberg R. D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3320—3322.
59. Noll M., (1974), *Nature*, **251**, 249—251.
60. Baldwin J. P., Boseley P. G., Bradbury E. M., Ibel K., (1975), *Nature*, **253**, 245—249.
61. Bram S., Butler-Browne G., Bradbury E. M., Baldwin J. P., Reiss C., Ibel K., (1974), *Biochimie*, **54**, 987—989.
62. Shaw B. R., Herman T. M., Kovacic R. T., Beaudreau G. S., Van Holde K. E., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 505—509.
63. Axel R., Melchior W., Sollner-Webb B., Felsenfeld G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4101—4105.
64. Van Holde K. E., Saharabuddhe C. G., Shaw B. R., (1974), *Nucleic Acids Res.*, **1**, 1579—1586.
65. Rill R. L., Oesterhof D. K., Hozier J. C., Nelson D. A., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1525—1538.
66. Li H. J., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1275—1289.
67. Varshavsky A. J., Bakayev V. V., Georgiev G. P., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 477—492.
68. Whitlock J. P. Jr., Simpson R. T., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3307—3314.
69. Littau V., Burdick C., Allfrey V., Mirsky A., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 1024—1028.
70. Mirsky A. E., Burdick C. J., Davidson E. N., Littau V., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 592—596.
71. Chalkley R., Jensen H. R., (1968), *Biochemistry*, **7**, 4380—4388.
72. Johns E. W., Forrester S., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **8**, 547—552.
73. Panyim S., Bilck D., Chalkley R., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4206—4215.
74. Toczko K., Jazwiński S. M., (1971), *Acta Biochim. Polon.*, **18**, 31—38.
75. Bradbury E. M., Carpenter B. G., Rattle H. W. E., (1973), *Nature*, **247**, 123—126.
76. Ord M. G., Stocken A., (1967), *Biochem. J.*, **107**, 403—408.
77. Kleinsmith L. J., Allfrey V., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1182—1188.
78. Louie A. J., Dixon G. H., (1973), *Nature New Biology*, **243**, 164—168.
79. Sung M. T., Dixon G. H., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1616—1623.
80. Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R., (1974), *Nature*, **247**, 257—261.
81. Marks O. B., Paik W. K., Borun T. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5660—5667.
82. Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R., Sarnier E. M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 131—139.

83. Marks O. B., Paik W. K., Borun T. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5660—5667.
84. Lake R. S., Salzman N. P., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4817—4826.
85. Balhorn R., Chalkley R., Granner D., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1094—1099.
86. Balhorn R., Balhorn M., Morris H. P., Chalkley R., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 1775—1779.
87. Oliver D., Balhorn R., Granner D., Chalkley R., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3921—3925.
88. Lake R. S., (1973), *Nature New Biology*, **242**, 145—146.
89. Brewer E. N., Rusch H. P., (1968), *Exp. Cell Res.*, **49**, 79—86.
90. Langan T. A., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 1276—1281.
91. Mohberg J., Rusch H. P., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **134**, 577—589.
92. Ong E. C., Fasman G. D., (1976), *Biochemistry*, **24**, 477—485.
93. Bradbury E. M., (1975), w *Structure and Function of Chromatin*, wyd. Elsevier, Excerpta Medica, North Holland, Amsterdam, Oxford, Nowy Jork, str. 131—155.

EWA MARIA RAKOWICZ-SZULCZYŃSKA*)

Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów

Non-histone chromatin proteins as regulators of gene expression

Spis treści

Wstęp

- I. Preparatyka niehistonowych białek chromatyny
- II. Interakcja niehistonowych białek chromatyny z DNA
- III. Udział niehistonowych białek chromatyny w aktywacji genów pod wpływem hormonu
- IV. Regulatorowa rola niehistonowych białek chromatyny w procesie regulacji transkrypcji (dane doświadczalne)
 - IV-1. Rekonstrukcja chromatyny *in vitro*
 - IV-2 „Obrót metaboliczny” białek niehistonowych
 - IV-3. Udział niehistonowych białek chromatyny w regulacji proliferacji i różnicowaniu się komórek
- V. Uwagi końcowe

Contents

Introduction

- I. Preparation of non-histone chromatin proteins
- II. Interaction of non-histone chromatin proteins with DNA
- III. Role of non-histone chromatin proteins in activation of gene by hormones
- IV. Non-histone chromatin proteins as regulators of transcription (experimental data)
 - IV-1. Chromatin reconstruction *in vitro*
 - IV-2. “Turn-over” of non-histone proteins
 - IV-3. Non-histone chromatin proteins as regulators of cells proliferation and differentiation
- V. Conclusion

*) Mgr, Zakład Genetyki Człowieka, PAN, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

Wykaz stosowanych skrótów: DN-aza — dezoksyrybonukleaza; SDS — sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego; ACTH — hormon adrenokortykotropowy; TSH — hormon tyreotropowy; C_0t — stała reasocjacji DNA $\left(\frac{\text{mole}^1}{1} \times S\right)$; AP₁, AP₂, AP₃, AP₄, UP, NP — frakcje niehistonowych białek chromatyny.

Liczne prace przeglądowe poświęcono w ostatnich latach niehistonowym białkom chromatyny, jako regulatorom aktywności genu w organizmach eukariotycznych (1,2,3,4,5,6). Niehistonowe białka chromatyny stanowią niezwykle heterogenną grupę białek, obejmującą oprócz chromatynowych białek strukturalnych i (jak przypuszczamy) regulatorowych, również enzymy zaangażowane w procesach replikacji, transkrypcji, modyfikacji histonów, białek niehistonowych i DNA oraz ich degradacji (polimeraza DNA, polimeraza RNA), czynniki inicjujące i terminujące transkrypcję, ligaza polinukleotydowa. DN-aza, proteazy, fosfokinazy, acetylotransferazy, metylotransferazy (por. komentarz redakcyjny *Nature* **257**, 644—645, 1975). We frakcji niehistonowych białek chromatyny znaleziono też białka kurczliwe — aktynę, miozynę, tropomiozynę i tubulinę (7,8). Masa cząsteczkowa niehistonowych białek chromatyny waha się od dziesięciu tysięcy do kilkuset tysięcy (9).

Podobnie jak histony, niehistonowe białka chromatyny syntetyzowane są w cytoplazmie, po czym przechodzą do jądra i asocjują z DNA. Niektóre nowo syntetyzowane białka włączane są do kompleksu chromatynowego, inne tworzą pulę cytoplazmatyczną (10) lub jądrową (11). W przeciwieństwie do histonów, stanowiących stałą komponentę chromatyny (12,13,14), białka niehistonowe ulegają jakościowym i ilościowym zmianom, równoległym ze zmianami w aktywności genu (10,14,15,16).

Niehistonowe białka chromatyny wykazują szybki obrót metaboliczny (17,18), jednak obok białek z półokresem trwania wynoszącym zaledwie kilka minut, występują również inne, tak samo stabilne jak histony (19).

I. Preparatyka niehistonowych białek chromatyny

W otrzymywaniu niehistonowych białek chromatyny stosowane są dwie metody. Pierwsza z nich polega na ekstrakcji histonów kwasami mineralnymi. Białka niehistonowe oddziela się od DNA. Metodę tę stosowano przez długi czas, ponieważ jednak zarówno kwasy mineralne, jak i organiczne uszkadzają chromatynę (20), stopniowo zarzuca się jej stosowanie. Większość autorów wybiera obecnie metodę polegającą na dysocjacji chromatyny w roztworze o wysokim stężeniu NaCl, mocznika lub chlorowodoru guanidyny w pH powyżej 7, a następnie oddziela DNA od białek chromatynowych drogą ultrawierowania (21,22,23), strącenia DNA jonami lantanu (24) lub metodami chromatograficznymi (25,26,27,28). Nowszą modyfikację tej metody stanowi ultrawierowanie zdysocjowanej chromatyny w gradencie chlorku lub siarczanu cezu (29,30) albo metrizamidu (31). Inna technika izolacji DNA, RNA i białek z hodowli komórkowej polega na lizie komórek lub ich jąder w tiocyjanie sodu, co powoduje jednoczesne rozproszenie komponent chromatyny (DNA, RNA, białek) i ułatwia ich izolację (30). Uzyskane powyższymi metodami frakcje białek chromatynowych poddaje

się chromatografii na kationitach selektywnie wiążących dodatnio naładowane histony (15,21,22,24,27,28,32), względnie anionitach (33), wiążących selektywnie białka kwaśne.

Do rozdziału na podfrakcje wyizolowanych z chromatyny niehistonowych białek stosuje się następujące metody:

- Elektroforetyczny rozdział w żelach, pozwalający wyróżnić frakcje o określonej masie cząsteczkowej (34,35,36,37).
- Izoelektryczne ogniskowanie w żelu poliakryloamidowym. Niehistonowe białka chromatyny w przeciwieństwie do histonów zawierają grupy tiolowe, których liczba różna jest dla poszczególnych białek. Białka niehistonowe różnych tkanek szczura badane metodą izoelektrycznego ogniskowania w żelu poliakryloamidowym wykazywały większą heterogenność niż poddane zwykłej elektroforezie w tym samym żelu poliakryloamidowym (38).
- Elektroforeza dwukierunkowa, będąca połączeniem metod opisanych w punktach 1,2 (27).
- Frakcjonowanie na jonitach pozwalające na wyróżnienie frakcji wymywanych przy różnej sile jonowej (21,26,39).
- Frakcjonowanie na Sephadex G-200(40).
- Chromatografia powinowactwa z użyciem celulozy (41,42,43) lub Sepharose (44) sprzężonych z DNA.
- Sączenie mieszaniny DNA i białek niehistonowych na sączkach nitrocelulozowych (22,45), wiążących kompleks DNA-białka oraz wolne białka, a przepuszczających DNA. Retencja kompleksu DNA-białka zależy od ilości związanego białka, a także od typu oddziaływań białka z DNA (22). Podwyższenie siły jonowej środowiska umożliwia wymycie kompleksu z sączka.

Mimo tej różnorodności metod stosowanych w preparatyce białek niehistonowych, wydzielenie poszczególnych białek niehistonowych napotyka ciągle na znaczne trudności. Białka niehistonowe izolowane z chromatyny w różnych środowiskach wykazują odmienny skład ilościowy i jakościowy. Tak np. izolowane z jąder preparowanych w sacharozie lub kwasie cytrynowym wykazują podczas elektroforezy obecność wysokocząsteczkowych polipeptydów, podczas gdy uzyskane z jąder komórkowych izolowanych metodą detergentową — polipeptydów niskocząsteczkowych (cyt. za 46).

Ponadto, różna energia oddziaływań poszczególnych białek niehistonowych z DNA powoduje, że warunki zastosowane do oddysocjowania białek od DNA (stężenie NaCl, mocznika lub chlorowodoru guanidyny (często nie wystarczają do oddzielenia wszystkich białek niehistonowych (24). Szczegółowego znaczenia izolacja wszystkich białek niehistonowych z chromatyny nabiera w przypadku stosowania tego preparatu białkowego do rekonstrukcji chromatyny. Wykazano np., że aktywność matrycowa chromatyny pozbawionej frakcji białek ekstrahowanych 0,35M NaCl nie różni się od aktywności chromatyny natywnej, podczas gdy chromatyna rekon-

struowana tylko w obecności tej frakcji — aktywności matrycowej nie wykazuje (47). Analiza elektroforetyczna tych białek pozwoliła stwierdzić, że frakcja „nierozpuszczalna” w 0,35M NaCl różni się od „rozpuszczalnej” (przy tej sile jonowej) tylko jedną, ale bardzo istotną subfrakcją, niezbędną do przebiegu transkrypcji *in vitro*.

Trudności z określeniem liczby niehistonowych białek chromatyny wynikają również z degradacji oligomerów białkowych do monomerów, która może mieć miejsce przy zastosowaniu tak drastycznych środków dysocjujących, jak 5M lub 8M mocznik lub chlorowodorek guanidyny. Dobre wyniki daje dysocjacja chromatyny wyłącznie w 2,5M NaCl i 0,01M Tris-HCl, ponieważ białka niehistonowe izolowane w ten sposób zachowują swoją natywną strukturę, o czym świadczy np. zachowanie aktywności ligazy DNA (22). Z drugiej jednak strony, podczas ultrawierowania w 2,5M NaCl ok. 40% niehistonowych białek chromatyny ulega częściowej agregacji, sedymentując następnie razem z DNA. W 5M moczniku zaś, 90% białek przechodzi do roztworu. Wzrost ilości białka w supernatancie w obecności mocznika jest nie tyle związany z dysocjacją większej ilości białek od DNA, ile ze zmniejszeniem stopnia ich agregacji oraz wzrostem gęstości roztworu (względem układu nie zawierającego mocznika) co w efekcie opóźnia ich sedymentację przy danej sile odśrodkowej.

Zmiany wielkości polipeptydów białek niehistonowych podczas izolacji, mogą być spowodowane działaniem proteazy chromatynowej, aktywnej w 2M NaCl i 5M moczniku, degradując zarówno histony, jak i białka niehistonowe (48), stąd brak w środowisku inhibitora proteazy chromatynowej powoduje degradację wielkocząsteczkowych polipeptydów (7). Związkami całkowicie zabezpieczającymi białka niehistonowe przed degradacją okazały się: fluorek kwasu fenylometanosulfonowego, fluorofosforan dwuizopropylowy, keton karbobenzoksyfenyloalaninowo-chlorometylowy lub octan p-nitrofenylowy (48).

II. Interakcja niehistonowych białek z DNA

Opracowana przez Alberta i wsp. (49) metoda frakcjonowania białek na DNA-celulozie pozwala na jednoczesne określenie specyficzności białek niehistonowych w układzie homo- lub heterologicznym oraz, po zastosowaniu gradientu siły jonowej na wyodrębnienie białek różniących się powinowactwem do DNA. Przy pomocy tej metody wykazano (po raz pierwszy w r. 1970) specyficzność bardzo małej frakcji białek niehistonowych wątroby szczura względem homologicznego DNA (41).

Powiązanie niehistonowych białek chromatyny ze specyficznymi sekwencjami nukleotydowymi DNA wydaje się podstawowym warunkiem ich regulatorowej funkcji. Sugeruje się, (44), że istnieją dwie frakcje białek niehistonowych, z których jedna wiąże się wyłącznie z homologicznym DNA, druga zarówno z homo- jak i heterologicznym DNA. Tak na przy-

kład białka niehistonowe z limfocytów grasicy cielej różnią się powinowactwem do sekwencji nukleotydowych frakcji DNA o niskim C_0t (sekwencje powtarzalne), o średnim C_0t (sekwencje powtarzalne i niepowtarzalne) oraz wysokim C_0T (sekwencje unikalne). Obserwuje się również różnice w wiązaniu białek z pojedynczą i podwójną nicią DNA w granicach subfrakcji DNA o tym samym współczynniku C_0t . W stosunku do niehistonowych białek chromatyny izolowanych 2,5M NaCl z wątroby szczura nie stwierdzono specyficznego oddziaływania z DNA. Niewielka część białek wiązała się specyficznie z natywnym homologicznym DNA, jednak tylko w obecności 5M mocznika. Zdenaturowany zaś zarówno homologiczny jak i heterologiczny DNA wiązał się z białkami niehistonowymi silniej niż natywny. Wreszcie specyficzną interakcję niehistonowych białek chromatyny z homologicznym DNA zdenaturowanym obserwowano zarówno w obecności jak i nieobecności mocznika. Stąd przypuszcza się, że mocznik wpływając destabilizująco na DNA ułatwia interakcję między DNA i białkami niehistonowymi (22). Dotąd też nie jest pewne, czy *in vivo* niehistonowe białka chromatyny wiążą się z natywnym, czy też z lokalnie zdenaturowanymi fragmentami DNA, chociaż większość prac przemawia za interakcją białek niehistonowych z lokalnie zdenaturowanymi fragmentami DNA (22,50,51).

Porównanie asocjacji białek niehistonowych z wątroby szczura z DNA (w środowisku 0,14M NaCl) w układzie homo- i heterologicznym (Tabela 1) pozwala stwierdzić, że wiązanie tych białek z DNA pochodzącym z niższych organizmów jest niższe. Występowanie najsilniejszego wiązania białek niehistonowych z DNA homologicznym wydaje się być związane z ich regulatorową funkcją (42).

Ważną, chociaż jeszcze niedostatecznie wyjaśnioną rolę w interakcji białek niehistonowych z DNA pełnią metale ciężkie. Tak np. 80—95% ^{203}Hg inkorporowanej do jąder komórkowych nerki szczura wiąże się z frak-

Tabela 1

Wiązanie znakowanych ^{32}P , ufosforylowanych białek niehistonowych z wątroby szczura z DNA-celulozą (42)

Źródło DNA	Radioaktywność (^{32}P) związana z DNA (imp/min)
Wątroba szczura	626
Jądra szczura	671
Wątroba myszy	578
Grasica wołowa	210
Wątroba wołowa	178
Sperma lososia	120
<i>E. coli</i>	110
<i>C. perfringens</i>	84

cją niehistonowych białek, silnie zasocjowanych z DNA, a stanowiących 12% ogólnej ilości chromatynowych białek niehistonowych (52).

Pewne próby interpretacji roli metali ciężkich podjęto opierając się na danych wykazujących wzrost aktywności genu w tkankach grochu pod wpływem bardzo małych stężeń jonów Cd^{++} , Hg^{++} i Zn^{++} (50). Sugeruje się, że te jony wiążą się z zasadami DNA i zmieniając w ten sposób układ wiązań wodorowych powodują w następstwie zmianę konformacji DNA (destabilizacja). Inne jony, jak Na^+ , Mn^{++} , Co^{++} nie wpływające na zmianę w aktywności genu wiążą się prawdopodobnie z fragmentem cukrowo-fosforanowym, stabilizując przez to konformację DNA.

Duże znaczenie we wzajemnej interakcji białek niehistonowych i DNA przypisywane jest ich fosforylacji. Stymulacja aktywności transkrypcyjnej poprzedzona jest masową, selektywną migracją białek z cytoplazmy do jądra oraz ich fosforylacją (44). Pierwsze obserwacje nad wzrostem fosforylacji białek jądrowych podczas indukcji aktywności genu dotyczyły inkorporacji znakowanego fosforanu do jąder komórkowych ludzkich limfocytów, stymulowanych fitohemaglutyniną (53). Stwierdzono, że grupy fosforanowe połączone wiązaniami estrowymi z grupami hydroksylowymi seryny lub treoniny w białkach ulegają łatwej wymianie.

Badania komórek HeLa w poszczególnych fazach cyklu komórkowego wykazały, że najwyższy poziom fosforylacji białek niehistonowych przypada na wczesną fazę G_1 i początkowy okres fazy S (aktywna synteza RNA), a najniższy — późną fazę G_2 i M (bardzo słaba synteza RNA (54). Defosforylacja białek niehistonowych powodowała obniżenie poziomu transkrypcji w rekonstruowanej chromatynie o 50% (55). Warto podkreślić, że wiązanie ufosforylowanych *in vivo* niehistonowych białek z homologicznym DNA sprzężonym z celulozą zależy od siły jonowej, w której prowadzi się doświadczenie (42).

Przypuszcza się, że zmiany w poziomie fosforylacji mogą odgrywać istotną rolę w regulacji procesu transkrypcji, zwłaszcza, że ufosforylowane białka niehistonowe wiążą się z DNA słabiej niż nieufosforylowane (43). Według niektórych autorów (55), zmiany fosforylacji niehistonowych białek chromatyny mogą mieć większe znaczenie w aktywności genów niż zmiany w ich składzie.

Mechanizm aktywacji genu poprzez fosforylację kwaśnych białek chromatynowych może polegać na zwiększeniu przyciągania ujemnie naładowanych grup fosforanowych z dodatnio naładowanymi histonami, przy jednoczesnym odpychaniu jednoimiennie naładowanego DNA. W końcowym wyniku tych procesów może następować udostępnienie określonej sekwencji DNA polimerazie RNA.

Celem wyjaśnienia natury oddziaływań między DNA a ufosforylowanymi białkami niehistonowymi (42), poddawano je działaniu rybonukleazy A, α -amylazy, fosfolipazy c, trypsyny, papainy i pronazy, a następnie chromatografowano na celulozie sprzężonej z DNA. Wiązanie białek z DNA

obniżały tylko enzymy proteolityczne, co sugeruje, że w tym procesie odgrywają istotną rolę białka, przy braku zaangażowania RNA, polisacharydów lub fosfolipidów.

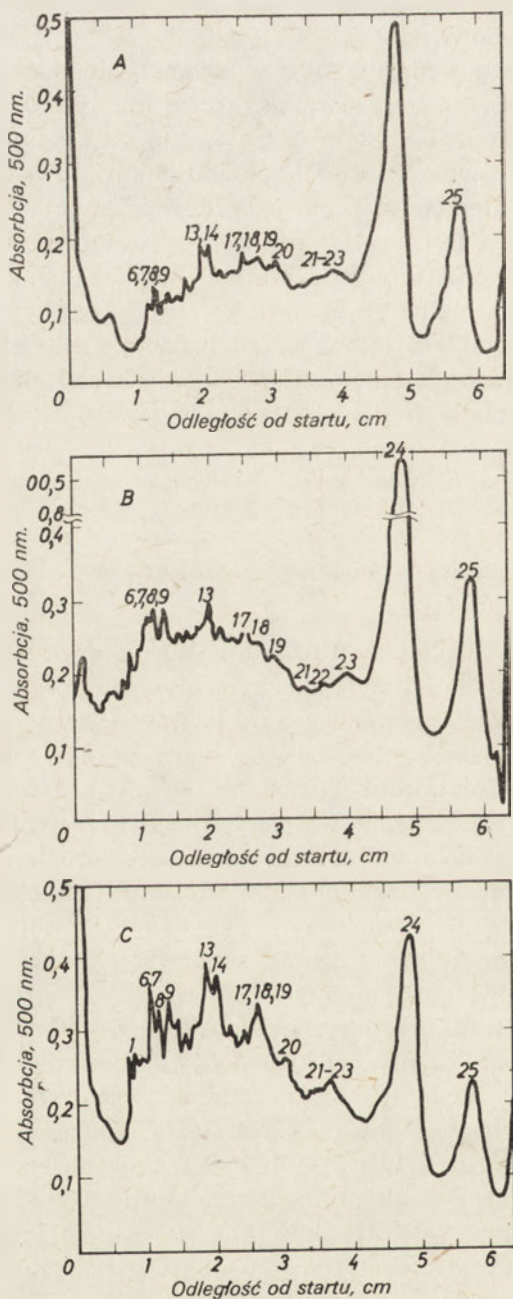
Według nowszych doniesień (56), w chromatynie eukariotów występują również białka o różnej masie cząsteczkowej (od 10 000 do 190 000) należące do grupy glikoproteidów, a także wolne glukozaminoglukany. Rola wymienionych cukrów w czynności genomu eukariotów jest niejasna.

Trudności z ustaleniem stopnia specyficzności asocjacji niehistonowych białek chromatyny z DNA wynikają między innymi z niemożliwości wyizolowania ich z chromatyny w formie natywnej. Dlatego też charakterystyka enzymatyczna białek chromatynowych oraz ich topologia w obrębie chromosomu muszą być ustalone przed izolacją. Obiecującą metodą wydaje się być zastosowanie fluoryzujących przeciwciał skierowanych przeciwko określonym białkom niehistonowym (cyt. za 9). Duże znaczenie w badaniach białek niehistonowych ma fakt, że w obecności soli sodowej kwasu dodecylo-siarkowego (SDS), białka nie tracą swoich właściwości antygenowych (9).

III. Udział niehistonowych białek chromatyny w aktywacji genów pod wpływem hormonów

Próby poznania mechanizmu działania hormonów sterydowych doprowadziły do wniosku, że ich specyficzny wpływ na komórki docelowe wywierany jest w formie aktywacji genu. Pierwsze obserwacje z tego zakresu dotyczyły pojawienia się RNA (zidentyfikowanego później jako mRNA) w kilka do kilkanaście minut od podania hormonu. Np. już w 2 min. po podaniu estrogenu stwierdzono wzrost syntezy RNA w macicy (57). Wielokrotnie zaobserwowano również syntezę mRNA owoalbuminy i owoalbuminy po wstrzyknięciu estradiolu i progesteronu kurczętom (58,59,60). Podobny wzrost syntezy RNA zaobserwowano podczas inkubacji jąder komórkowych z hormonem *in vitro*. Pierwsze obserwacje dotyczące indukcji transkrypcji pod wpływem następujących hormonów: kortyzolu, estradiolu, testosteronu, ekdyzonu, tyroksyny, aldosteronu, ACTH, TSH, insuliny, erytropoetyny, progesteronu oraz kwasu giberelinowego opracował K a r l s o n już w 1968 r. (61). Aktywacji genu pod wpływem hormonów towarzyszył wzrost syntezy niehistonowych białek chromatyny oraz zmiany w stopniu ich fosforylacji. W wątrobie kurczęcia zaobserwowano selektywną syntezę dwóch frakcji białek niehistonowych 26 000 i 20 000 daltonów) po 3 godz. od podania 17- β -estradiolu (62). Wzrost syntezy pewnych frakcji białek niehistonowych (Ryc. 1) oraz zmiany w poziomie ich fosforylacji wykazano również w procesie rozwoju jąder i nadjądrzy szczura (63).

Przeprowadzając badania nad wpływem testosteronu na komórki gruczołu krokowego szczura zaobserwowano wzrost poziomu fosforylacji białek niehistonowych i histonów, przy równoczesnym braku zmian w poziomie fosforylacji białek wątrobowych (64).



Ryc. 1. Profile densytometryczne elektroforetycznego rozdzielania kwaśnych białek chromatynowych jąder szczura, izolowanych w 5-tym(A), 24-tym(B) i 44-tym dniu życia (63).

W miarę rozwoju badań nad układami hormonalnymi wykazano, że wybiórcze działanie poszczególnych hormonów na tkanki zależy od obecności swoistych receptorów na powierzchni komórek. Dalsze badania wykazały, że receptorami są określone białka specyficznie wchodzące w interakcję z danym hormonem, czego następstwem jest swoista stymulacja komórki. Najbardziej istotnym momentem stymulacji komórki pod wpływem interakcji hormonu z receptorem komórkowym jest wędrówka kompleksu receptor — hormon do jądra komórkowego oraz związanie z chromatyną.

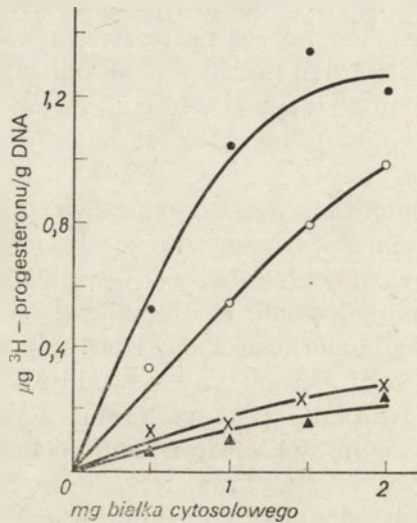
Stwierdzono, że kompleks progesteronu z cytosolowym receptorem jajowodu wiąże się z chromatyną jajowodu dziesięciokrotnie silniej niż wolny hormon (65). Porównanie efektywności wiązania kompleksu hormon—receptor z chromatyną jajowodu, erytrocytów i śledziony wykazało, że wiązanie z chromatyną komórki docelowej jest najsilniejsze. Celem ustalenia, która z komponent chromatyny powoduje najsilniejsze wiązanie hormonu, określano wiązanie ^3H -progesteronu z chromatyną natywną, z układem heterologicznym, w którym frakcję histonową jajowodu zastąpiono histonami grasicy, oraz z chromatyną jajowodu pozbawioną białek niehistonowych (nukleohiston). Tylko usunięcie frakcji białek niehistonowych obniżało wiązanie kompleksu, co może świadczyć o ich udziale w wiązaniu hormonu (65).

Niehistonowe białka chromatyny jajowodu kurcząc rozdzielono na cztery frakcje, z których dwie określone jako AP_1 i AP_2 (*Acidic Protein*) wykazywały silne wiązanie z DNA, podczas gdy pozostałe — AP_3 i AP_4 — wiązanie bardzo słabe (66). W związku z tą obserwacją próbowano oznaczyć efektywność wiązania ^3H -progesteronu w kompleksie z cytosolowym receptorem jajowodu z chromatyną jajowodu rekonstruowaną z poszczególnymi frakcjami białek niehistonowych (Ryc. 2). Usunięcie frakcji AP_3 najbardziej osłabiało wiązanie kompleksu, podczas gdy usunięcie pozostałych frakcji tylko nieznacznie wpływało na efektywność tego wiązania (67). Chromatyna jajowodu pozbawiona frakcji AP_3 (homologicznej) i rekonstruowana z frakcją AP_3 z erytrocytów, traciła zdolność wiązania kompleksu hormon—receptor, natomiast chromatyna erytrocytów rekonstruowana z frakcją AP_3 z jajowodu, uzyskiwała pełną zdolność wiązania progesteronu (68).

Według nowszych doniesień (69), po usunięciu frakcji AP_1 oraz AP_2 z chromatyny śledziony lub erytrocytów, następowało takie samo wiązanie kompleksu progesteron-receptor, jak z chromatyną komórek docelowych. Frakcje AP_3 dla danego hormonu występują więc również w komórkach niedocelowych, ale są w 100% maskowane przez frakcje AP_1 i AP_2 .

Ze względu na przechodzenie cytosolowego receptora do jądra komórkowego i w konsekwencji łączenie się jego z chromatyną sugeruje się, że cytosolowy receptor hormonu stanowi prekursor jednego z wielu białek niehistonowych wchodzących w skład chromatyny.

Spośród wielu białek receptorowych najlepiej poznano dotychczas receptor progesteronu. Tak np. receptor cytoplazmatyczny progesteronu wyizolowany z komórek macicy ludzkiej posiada stałą sedymentacji 3,7S oraz



Ryc. 2. Wiązanie preinkubowanego z cytosolem jajowodu ^3H -progesteronu z chromatyną jajowodu rekonstruowaną z poszczególnymi frakcjami niehistonowych białek kwaśnych: (●) z całkowitą pulą kwaśnych niehistonowych białek, z wyłączeniem frakcji: AP_2 (○), AP_2 i AP_3 (×) oraz AP_2 , AP_3 i AP_4 (▲) (67).

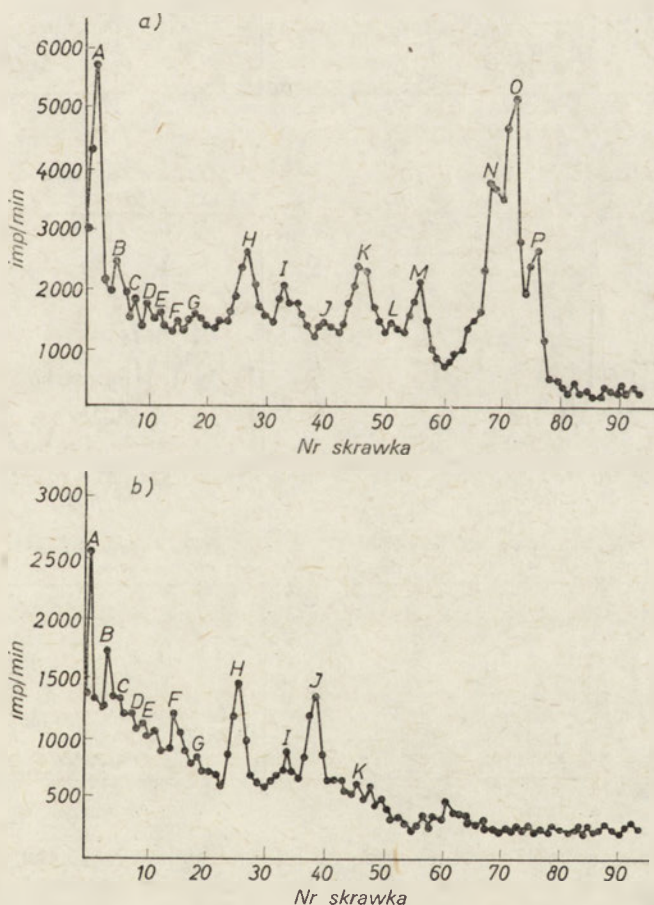
masę cząsteczkową 110 000 (69). Szczegółowe badania białka cytoplazmatycznego z jajowodu kurczęcia, wiążącego progesteron przeprowadzono w pracowni O' Malleya. Wykazano, że receptor ten jest dimerem, złożonym z dwóch podjednostek A i B występujących w równomolowych stężeniach, obu o stałej sedymentacji 4S, w kompleksie charakteryzującym się stałą sedymentacji równą 6S (70,71). Masa cząsteczkowa obydwu podjednostek wynosi odpowiednio 110 000 i 117 000 (72). Wolne podjednostki mają jednakową zdolność wiązania hormonu i przechodzenia do jądra (73). Dimery przechodzą do jądra i wiążą się z homologiczną chromatyną wyłącznie po utworzeniu kompleksu z dwiema cząsteczkami hormonu (68). Komponenta A wiąże się zarówno z homo- jak i heterologicznym DNA, nie wiąże się natomiast z izolowaną chromatyną (73). Komponenta B zaś wiąże się z izolowaną homologiczną chromatyną, nie wiąże się z DNA. Zjawisko to zdaje się sugerować niezależną interakcję obu podjednostek z genomem. W badaniach *in vitro*, podjednostka B wykazywała zdolność wiązania z frakcją AP_3 białek niehistonowych (74).

Na podstawie przeprowadzonych badań opracowano hipotetyczny model działania hormonów sterydowych (68). Zgodnie z tym modelem receptor w cytoplazmie ma występować w formie dimeru i po przyłączeniu dwóch cząsteczek hormonu ulegałby aktywacji w bliżej nieokreślony sposób. Kompleks hormon — receptor, po przejściu do jądra wiązać się ma z chro-

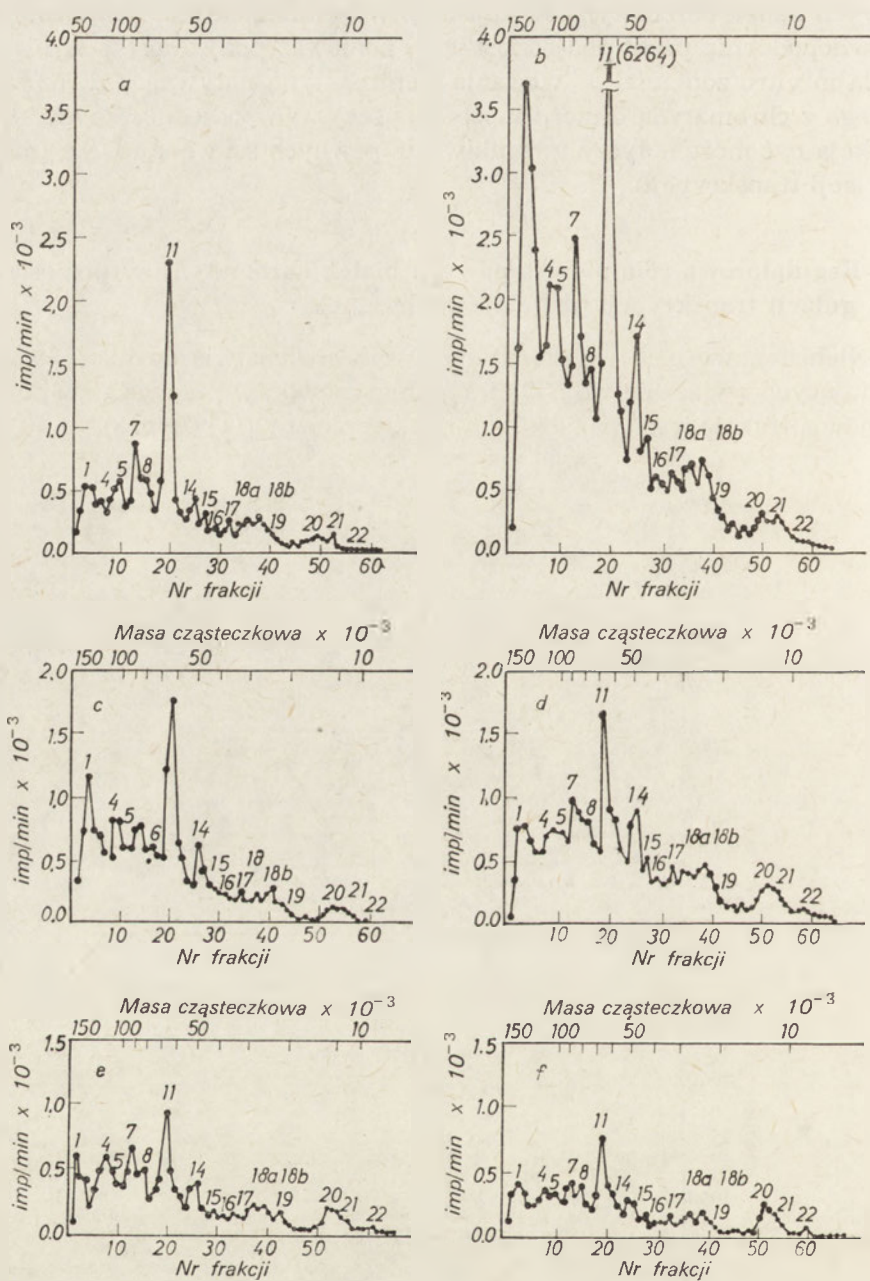
matyną w miejscu akceptorowym, wyznaczonym przez pozycję niehistonowych białek chromatyny frakcji AP₃. Wiązanie z chromatyną następuje prawdopodobnie przez podjednostkę B, ponieważ podjednostka A nie posiada *in vitro* zdolności do wiązania z chromatyną natywną. Od raz związanego z chromatyną dimeru może oddysocjować podjednostka A, której funkcja być może dotyczy wyszukiwania pewnych sekwencji DNA (miejsce inicjacji transkrypcji).

IV. Regulatorowa rola niehistonowych białek chromatyny w procesie regulacji transkrypcji (dane doświadczalne)

Niehistonowe białka chromatyny w przeciwieństwie do histonów występujących wyłącznie we frakcji chromatynowej, w przeważającej części stanowią frakcje wspólne z białkami nukleoplazmy (11) (Ryc. 3).



Ryc. 3. Profile elektroforetyczne białek jądrowych znakowanych L-¹⁴C-leucyną: a) białka chromosomalne, b) białka nukleoplazmatyczne (11). Białka niehistonowe migrują w frakcjach 1—60, białka histonowe 61—95.



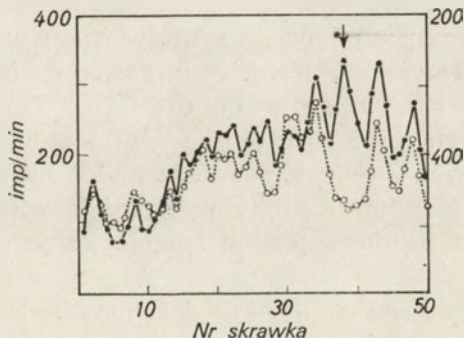
Ryc. 4. Włączenie znakowanej leucyny do frakcji niehistonowych białek rozdzielonych elektroforetycznie: a) wczesna faza G₁; b) późna faza G₁; c) wczesna faza S; d) środkowy okres fazy S; e) późna faza S; f) faza G₂ (75).

Sugeruje się, że właśnie te „płynne” białka niehistonowe, znajdujące się w stanie równowagi z pulą białek nukleoplazmy, mogą stanowić białka regulatorowe.

Elektroforogramy niehistonowych białek chromatyny wykazują znaczne zróżnicowanie jakościowe tych białek. Wykazano, że nawet w tej samej komórce skład białek niehistonowych ulega zmianom wraz ze zmianami w ekspresji genu.

W przeciwieństwie do histonów, których synteza ograniczona jest do fazy S (synteza DNA), synteza specyficznych białek niehistonowych zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego (75).

Zaobserwowano 3—5-krotny wzrost syntezy białek niehistonowych o masie cząsteczkowej powyżej 45 000 daltonów w późnej fazie G_1 komórek jajowych chomika (Ryc. 4). Opóźnieniu fazy S przez hydroksylomocznik towarzyszyła zwiększona synteza białek niehistonowych, natomiast po jego usunięciu — synteza białek niehistonowych gwałtownie malała, utrzymując się jednakże na poziomie właściwym dla danej fazy cyklu życiowego komórki. Gromadzenie się specyficznych białek niehistonowych w fazie G_1 zaobserwowano również w przypadku wrażliwego na temperaturę wariantu B23 klonu komórkowego BALB/3T3 (76) (Ryc. 5).



Ryc. 5. Elektroforetyczny rozdział białek jądrowych wrażliwego na temperaturę klonu komórkowego B23, znakowanych ^3H -tryptofanem (●) i ^{14}C -tryptofanem (○). Komórki inkubowano 16 godz. w 38°C (faza G_1) i znakowano ^3H -tryptofanem lub w 33°C (faza S) znakując ^{14}C -tryptofanem. Strzałka wskazuje frakcje białek niehistonowych pojawiające się w fazie S (histony tryptofanu nie zawierają) (76).

Obecność białek niehistonowych specyficznych dla poszczególnych faz cyklu komórkowego zdaje się świadczyć o ich regulacyjnej funkcji.

Zauważono też, że euchromatyna zawiera więcej białek niehistonowych niż nieaktywna w transkrypcji heterochromatyna (Tabela 2) (32), co stanowi argument przemawiający za udziałem tych białek w aktywacji genu.

Tabela 2

Analiza frakcji euchromatyny i heterochromatyny, rozdzielonych metodą swobodnej elektroforezy cieczowej (33)

Dezoksyrybonukleoproteid	Histony/DNA (mg/mg)	Białka niehistonowe/DNA (mg/mg)
Euchromatyna	1,01 ± 0,05	0,31 ± 0,03
Heterochromatyna	0,87 ± 0,08	0,13 ± 0,02

IV-1. Rekonstrukcja chromatyny *in vitro*

Koncepcję udziału niehistonowych białek chromatyny w specyficznej derepresji genu zdają się potwierdzać badania nad rekonstrukcją chromatyny *in vitro* z poszczególnych jej elementów. Jak wykazały doświadczenia z rekonstruowaną chromatyną grasicy i szpiku kostnego (77), białka niehistonowe odblokowują ściśle określone fragmenty DNA, nadając transkrypcji charakter tkankowo specyficzny. Późniejsze badania transkrypcji RNA w obecności DNA, histonów z grasicy oraz szpiku kostnego i różnych białek niehistonowych wykazały, że rodzaj syntetyzowanego RNA zależy wyłącznie od pochodzenia białek niehistonowych, a nie zależy od DNA lub histonów. I tak w obecności białek niehistonowych z grasicy mimo obecności nukleohistonu szpikowego syntetyzowany był wyłącznie RNA grasiczy, zaś w obecności nukleohistonu grasiczego i białek niehistonowych szpikowych — RNA szpikowy (78).

Podobnie, rekonstruując chromatynę erytrocytów kurzczenia z DNA i histonów izolowanych z erytrocytów oraz białek niehistonowych pochodzących z erytrocytów lub wątroby wyciągnięto wniosek, że ekspresja globinowego genu uzależniona jest od homologicznych białek niehistonowych (79).

Inne doświadczenia wskazują, że na chromatynie komórek linii ciągłej myszy L5178Y, nie syntetyzujących globiny, może być transkrybowany mRNA globiny *in vitro*, w obecności białek niehistonowych płodowej wątroby mysiej, w której w okresie płodowym powstaje hemoglobina (80).

Badania nad rekonstrukcją chromatyny retikulocytów i komórek mózgu wykazały, że specyficzny przebieg transkrypcji w każdej tkance uzależniony jest od obecności frakcji białek niehistonowych silnie związanych z DNA, elektroforetycznie różnych w poszczególnych tkankach (frakcje NP), nie zależy natomiast zupełnie od innej frakcji słabo związanej z DNA, identycznej elektroforetycznie w różnych tkankach (frakcje UP). Używając chromatyny komórek mózgu rekonstruowanej w obecności frakcji NP z retikulocytów uzyskano transkrypcję RNA globiny taką samą, jaką uzyskiwano stosując natywną chromatynę retikulocytów (81). Podobne badania nad rekonstrukcją chromatyny z komórek w fazie S pozwoliły stwier-

dzić, że zwiększona transkrypcja zachodząca w fazie S związana jest z obecnością niehistonowych białek chromatyny specyficznych dla tej fazy. Białka niehistonowe izolowane z fazy M, dodane do układu rekonstrukcyjnego zawierającego DNA i histony z fazy S nie powodowały syntezy RNA (cyt. za 4). Zaobserwowano, że chromatyna komórek HeLa rekonstruowana przy udziale białek niehistonowych z fazy S, w której zachodzi synteza histonów, może służyć jako matryca do syntezy histonowego mRNA, natomiast rekonstruowana z białkami z fazy G₁, w której histony nie są syntetyzowane nie wykazuje tej właściwości (82,83). Ponieważ geny histonowanego mRNA są w komórkach HeLa powtarzalne, istnieje możliwość, że pojedyncza komórka zawiera również wielokrotne kopie białek kontrolujących ekspresję histonowych genów.

Stosując selektywną dysocjację histonów z chromatyny komórek HeLa S₂, wykazano, że histony są w fazie S silniej związane z DNA niż w fazie M, przy czym w obu tych fazach są one identyczne. Skład niehistonowych białek był natomiast charakterystyczny dla każdej z badanych faz (S i M). W celu określenia funkcji białek niehistonowych przeprowadzono rekonstrukcję chromatyny z DNA oraz histonów pochodzących z fazy S i M oraz białek niehistonowych z fazy S lub M. Chromatyna rekonstruowana z białkami niehistonowymi z fazy S zawierała silniej związaną frakcję histonów, niż rekonstruowana z białkami niehistonowymi z fazy M, co może sugerować udział niehistonowych białek chromatyny w regulacji oddziaływania histonów jako niespecyficznych represorów genów w cyklu życiowym komórki (14).

IV-2. „Obrót metaboliczny” białek niehistonowych

W przeciwieństwie do histonów, stanowiących wolno ulegającą metabolizmowi i niespecyficzną grupę białek stale związanych z chromatyną, białka niehistonowe cechuje bardzo szybki „obrót metaboliczny”. Wśród nich najszybszym przemianom ulegają białka wysokocząsteczkowe, najwolniejszemu — niskocząsteczkowe (17).

Zaobserwowano szybki „obrót metaboliczny” pewnych frakcji białek niehistonowych z fibroblastów kurczenia, hodowanych *in vitro* na różnych pożywkach: 1. pełnowartościowej pożywce minimalnej (1% surowica wołowa), 2. 30% surowicy wołowej (są to warunki, które stymulują komórki do proliferacji), 3. 1% surowicy wołowej pozbawionej lizyny (18). Stymulacji komórek do proliferacji towarzyszyła synteza frakcji białek niehistonowych charakterystycznej wyłącznie dla tych komórek, określonej jako „frakcja charakterystyczna dla komórek stymulowanych”, natomiast w pożywce pozbawionej lizyny komórki syntetyzowały inną frakcję, określoną jako „frakcja charakterystyczna dla komórek pozbawionych egzogennej lizyny”. Wymiana pożywki na pożywkę zawierającą 30% surowicy, ale

nie zawierającą lizyny powodowała syntezę frakcji „charakterystycznej dla komórek stymulowanych”, przy zaniku frakcji „charakterystycznej dla komórek pozbawionych lizyny”. Ten sam efekt uzyskano przez wymianę 1% surowicy pozbawionej lizyny na 30% surowicę. Sugeruje to szybki „obrót metaboliczny” frakcji białek niehistonowych „charakterystycznej dla komórek pozbawionych lizyny”. Wydaje się, że ta frakcja białek niehistonowych może kontrolować syntezę pewnych enzymów proteolitycznych odpowiedzialnych za katobolizm białkowy.

Szybki „obrót metaboliczny” wykazuje jednak tylko część białek niehistonowych, prawdopodobnie frakcja białek o właściwościach regulatorowych, ilościowo niewielka, maskowana często przez inne białka niehistonowe o „obrocie metabolicznym” identycznym z cechującym histony i DNA (19).

IV-3. Udział niehistonowych białek chromatyny w kontroli proliferacji i różnicowaniu się komórek

Podstawowym czynnikiem regulującym proliferację komórek *in vitro* na zasadzie hamowania kontaktowego jest zagęszczenie hodowli (*density dependent regulation*) (84). Mechanizm zjawiska zahamowania kontaktowego jest od lat dwudziestu przedmiotem wielu badań i dyskusji. Przyjmuje się na ogół, że czynnikami kontrolującymi podziały komórkowe w hodowlach o dużym zagęszczeniu mogą być między innymi wydzielane z komórek do środowiska wielkocząsteczkowe związki o różnym charakterze, jak również różne związki niskocząsteczkowe. W związku z tym nasuwa się wniosek, że wielokrotnie opisywane zwiększenie intensywności syntezy niehistonowych białek w trakcie proliferacji komórek może mieć związek z kontrolowaną przez niehistonowe białka syntezą wielu z wymienionych czynników.

Stwierdzono, że indukcji proliferacji ludzkich limfocytów przez konkanawalinę A lub fitohemaglutyninę towarzyszy zawsze ilościowy wzrost zawartości białek niehistonowych w chromatynie (4-krotny po 6 godz. stymulacji konkanawaliną), wraz z zwiększeniem poziomu fosforylacji tych białek (4-krotny po 2 godz. stymulacji). Znakowanie komórek przed stymulacją oraz zastosowanie procedury frakcjonowania limfocytów w środowisku bezwodnym wykazało cytoplazmatyczne pochodzenie specyficznych frakcji białek niehistonowych pojawiających się w chromatynie stymulowanych limfocytów (10).

Zaobserwowano również wzrost intensywności syntezy niehistonowych białek chromatyny w stymulowanych fitohemaglutyniną limfocytach świnki morskiej (15) oraz syntezę dwóch frakcji białek niehistonowych w stymulowanych do proliferacji ludzkich dipoidalnych fibroblastach linii WI-38 (16).

Podobnie, porównując rozdziały elektroforetyczne białek jądrowych izolowanych z chrząstki embrionów kurcząt oraz analogicznej chrząstki po

3 dniach różnicowania *in vitro*, stwierdzono zanik pewnej frakcji białek niehistonowych, co może świadczyć o udziale tej frakcji białek niehistonowych w procesie różnicowania komórek (85).

V. Badania mRNA niehistonowych białek chromatyny.

Interesujące badania trwałości mRNA niektórych frakcji białek niehistonowych komórek młodych i starzejących się przeprowadzono na proliferujących ludzkich diploidalnych fibroblastach linii WI-38 (16). Linia ta jest powszechnie uznawana za dobry model do badania procesów starzenia komórek. Komórki te z 17-go i 18-go pasażu potraktowano jako „młode”, a z 41—48-go pasażu jako „stare”. W stanie spoczynkowym białka niehistonowe izolowane z komórek „młodych” i „starych” nie różniły się. Po 1 godz. stymulacji komórek surowicą wołową, w obu pasażach pojawiały się identyczne frakcje białek niehistonowych, różne od występujących w komórkach niestymulowanych. W następnym doświadczeniu stymulowano komórki obydwu rodzajów surowicą wołową w obecności aktynomycyny D, w dawce całkowicie hamującej transkrypcję. W tym układzie białka niehistonowe komórek „młodych” nie różniły się od białek niehistonowych komórek stymulowanych w nieobecności aktynomycyny D, natomiast białka niehistonowe komórek „starych” były identyczne z białkami znajdującymi w komórkach niestymulowanych. Zdaniem autorów, sugeruje to preegzystencję mRNA dla syntezy pewnych frakcji białek niehistonowych w komórkach „młodych” przy braku tego mRNA w komórkach „starych”.

Badania nad translacją mRNA z blastuli jeżowca (86) wykazały, że mRNA niektórych białek niehistonowych (zidentyfikowany jako mRNA białek niehistonowych na podstawie wbudowywania tryptofanu do syntetyzowanych przy jego udziale białek oraz ich nierozpuszczalności w kwasach) nie zawiera fragmentu poliA. Następstwem tego może być obniżona trwałość mRNA dla pewnych frakcji białek niehistonowych, co być może warunkuje ich niezwykle szybki obrót metaboliczny, a tym samym precyzyjną interakcję z DNA podczas indukcji aktywności genu.

Uwagi końcowe.

Niejednorodność niehistonowych białek chromatyny, ich szybki „obróć metaboliczny”, ilościowa i jakościowa specyficzność gatunkowa i tkankowa, specyficzny skład w komórkach w poszczególnych fazach cyklu, większa zawartość w miejscach euchromatynowych niż heterochromatynowych, zmiany w składzie białek niehistonowych podczas indukcji aktywności genu, pośrednictwo w działaniu hormonu na tkanki docelowe, interakcja z DNA i histonami oraz zmiany stopnia fosforylacji, przemawiają za regulacyjną czynnością białek niehistonowych.

Koncepcja regulacji aktywności genu przez specyficzne niehistonowe białka chromatyny ma jednak swoich przeciwników. Ich zdaniem, zachodząca pod wpływem induktorów aktywacja genu jest konsekwencją wzrostu syntezy enzymów zaangażowanych w procesie transkrypcji, wchodzących również w skład białek niehistonowych, a nie syntezy regulatorowych białek niehistonowych.

Nie można negować, że większość białek niehistonowych syntetyzowanych w okresie wzrostu aktywności genu to białka enzymatyczne, związane z procesem transkrypcji. Omawiane jednak wyżej procesy swoistej indukcji przeczą tak jednostronnemu ujmowaniu roli białek niehistonowych w komórce.

Duże znaczenie w aktywacji genu przypisuje się też takim modyfikacjom, jak: fosforylacji, metylacji i acetylacji białek niehistonowych. Wydaje się jednak, że modyfikacje białek niehistonowych, którym ulegają również histony oraz wiele innych białek enzymatycznych nie odpowiadają warunkom, które powinien spełniać model mechanizmu wyszukującego specyficzne sekwencje genu z następującą ich derepresją.

Specyficzność wobec sekwencji nukleotydowych DNA wykazuje tylko pewna frakcja białek niehistonowych, określana przez poszczególnych autorów jako: frakcja AP₃ silnie związana z DNA (67,68); frakcja NP nadająca specyficzność rekonstruowanej chromatynie (81); frakcja wiążąca się specyficznie z homologicznym DNA (41); frakcja immunologicznie specyficzna (57); frakcja wykazująca szybki obrót metaboliczny (17,18); frakcja pojawiająca się podczas proliferacji (10,15,16) lub procesu różnicowania komórkowego (85); oraz frakcja oddziałująca z metalami ciężkimi (52). Wydaje się, że wymienione „frakcje” białek niehistonowych odpowiadają grupie regulatorowych białek niehistonowych.

Warunkiem regulatorowej funkcji białek niehistonowych jest ich specyficzność względem DNA. Badania wiązania białek niehistonowych z DNA-celulozą (41,42) lub DNA-Sepharose (44) w układzie homo- lub heterologicznym pozwoliły wykazać specyficzność pewnej frakcji białek niehistonowych.

Wreszcie koncepcja dotycząca oddziaływania kompleksu hormon-receptor ze specyficzną frakcją niehistonowych białek chromatyny (AP₃), (68,74), zdaje się potwierdzać specyficzność niehistonowych białek chromatyny jako regulatorów czynności genów.

Obecny poziom badań białek niehistonowych nie pozwala jeszcze na pełne sprecyzowanie ich roli w procesach regulacji czynności genu. Zaproponowano więc tylko kilka mniej lub więcej spekulatywnych modeli. Jedną z nowszych hipotez (51) przyjmuje, iż decydujący udział w transkrypcji biorą następujące czynniki: cząsteczki polimerazy RNA, białek informatorowych, represorowych, akceptorowych i efektorowych. Związanie białka efektorowego, np. receptora sterydów, z miejscem akceptorowym DNA

w nieobecności represorów umożliwia rozpoczęcie transkrypcji przy udziale polimerazy RNA.

Artykuł nadszedł 17.4.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 26.11.1976.

PIŚMIENNICTWO

1. Kłyszajko-Stefanowicz L., Polanowska Z., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 601—629.
2. Comings D. E., (1972) w *Advances in Human Genetics*, red. Harris H., Hirschhorn D., t. 3, str. 267—276, Plenum Press, New York, London.
3. Kiliańska Z., Kłyszajko-Stefanowicz L., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 533—538.
4. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J., (1974), *Science*, **18**, 817—824.
5. Kiliańska Z., Kłyszajko-Stefanowicz L., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 31—51.
6. Horst A., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 127—153.
7. Douvas A. S., Harrington Ch. A., Bonner J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3902—3906.
8. Lestougeon W. M., Forer A., Yang Y. Z., Bertram J. S., Pusch H. P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 529—552.
9. Elgin S. C. R., Stumph W. E., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E. W., str. 113—123, Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford—New York.
10. Johnson E. M., Karn J., Allfrey V. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4990—4999.
11. Stein G. S., Thrall C. L., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 41—45.
12. Hancoch R., (1969), *J. Mol. Biol.*, **40**, 457—466.
13. Smith E., DeLange R. J., Bonner J., (1970), *J. Physiol. Rev.*, **50**, 159—170.
14. Stein G. S., Hunter G., Lavie L., (1974), *Biochem. J.*, **139**, 71—76.
15. Levy R., Levy S., Rosenberg S. A., Simpson R. T., (1973), *Biochemistry*, **12**, 224—231.
16. Stein G. S., Burtner D. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 56—68.
17. Dice J. F., Shimke R. T., (1973), *Arch. Biochim. Biophys.*, **158**, 97—105.
18. Courtois Y., Dastugue B., Krush J., (1974), *Exp. Cell. Res.*, **83**, 152—158.
19. Seale R. L., (1975), *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **63**, 140—148.
20. Spelsberg T. C., Mitchell W. M., Chytil F., (1973), *Moll. Cell. Biochem.*, **1**, 243—246.
21. Augenlicht L. H., Beserga R., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 89—96.
22. Umansky S. R., Kovalev Y. J., Tokarskaya V. I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 242—254.
23. Bhorjee J. S., Pederson T., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **418**, 154—159.
24. Yoshida M., Shimura K., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 690—696.
25. MacGillivray A. J., Carrol D., Paul J., (1971), *FEBS Letters*, **13**, 204—208.
26. Rickwood D., MacGillivray A., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 593—601.

27. Van den Broek H. W. J., Nood E. D., Sevall J. S., Bonner J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 230—236.
28. Sanders L. A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 527—532.
29. Monahan J. J., Hall R. H., (1974), *Anal. Biochem.*, **62**, 217—239.
30. Show L. S., Blanco J., Mueller G. C., (1975), *Anal. Biochem.*, **65**, 125—131.
31. Monahan J. J., Hall R. S., (1975), *Anal. Biochem.*, **65**, 187—203.
32. Warnecke P., Kruse K., Harbers E., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **351**, 295—304.
33. Arnold E. A., Young K. E., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 482—496.
34. Weber K., Osborn M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
35. Smith M. C., Chae Ch. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 10—19.
36. Panyim S., Chalkley R., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337—346.
37. Sonnenbichler J., Zetl J., (1975), *Anal. Biochem.*, **64**, 74—79.
38. Gronow M., Thackrah T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 377—386.
39. Smith J. A., Stocken J. A., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 859—861.
40. Patel N., Holoubek V., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 524—530.
41. Kleinsmith L., Heidema J., Carrol A., (1970), *Nature*, **226**, 1025—1026.
42. Kleinsmith L. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5648—5653.
43. Courtois Y., Dastugue B., Kamiyana M., Kruh J., (1975), *FEBS Letters*, **50**, 253—256.
44. Allfrey V. G., Inoue A., Karn J., Johnson E. M., Good R. A., Hadden J. W., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wostenholme G. E. W., str. 199—219, Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford—New York.
45. Shechan D. M., Olins D. E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **253**, 438—446.
46. MacGillivray A., Rickwood D., Paul J., (1972), *Proc. Biochem. Soc.*, 52p w *Biochem. J.*, **129**.
47. Fujitani H., Holoubek V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 180—185.
48. Carter D. B., Chae Ch. B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 180—185.
49. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutman E. D., Perris P. L., (1966), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 289—300.
50. Hadwiger L. A., Von Broembsen S., Eddy R., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1120—1128.
51. Paul J., Gilmour R. S., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found Symp. 28, red. Fitzsimons D. W., Wolstenholme G. E. W., str. 181—192, Ass. Sci. Publ. Amsterdam, Oxford—New York.
52. Chanda S. K., Cherioan M. G., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1013—1019.
53. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1182—1189.
54. Karn J., Johnson E. M., Vidali G., Allfrey V. G. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 667—677.
55. Kleinsmith L. J., Stein J., Stein G., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1174—1178.
56. Stein G. S., Roberts R. M., Davis J. L., Head W. J., Stein J. L., Thrall C. L., Van Veen J., Welch D. W., (1975), *Nature*, **258**, 639—641.
57. Means A. R., Hamilton R. H., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1594—1598.
58. Harris S. E., Means A. R., Mitchell W. M., O'Malley B. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3776—3780.

59. McKnight G. S., Pennequin P., Schimke R. T., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8105—8110.
60. Schwartz R. J., Tsai M. J., Tsai S. Y., O'Malley B. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5175—5182.
61. Karlson P., (1968), *Humangenetics*, **6**, 99—109.
62. Dierks-Ventling C., Jost J. P., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 33—40.
63. Kadohama N., Turkington R. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6225—6233.
64. Schauder P., Staram B. J., Williams R. H., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 331—333.
65. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4188—4196.
66. Spelsberg T. C., Mitchell W. M., Chytil F., Wilson E. M., O'Malley B. W., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **312**, 765—778.
67. O'Malley B. W., Spelsberg T. C., Schrader W. T., Chytil F., Steggles W., (1972), *Nature*, **235**, 141—144.
68. O'Malley B. W., Schrader W. T., (1976), *Sci. Am.*, 32—43.
69. Spelsberg T. C., Webster R. A., Pikler G. M., (1976), *Nature*, **262**, 65—67.
70. Schrader W. T., O'Malley B. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 51—59.
71. Schrader W. T., Heurer S. S., O'Malley B. W., (1975), *Biol. Reprod.*, **134**, 134—142.
72. Kuhn R. W., Schrader W. T., Smith R. G., O'Malley B. W., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4220—4228.
73. Schrader W. T., Toft D. O., O'Malley B. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2401—2407.
74. O'Malley B. W., Schrader T., Spelsberg T. C., (1973), *Adv. Exp. Med. Biol.* **36**, 174—196.
75. Gerner E. W., Humphrey R. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 117—127.
76. Naha P. M., Meyer A. L., Hewitt K., (1975), *Nature*, **258**, 49—53.
77. Paul J., Gilmour R. S., (1968), *J. Mol. Biol.*, **34**, 305—316.
78. Gilmour R. S., Paul J., (1970), *FEBS Letters.*, **9**, 242—244.
79. Barret T., Maryanka D., Hamlyn P. H., Gould H. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 5057—5061.
80. Gilmour R. S., Windass J. D., Affara N., Paul J., (1975), *J. Cell. Physiol.*, **85**, 449—458.
81. Chin J. F., Tsai Y. H., Saluma K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9431—9433.
82. Stein G., Park W., Thrall C., Mans R., Stein J., (1975), *Nature*, **257**, 764—767.
83. Stein J. L., Reed G., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3291—3295.
84. Holley R. W., (1975), *Nature*, **258**, 487—490.
85. Newman S. A., Birnbaum J., Yeoch G. C. T., (1976), *Nature*, **259**, 417—419.
86. Fromson D., Verma D. P., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 148—151.

20. ...
 21. ...
 22. ...
 23. ...
 24. ...
 25. ...
 26. ...
 27. ...
 28. ...
 29. ...
 30. ...
 31. ...
 32. ...
 33. ...
 34. ...
 35. ...
 36. ...
 37. ...
 38. ...
 39. ...
 40. ...
 41. ...
 42. ...
 43. ...
 44. ...
 45. ...
 46. ...
 47. ...
 48. ...
 49. ...
 50. ...

JÓZEF JULIAN BUJARSKI*), STEFAN PASZYC**)

Strukturalne tionukleozydy w badaniach struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych

Structural of Thionucleosides in Investigation of Structure and Function of Transfer Ribonucleic Acids

Spis treści

- I. Występowanie tionukleozydów w tRNA
- II. Modyfikacja chemiczna nukleozydów tiopirymidynowych
 - II-1. Reakcje chemiczne tiourydyn
 - II-2. Chemiczna modyfikacja 4-tiourydyny i pochodnych 2-tiourydyny w tRNA
 - II-2.1. Badanie rozpoznania tRNA przez syntetazę aminoacylo-tRNA
 - II-2.2. Badania konformacji obszaru tRNA wokół 4-tiourydyny
 - II-2.3. Badania konformacji tRNA w roztworze metodą przeniesienia energii fluorescencji
- III. Modyfikacja fotochemiczna tionukleozydów pirymidynowych
 - III-1. Szybkość i wydajność reakcji fotodimeryzacji $s^4U_8 \wedge C_{13}$.
 - III-2. Luminescencja dimeru $s^4U_8 \wedge C_{13}$ oraz tiopirymidyn w tRNA
 - III-3. Fotochemiczne przejście 4-tiourydyny w urydynę.
- IV. Inkorporacja tionukleozydów do tRNA
 - V. Badania oddziaływań w oligo- i polinukleotydach zawierających siarkę
- VI. Uwagi końcowe.

Contents

- I. Thionucleosides in tRNA
- II. Chemical modification of thiopyrimidine nucleosides
 - II-1. Chemical reactions of thiouridines
 - II-2. Chemical modification of 4-thiouridine and 2-thiouridine derivatives in tRNA

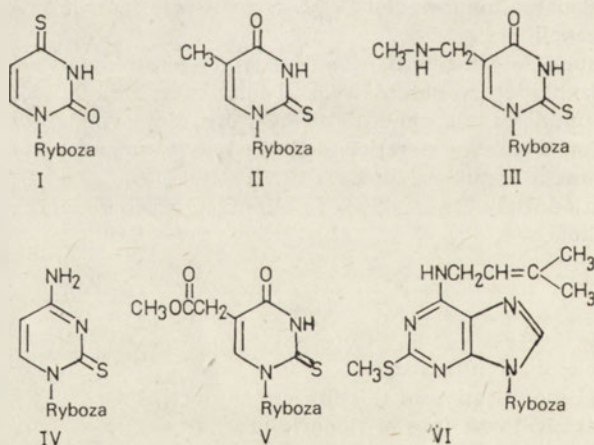
*) Dr, **) Prof. dr hab., Instytut Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów zgodnie z (1): U — urydyna; C — cytydyna; G — guanozyna; 7 MeG — 7-metylo-guanozyna; A — adenozyna; s^4U — 4-tiourydyna; s^2U — 2-tiourydyna; s^2s^4U — 2,4-dwutiourydyna; s^2C — 2-tiocytydyna; $s^4U \wedge s^4U$ — 5-(1'- β -D-rybofuranozyl-4'-pirymidyno-2'-on)-4-tiourydyna; $s^4U \wedge C$ — 5--(1'- β -D-rybofuranozyl-4'-pirymidyno-2'-on)-cytydyna; tRNA — transferowy kwas rybonukleinowy.

- II-2.1. Studies on tRNA recognition by aminoacyl-tRNA-synthetase
- II-2.2. Studies on tRNA in vicinity of 4-thiouridine
- II-2.3. Studies on tRNA conformation in solution by fluorescence energy transfer method
- III. Photochemical modification of pyrimidine thionucleosides
 - III-1. Rate and yield of photodimerisation reaction of s^4U_8 and C_{13} .
 - III-2. Luminescence of $s^4U_8 \wedge C_{13}$ dimer and thiopyrimidines in tRNA
 - III-3. Photochemical transformation of 4-thiouridine into uridine
- IV. Incorporation of thionucleosides in tRNA
 - V. Studies on interactions in the oligo and polythionucleotides
- VI. Final remarks.

I. Występowanie tionukleozydów w tRNA

Transferowe kwasy rybonukleinowe stanowią grupę kwasów nukleinowych, w których oprócz czterech podstawowych nukleozydów (urydyna, cytydyna, guanozyna i adenozyna) występuje cały szereg tzw. nukleozydów zmodyfikowanych. Są to między innymi siarkowe pochodne nukleozydów pirymidynowych: 4-tiourydyna (I), 2-tio-5-metylo-urydyna (II), 5-metyloaminometylo-2-tiourydyna (III), 2-tiocytydyna (IV) oraz ester metowy 2-tio-5-karboksymetylourydyny (V). Budowę tych związków przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Rzadkie nukleozydy pirymidynowe i purynowe zawierające siarkę: 4-tiourydyna (I), 2-tio-5-metylo-urydyna (II), 5-metyloaminometylo-2-tiourydyna (III), 2-tiocytydyna (IV), ester metowy 2-tio-5-karboksymetylourydyny (V), 2-metylotio-N⁶-Δ²-izopentenylo/-adenozylna (VI).

Spośród wszystkich tionukleozydów w tRNA najczęściej występuje 4-tiourydyna. Znalaziono ją w kilkudziesięciu specyficznych tRNA wyizolowanych z organizmów niższych (2). We wszystkich tRNA 4-tiourydyna

zajmuje pozycję 8 licząc od końca 5'. Jest to pozycja między ramionami akceptorowym i dwuhydrourydyny w modelu drugorzędowej struktury tRNA. Jedynie w tRNA₂^{Trp} z *E. coli* znaleziono 4-tiourydynę w pozycjach 8 i 9. Natomiast w obszarze ramienia i pętli antykodonowej występują pochodne 2-tiourydyny. W niniejszym artykule omówiono badania struktury i funkcji tRNA, w których wykorzystuje się obecność tionukleozydów pirymidynowych w cząsteczce kwasu rybonukleinowego. Przedstawiono tutaj przede wszystkim dwie metody badawcze: modyfikację chemiczną i modyfikację fotochemiczną tionukleozydów.

II. Modyfikacja chemiczna nukleozydów tiopirymidynowych.

Jedną z metod badania struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych jest modyfikacja chemiczna nukleozydów znajdujących się w określonym miejscu makrocząsteczki. Reakcje modyfikacji specyficznych tRNA powinny charakteryzować się: selektywnością tzn. wybiórczością wobec określonego nukleozydu lub grupy nukleozydów oraz na tyle łagodnym przebiegiem, by nie zachodziła denaturacja tRNA. Ewentualne zmiany aktywności biologicznej powinny wynikać jedynie z modyfikacji. Reakcje te powinna też cechować duża wydajność przeprowadzonych modyfikacji.

II-1. Reakcje chemiczne tiourydyn.

Badania zasad pirymidynowych zawierających siarkę wykazały, że mają one odmienne własności chemiczne od ich tlenowych analogów. Jeżeli tlenowe pochodne pirymidyn ulegają głównie reakcjom addycji do podwójnego wiązania C₅=C₆, to w tiopirymidynach reaguje łatwo grupa tiokarbonylowa. Wiąże się to z charakterystycznym rozkładem gęstości elektronów w pierścieniu pirymidynowym tiourydyn (3,4). W tabeli 1 pokazano różne reakcje chemiczne 4-tiourydyny i 2-tiourydyny oraz jej pochodnych (wszystkie reakcje są reakcjami grup tiokarbonylowych), które zachodzą z dużymi wydajnościami w umiarkowanych warunkach.

Szereg reakcji wymienionych w tabeli 1 zastosowano do modyfikacji tRNA. W następnych trzech podrozdziałach pokazano główne kierunki badań w tej dziedzinie.

II-2. Chemiczna modyfikacja 4-tiourydyny i pochodnych 2-tiourydyny w tRNA.

II-2.1. Badanie rozpoznawania tRNA przez syntezę aminoacylo-tRNA.

Celem tych badań było poznanie roli 4-tiourydyny i pochodnych 2-tiourydyny w procesie rozpoznawania tRNA przez syntezę aminoacylo-tRNA. Modyfikacja nukleozydów tiopirymidynowych w tRNA za pomocą

Tabela 1

Niektóre modyfikacje chemiczne 4-tiourydyny i pochodnych 2-tiourydyny.

Nr	Czynnik modyfikujący	Produkt ^a	Warunki reakcji ^b			Wydaj- ność %	Pozycja piśmienn. ^c
			pH	°C	godz.		
1	KMnO ₄	RSO K ⁺	7,0	0	0,25	100	5,6,7
2	NaHSO ₃ /O ₂	RSO	7,0	20	—	100	8,7/
3	NaJO ₄	RSO ⁻	7,0	35	—	100	9
4	OsO ₄	RSSR ₆	—	—	—	—	10
5	J ₂	RSSR ₆	6,8	20	—	100	11, 12 ^e (11, 13)
6	H ₂ O ₂	ROH	8,0	20	0,50	100	14
7	HNO ₂	ROH	4,9	37	—	100	15 (15)
8	NH ₂ OH	RNHOH	7,2	37	21	100	16
9	CNBr	RSCN ₆	7,5—8,9	20	0,17	100	17 (18)
10	BMB ^g	RS-BMB	8,3	37	—	72	19
11	HNBzBr ^h	RS-HNBz	10,0	20	12	73	20 (20)
12	HOHgBzCOO ⁻ⁱ	RS-HgBzCOO ⁻	8,0	—	0,08	100	21 (22)
13	HOHgBzSO ₃ ^{-j}	RS-HgBzSO ⁻	7,0	20	—	100	23 (23)
14	RNHCOCH ₂ Br	RS- -CH ₂ CONHR'	8,9	20	0,50	100	24 (25)
15	N-etylomaleinimid	3-RS-1-N-etylo- maleinimid	7,8	37	3	—	26
16	S-benzylotioizotiomocznik	RS-SCH ₂ C ₆ H ₅	7,2	20	0,08	100	27 (27)

^a) R oznacza we wszystkich wzorach tabeli resztę 4-tiourydyny.

^b) Warunki reakcji odnoszą się do s⁺U. Warunki dla pochodnych 2-tiourydyny należy znaleźć w piśmiennictwie (patrz uwaga c).

^c) W nawiasie podano pozycje piśmiennictwa dotyczące pochodnych 2-tiourydyny.

^d) Dwusiarczek można ilościowo przeprowadzić w substrat (s⁺U) działając Na₂S₂O₃ (9, 31) lub β-merkaptioetanolem.

^e) Zaobserwowano również reakcję utleniania 2-metylo-N⁶/Δ²-izopentenylo/-adenozyny — rzadkiego tionukleozydu purynowego (31) (patrz Ryc. 1).

^f) 4-tiocyjanian urydyny ulega łatwo hydrolizie w środowisku kwaśnym lub zasadowym w temperaturze pokojowej (17) lub w środowisku obojętnym w 100°C (28) — w obu wypadkach do urydyny.

^g) 4-bromometylo-2-metoksy-2-okso-2-wodorobenzopiran.

^h) bromek 2-hydroksy-5-nitro-benzylu.

ⁱ) p-hydroksyrtęciobenzoesan.

^j) p-hydroksyrtęciobenzenosulfonian.

bromku cyjanogenu (CNBr) zachodzi w łagodnych warunkach (pH = 8,5, 20°C, 10 min. — patrz reakcja 9 w tabeli 1 (17,28,29). Tworzą się pochodne tiocyjanianowe, które ulegają hydrolizie w wyższych temperaturach do

pochodnych tlenowych (28). Badanie aktywności akceptorowej niefrakcjonowanego tRNA z *E. coli* po uprzednim działaniu CNBr (29) wykazało niewielki spadek aktywności w stosunku do Asp, Gly, His, Leu, Met, Pro, Trh, Tyr i Trp oraz duże zmniejszenie aktywności wobec Glu i Lys. Analiza występowania poszczególnych nukleozydów tiopirymidynowych w cząsteczkach różnych tRNA pozwoliła na wyjaśnienie tych różnic. Okazało się, że tRNA: Asp, Gly, His, Leu, Met, Pro, Trh, Tyr i Trp — zawierają tylko 4-tiourydynę. Można więc sądzić, że modyfikacja 4-tiourydyny w niewielkim stopniu zmienia oddziaływanie tRNA-syntetaza. Działanie CNBr na tRNA^{Tyr} z *E. coli*, który zawiera dwie reszty s⁴U w pozycjach 8 i 9, w buforze o pH=8,5 w temperaturze 100°C, powoduje przejście obydwu tionukleozydów w urydynę (28). Również tutaj aktywność akceptorowa zmodyfikowanego tRNA^{Tyr} zmniejszyła się tylko o około 5%. Natomiast w tRNA^{Glu} i tRNA^{Lys} w pętli antykodonowej występuje pochodna 2-tiourydyny: 5-metyloamino-metylo-2-tiourydyna. Modyfikacja tionukleozydu w tym obszarze zdecydowanie zmniejsza zdolność do przyłączania aminokwasu. Opisane wyżej reakcje z CNBr są bardzo cenne ze względu na możliwość otrzymania zmodyfikowanego tRNA, w którym w miejscu s⁴U znajduje się nukleozyd główny — urydyna. Tego rodzaju tRNA stanowią dogodny obiekt badań działania enzymów tiolujących. Omówiono je w artykule przeglądowym (30). Tionukleozydy zawarte w tRNA pod działaniem takich czynników utleniających jak nadjodany, siarczyn, osmiany, jod lub woda utleniona ulegają reakcjom utleniania (32,31,8,14,33,34,35). Działanie jodu na tRNA^{Pho}, tRNA^{Val} i tRNA^{Tyr} w roztworze o pH=7 i w temperaturach 0°C lub pokojowej powoduje zanik charakterystycznych pasm absorpcji UV dla 4-tiourydyny (31). Złożone procesy utleniania, zachodzące pod wpływem jodu nie zostały w pełni zbadane. Stwierdzono między innymi tworzenie się wewnątrzcząsteczkowego dwusiarczku 4-tiourydyny w tRNA^{Tyr}. W tRNA^{Pho} i tRNA^{Val} 4-tiourydyna reagowała z jodem dając kilka nieokreślonych produktów.

Reakcji ulega również 2-metylotio-N⁶-Δ²-izopentenyloadenozyna, tionukleozyd purynowy znajdujący się w pętli antykodonowej tRNA^{Phe} i tRNA^{Tyr}. Wszystkie trzy tRNA, poddane działaniu jodu, straciły tylko około 10% aktywności akceptorowej. Potwierdza to przypuszczenie, że 4-tiourydyna oraz obszar antykodonowy nie odgrywają istotnej roli w procesach rozpoznania syntetazy.

Do utleniania wykorzystuje się reakcję z 30% H₂O₂ w pH= 8,0 (14), 4-tiourydyna przechodzi wtedy ilościowo w urydynę.

Do bardzo selektywnej modyfikacji tiourydyn można również zastosować S-benzyltioizotiomocznik (27). Proces zachodzi w skrajnie łagodnych warunkach dając pochodną dwusiarczkową (reakcja 15 w tabeli I). Reakcji ulegają s⁴U oraz pochodne s²U. Wykazano, że poziom aminoacylacji niefrakcjonowanego tRNA z *E. coli*, zmodyfikowanego S-benzyltioizotiomocznikiem, obniżył się o kilka procent dla Leu, Ser, Tyr, Pro, His, Arg, Ileu,

Met, Trh, Lys, Val, Ala, Asp i Gly w porównaniu z tRNA niemodyfikowanym. Dwusiarczek można z powrotem przeprowadzić ilościowo w substrat działając β -merkaptoetanołem. Odwracalne wprowadzenie grupy tiobenzylowej okazało się użyteczne przy rozdziale chromatograficznym mieszanin specyficznych tRNA.

4-tiourydyna zawarta w niefrakcjonowanym tRNA z *E. coli* reaguje również selektywnie z N-etylomaleinimidem powodując nieznaczne zmniejszenie aktywności akceptorowej (26).

Porównanie wpływu różnych czynników modyfikujących tionukleozydy takich jak H_2O_2 , CNBr, N-etylomaleinimid oraz promieniowanie UV o długości fali = 330 nm przedstawiono w tabeli 2 (36).

Tabela 2

Wpływ różnych modyfikacji 4-tiourydyny na zdolność do aminoacylacji niefrakcjonowanych i oczyszczonych tRNA z *E. coli** (36).

tRNA	Modyfikacja			
	N-etylomaleinimid	CNBr	H_2O_2	UV
Niefrakcjonowane				
Phe	96	65	104	91
Leu	93	95	93	90
Lys	—	34	—	—
fMet	—	100	83	—
Tyr	—	85	—	92
Val	—	—	102	—
Oczyszczone				
Phe	90	78	75	85
fMet	—	—	96	—
Val	—	—	102	—

* W tabeli podano % aminoacylacji zmodyfikowanych tRNA. Jako 100% przyjęto stopień aminoacylacji niemodyfikowanych tRNA.

Widać z niej wyraźnie, że modyfikacja s^4U w tRNA w większości przypadków powoduje stosunkowo niewielki spadek aktywności. Na tej podstawie można stwierdzić, że obecność 4-tiourydyny nie jest konieczna do właściwego rozpoznania badanych tRNA przez enzym. Nie można jednak rozstrzygnąć kwestii, czy za rozpoznanie to odpowiada właściwa struktura przestrzenna cząsteczki tRNA, określona sekwencja nukleotydów czy też łączne działanie obu czynników. Problem ten wciąż pozostaje otwarty.

II-2.2. Badania konformacji obszaru tRNA wokół 4-tiourydyny.

Konformację obszaru wokół s^4U badano dość dokładnie. Stwierdzono, że 4-tiourydyna znajdująca się w tRNA nie jest podatna na działanie niektórych odczynników w przeciwieństwie do wolnego nukleozydu. Na przykład

hydroksyloamina nie reaguje z s⁴U zawartą w tRNA^{fMet} i tRNA^{Tyr} z *E. coli* w obecności jonów Mg⁺⁺ (16). Podobny efekt obserwowano dla reakcji z NaJO₄ (37). Jony Mg⁺⁺ uniemożliwiają również reakcję s⁴U w tRNA^{Phe}, tRNA^{Val} i tRNA₁^{Val} z p-hydroksyrtęciobenzoesanem sodu (38, 39, 40). Dla tRNA^{Val} uzyskano następujący szereg wiązania różnych związków rtęciowych z s⁴U: HgBr₂ i HgCl₂ >> CH₃COOHg > CH₃HgCl > p-chlorortęciobenzoesan (41). Usunięcie jonów Mg⁺⁺ powoduje, że wszystkie te czynniki reagują z jednakową łatwością (37). Wyniki powyższe sugerują taką konformację obszaru badanych tRNA wokół s⁴U, w której 4-tiourydyna otoczona przez inne jednostki nukleotydowe znajduje się wewnątrz makrocząsteczki. Potwierdzają to widma elektronowego rezonansu paramagnetycznego różnych tRNA: fMet, Val, Phe, Glu, Lys i Tyr (24) zmodyfikowanych N-/1-oksylo-2,2',5,5'-czterometylo-3-pirolidyno/-bromoacetamidem w miejscu 4-tiourydyny.

Do badań konformacji obszaru wokół s⁴U można wykorzystać metodę denaturacji termicznej. Uzyskano profile topnienia szeregu specyficznych tRNA z *E. coli* mierzone przy λ = 330 nm w maksimum absorpcji 4-tiourydyny (42). Zarówno kształt tych krzywych jak i temperatura, w której efekt hipochromowy był równy połowie wielkości maksymalnej — były różne dla różnych tRNA. Obserwacje te sugerują, że przestrzenne otoczenie 4-tiourydyny w poszczególnych tRNA jest różne.

II-2.3. Badanie konformacji tRNA w roztworze metodą przeniesienia energii fluorescencji.

Chemiczna modyfikacja 4-tiourydyny, pochodnych 2-tiourydyny oraz innych rzadkich nukleozydów: pseudourydyny i dwuhydrourydyny w tRNA pozwala na wprowadzenie do makrocząsteczki związków odznaczających się specjalnymi własnościami fizykochemicznymi. Wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie energii fluorescencji typu singletowo-singletowego między dwiema grupami fluoryzującymi przyłączonymi do makrocząsteczki, jest dogodną metodą określania jej przestrzennej struktury w roztworze. Opracowano różne selektywne reakcje modyfikacji tRNA w celu wprowadzenia do cząsteczki związków fluoryzujących (43). W tabeli 3 przedstawiono niektóre jedno- i dwupodstawione pochodne fluoryzujące tRNA^{fMet} i tRNA₂^{Glu} z *E. coli*, czynniki modyfikujące, miejsca podstawienia ich w cząsteczce tRNA oraz aktywność akceptorową tak zmodyfikowanych tRNA. Na rycinie 2a przedstawiono wzory strukturalne czynników modyfikujących stosowanych przez autorów oraz ich skróty, a na rycinie 2b umieszczono schematy dwupodstawionych pochodnych tRNA. Podstawienie 4-tiourydyny pochodną benzopiranu (BMB) w tRNA^{fMet} nie powoduje zmian aktywności akceptorowej. Natomiast przyłączenie pochodnej dansylowej (DNS) lub antranilowej (Ant) do cytydyny w położeniu 1, pochodnej proflawiny

Tabela 3

Jedno- i dwupodstawione pochodne fluoryzujące tRNA^{fMet} i tRNA^{Glu} z *E. coli*, miejsca podstawienia oraz aktywność akceptorowa według Yanga i Søllaa.

Nr	tRNA	Modyfikacja chemiczna						Aktywność akceptorowa %	Propozycja piśmien.
		Miejsce I			Miejsce II				
		Czynnik modyfikujący**)	zasada	Wyd. r.mod.	Czynnik modyfikujący**)	zasada	Wyd. r.mod.		
1	fMet	BMB	s ⁴ U ₈	0,5	—	—	—	100	43
2	fMet*)	BMB	ψ ₅₆	—	—	—	—	33	45
3	fMet	DNS	C ₆	1,0	—	—	—	33	46
4	fMet	Ant	C ₁	1,0	—	—	—	33	44
5	fMet	PFSH	hU ₂₁	1,0	—	—	—	22	44
6	fMet	PFSH	A ₇₇	1,0	—	—	—	0	44
7	fMet	AF	A ₇₇	0,1	—	—	—	0	44
8	Glu _{II}	BMB	s ² U ₃₅	1,0	—	—	—	10	45
9	fMet	Ant	C ₁	1,0	AF	A ₇₇	0,1	0	44
10	fMet	BMB	s ⁴ U ₈	0,5	PFSH	A ₇₇	1,0	0	44
11	fMet*)	BMB	ψ ₅₆	0,6	PFSH	A ₇₇	1,0	0	44
12	Glu _{II}	BMB	s ² U ₃₅	0,1	PFSH	A ₇₇	1,0	0	44
13	fMet*)	PFSH	hU ₂₁	1,0	BMB	ψ ₅₆	0,6	10	44

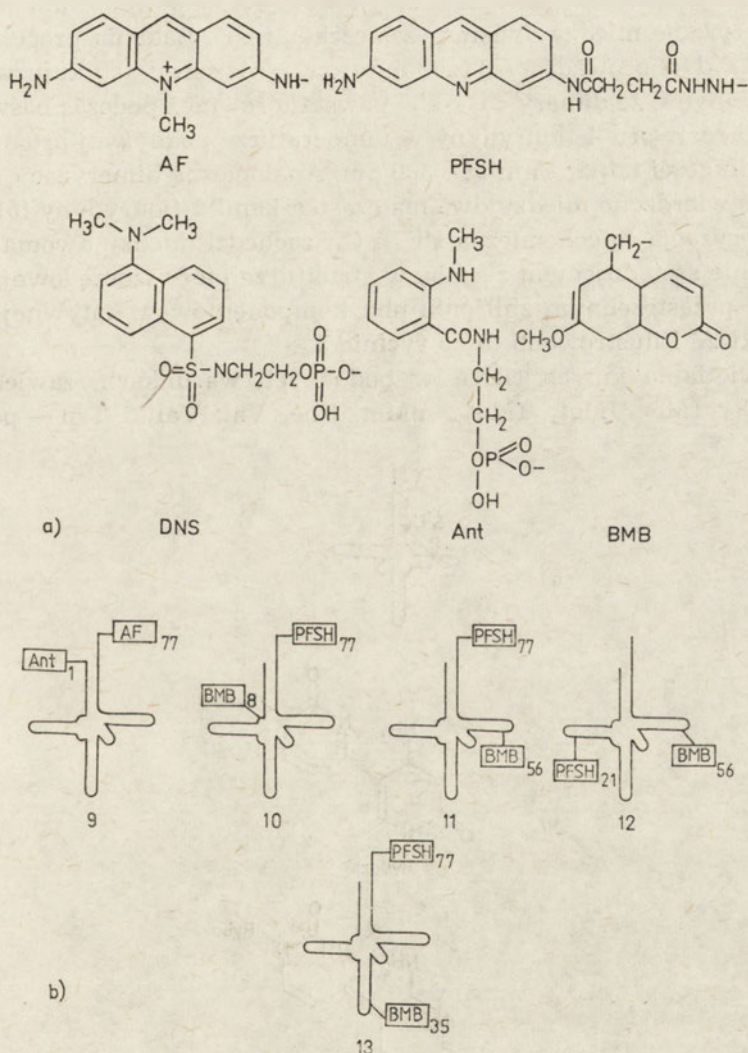
* s⁴U uprzednio zamieniono na U działaniem CNBr

** skróty przyjęte za autorami (44) — odpowiadające im związki przedstawiono na rycinach 2a i 2b.

(PFSH) do dwuhydrourydyny w pozycji 21 i pochodnej benzopirany (BMB) do pseudourydyny w pozycji 56 w tRNA^{fMet} oraz pochodnej benzopirany (BMB) do 2-tio-5/N-metyloaminometylo/-urydyny w położeniu 35 w tRNA^{Glu} z *E. coli* — redukowało aktywność akceptorową do wartości od 10 do 30%. Dwupodstawione pochodne tych tRNA miały w czterech przypadkach zablokowaną końcową adenozyne (tabela 3, pozycja 9—12). Natomiast pochodna 13 zachowała aktywność w 10%. Ta ostatnia obserwacja dowodzi, że wprowadzenie dwóch grup fluoryzujących zmienia natywną konformację tRNA w znacznym stopniu; nie na tyle jednak, by rozpoznanie przez enzym stało się całkowicie niemożliwe. Pomiarzy przeniesienia energii wzbudzenia od jednej grupy fluoryzującej do drugiej pozwoliły określić odległości między obiema tymi grupami w pochodnych tRNA 9 do 13 (tabela 3) (44). Porównanie uzyskanych wartości z analogicznymi zmierzonymi rentgenograficznie dla krystalicznego tRNA^{Phe} z drożdży (47) wskazuje, że trzyczłonowa struktura badanych tRNA w roztworze jest podobna do struktury w stanie krystalicznym.

Metoda opisana wyżej ma jednak swoje ujemne strony, ponieważ należy posługiwać się zmodyfikowanymi tRNA i nie wiadomo w jakim stopniu modyfikacja zaburza konformację natywną. Wyniki aminoacylacji przedstawiono w tabeli 3; w przypadku dwupodstawionej pochodnej tRNA^{fMet} (pozycja 13) aktywność zmniejszyła się do 10%. Ponadto metoda

obliczania odległości na podstawie przeniesienia energii fluorescencji jest obarczona dość znacznym błędem ponieważ czasy życia fluorescencji zarówno donora jak i akceptora są bardzo krótkie (rzędu 10^{-9} sek) (44). Nie wyklucza się jednak możliwości stosowania tej metody do badań zmian konformacyjnych tRNA podczas oddziaływania z syntetazami lub rybosomami.



Ryc. 2. a. Wzory strukturalne grup fluoryzujących zastosowanych przez Yanga i Sölla: AF — akrylawina, PFSH — hydrazid burszynyloproflawiny, DNS — pochodna dansylowa, Ant — pochodna antranilowa, BMB — 4-bromometylo-7-metoksy-2-okso-2H-benzopirany.

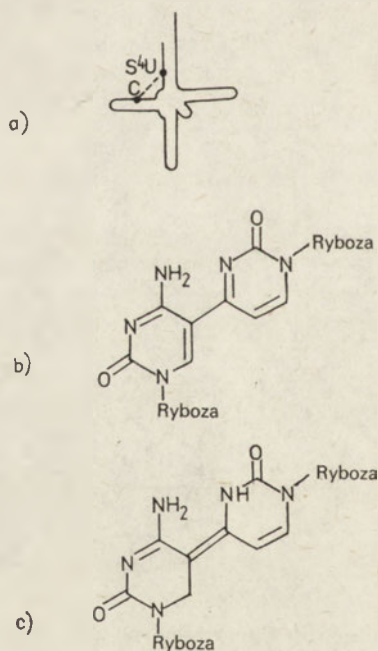
b. Struktura pięciu tRNA z dwoma grupami fluoryzującymi (liczby od 9 do 13 oznaczają kolejną pozycję danego tRNA w tabeli 3).

III. Modyfikacja fotochemiczna tionukleozydów pirymidynowych.

Naświetlanie wodnego roztworu $tRNA_1^{Val}$ z *E. coli* promieniowaniem o długości fali około 330 nm w temperaturze $+4^\circ\text{C}$ powoduje reakcję dimeryzacji między 4-tiourydyną w pozycji 8 i cytydyną w pozycji 13 (48, 49). Strukturę tworzącego się dimeru określił Leonard i wsp. (50) naświetlając wodny roztwór 4-tiourydyny i cytydyny w wyżej wymienionych warunkach. Naświetlanie samej 4-tiourydyny powodowało analogiczną dimeryzację między dwiema cząsteczkami s^4U . Badania procesów fotolizy tiourydyn prowadzone przez autorów niniejszego artykułu wykazały między innymi, że dimery $s^4U \wedge s^4U$ powstają również podczas naświetlania wodnego roztworu 4-tiourydyny w temperaturze pokojowej promieniowaniem o długości fali 254 nm i > 300 nm. Analogiczną dimeryzację fotochemiczną stwierdzono między dwiema cząsteczkami 2-tiourydyny (51, 52).

Dimeryzacja fotochemiczna s^4U_8 i C_{13} zachodzi między dwoma nukleozydami nie sąsiadującymi ze sobą w strukturze pierwszorzędowej. Świadczy to o przestrzennym zbliżeniu obu komponentów w natywnej konformacji tRNA. Zilustrowano to na rycinie 3.

Naświetlanie innych tRNA w podobnych warunkach, zawierających s^4U_8 i C_{13} : fMet, fMet₁, fMet₃, mMet, Phe, Val, Val₂ i Trp — powoduje



Ryc. 3. a. Ogólny schemat przestrzennego usytuowania s^4U_8 i C_{13} prowadzący do fotodimeryzacji między nimi w tRNA.

b. Struktura fotodimeru $s^4U \wedge C$ wg Leonarda (48).

c. Struktura zredukowanego za pomocą NaBH_4 dimeru $s^4U \wedge C$ (64).

również dimeryzację pomiędzy s^4U i C (53,54). Omawiana reakcja fotochemiczna jest procesem selektywnym. Ponieważ maksimum absorpcji 4-tiourydydy przypada w zakresie znacznie dłuższych fal (około 330 nm) niż pozostałych nukleozydów (około 260 nm), można selektywnie wzbudzić 4-tiourydydę naświetlając tRNA promieniowaniem o długości fali około 330 nm.

Istnieją dowody na to, że fotoreakcja s^4U_8 z C_{13} wymaga natywnej konformacji cząsteczki tRNA. Na przykład usunięcie jonów Mg^{++} , które powoduje denaturację tRNA całkowicie hamuje fotoreakcję (55).

W wyniku enzymatycznego rozszczepienia $tRNA_1^{Val}$ i $tRNA^{Met}$ z *E. coli* między ramieniem dwuhydrourydydy i antykodonu otrzymano dwie części: część 5' i część 3' (56, 57). Naświetlanie fragmentów 5' w obu wypadkach nie powodowało dimeryzacji, mimo iż zawierały one s^4U_8 i C_{13} . Kompleksowanie obu części w obecności jonów Mg^{+2} , mimo braku jednego wiązania internukleotydu, przywracało zdolność do fotodimeryzacji oraz aktywność akceptorową porównywalną z aktywnością tRNA nierozszczepionego. Wymóg odpowiedniego przestrzennego ułożenia obu nukleozydów można też wykazać na syntetycznych oligonukleotydach. Stwierdzono np: fotodimeryzację w pojedynczym łańcuchu kopolimeru poli (s^4U,C) (58). Łańcuch taki może się swobodnie zginać, co umożliwia korzystne ułożenie obu zasad. Wytworzenie podwójnej spirali, a w związku z tym usztywnienie układu np: poli (s^4U,C)x poli I lub poli (s^4U,C)x poli C — całkowicie hamowało reakcję fotochemiczną. Badania konformacji tRNA, w których wykorzystywano własności fotochemiczne tiourydydy omówiono w następnych punktach.

III-1. Szybkość i wydajność fotodimeryzacji $s^4U_8 \wedge C_{13}$.

Szybkość tworzenia dimeru $s^4U \wedge C$ w tRNA zależy od konformacji całej cząsteczki naświetlanego tRNA, a wzajemne ułożenie obu zasad stanowi o konformacji. Stwierdzono, że rodzaj tRNA i obecność lub brak Mg^{++} znacznie wpływają na szybkość fotodimeryzacji na przykład w $tRNA^{Val}$ i $tRNA^{Met}$ (59). W związku z tym reakcję fotodimeryzacji $s^4U_8 \wedge C_{13}$ można stosować jako „sondę” zmian konformacyjnych w tRNA. Można porównywać konformacje różnych tRNA lub dyskutować wpływ określonych zmian sekwencji nukleotydów i rolę poszczególnych nukleozydów w danym miejscu cząsteczki (60). Między innymi wykorzystano tę reakcję do określenia roli 3'-końcowego sześcienuklotydu CAACCA w tworzeniu natywnej konformacji $tRNA^{Met}$ z *E. coli* (61). W tym celu podzielono makrocząsteczkę na dwie części, obie części oddzielono od siebie i od części 3' odcięto oligonukleotyd CAACCA. Następnie badano zdolność tak otrzymanej części 3' do stymulacji fotodimeryzacji w części 5'. W tym celu oba fragmenty kompleksowano i naświetlano. Badano jednocześnie działanie niezmodyfikowa-

nej części 3'. Stwierdzono, że koniec CAACCA nie odgrywa większej roli w formowaniu natywnej struktury tego tRNA: w obu wypadkach szybkość fotodimeryzacji była bardzo podobna.

Badania kinetyki fotodimeryzacji dwóch izoakceptorowych tRNA z *E. coli* (tRNA₁^{fMet} i tRNA₃^{fMet}) wykazały, że w obecności jonów Mg⁺⁺ oba rodzaje tRNA ulegały tej reakcji z podobną szybkością (54). Natomiast zastąpienie jonów Mg⁺⁺ przez jony Na⁺ powodowało 10-krotne zmniejszenie szybkości fotodimeryzacji w tRNA₃^{fMet}. tRNA₁^{fMet} zawiera w pozycji 47 7-metyloguanozynę a tRNA₃^{fMet} ma w tym miejscu adenozyne. Jony Na⁺ są czynnikiem destabilizującym konformację natywną tRNA. W związku z tym widać, że 7MeG₄₇ stabilizuje strukturę przestrzenną tRNA w znacznie większym stopniu niż A₄₇. Można również sądzić, że obszar ramienia dodatkowego, w którym znajduje się 7MeG, jest zbliżony przestrzennie do rejonu fotodimeryzacji s⁴U₈∧C₁₃.

Sugerowano, że heterologiczne przyłączanie fenyloalaniny do jedynastu różnych tRNA (Val₁, Val_{2a}, Val_{2b}, mMet, Ileu, Ala₂, Lys, Phe z *E. coli* oraz Phe z drożdży) za pomocą tej samej syntetazy fenyloalaninowej z drożdży, jest możliwe dzięki wspólnej sekwencji kilku nukleotydów tworzącej ramię dwuhydrourydyny we wszystkich badanych tRNA (62).

Identyczna sekwencja zapewnia bowiem identyczną konformację tego obszaru. Aby sprawdzić tę hipotezę naświetlano tRNA₁^{Val} promieniowaniem o długości fali około 330 nm wytwarzając w nim dimer s⁴U₈∧C₁₃ (63). Tak zmodyfikowany tRNA całkowicie tracił zdolność do rozpoznawania heterologicznej syntetazy fenyloalaninowej, natomiast rozpoznawał homologiczną syntetazę walinową z *E. coli*. W wyniku więc wytworzenia dimeru następuje takie usztywnienie obszaru między ramionami akceptorowym i dwuhydrourydyny, że zgodnie z mechanizmem *induced-fit* nie może dojść do wytworzenia kompleksu enzym—substrat. Badania powyższe dowodzą, że lokalna konformacja między ramionami akceptorowym i dwuhydrourydyny odgrywa istotną rolę w rozpoznawaniu syntetazy fenyloalaninowej.

Dokładne określanie wydajności fotodimeryzacji s⁴U₈∧C₁₃ pozwala badać subtelne zmiany konformacji starannie oczyszczonych tRNA (64).

III-2. Luminescencja dimeru s⁴U₈∧C₁₃ oraz tiopirymidyn w tRNA.

Dimer s⁴U₈∧C₁₃ w tRNA ulega bardzo łatwo redukcji za pomocą NaBH₄ (Ryc. 3c) dając pochodną, która wykazuje własności fluoryzujące (λ_{max} wzbudzenia = 385, λ_{max} emisji = 425 nm) (65, 66, 67). Fluorescencję zredukowanego dimeru wykorzystano do badań konformacyjnych tRNA (59, 66), ponieważ intensywność fluorescencji zależy od otoczenia a więc od konformacji makrocząsteczki (65).

Do badania zmian konformacji można również zastosować słabą fluorescencję samej 4-tiourydyny zawartej w tRNA (bez dimeryzacji z C₁₃)

(38). Stwierdzono na przykład, że s^4U w kopolimerze poli (s^4U,C) nie fluoryzuje. Natomiast fluorescencja s^4U w $tRNA^{Val}$ z *E. coli* bardzo zależy od obecności jonów magnezu i temperatury.

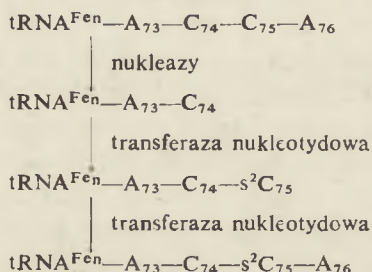
Do identyfikacji tionukleozydów w tRNA stosowano też bardzo charakterystyczną fosforescencję tych komponentów obserwowaną w $77^\circ K$ (68, 69).

III-3. Fotochemiczne przejście 4-tiourydyny w urydynę.

Naświetlanie soli cetylotrójmetyloamoniowej $tRNA^{Val}$ z *E. coli* w III-rzędowym butanolu promieniowaniem o długości fali > 300 nm powoduje selektywne przejście tiourydyny w urydynę (70, 71, 72). Cztery główne nukleozydy oraz nukleozydy zmodyfikowane takie jak pochodne 2-tiourydyny w tych warunkach nie ulegają zmianie. Jeżeli w III-rzędowym butanolu znajduje się dodatkowo amoniak lub metyloamina, to oprócz urydyny powstaje cytydyna i N^4 -metylocytydyna. Badania aktywności akceptorowej zmodyfikowanego $tRNA^{Val}$ (90% zmiany s^4U w U) pokazały, że przyłączenie waliny zmniejszyło się o 20%. Stosunkowo niewielka zmiana aktywności akceptorowej raz jeszcze wskazuje, że obecność 4-tiourydyny w cząsteczce tRNA nie ma większego znaczenia dla rozpoznawania syntetazy (walinowej).

IV. Inkorporacja tionukleozydów do tRNA.

Stosując ciąg reakcji enzymatycznych pokazanych na rycinie 4, wprowadzono do końca CCA $tRNA^{Phe}$ z drożdży 2-tiocytydynę w miejsce cytydyny w pozycji 75 (73).



Ryc. 4. Schemat reakcji enzymatycznych wprowadzania s^2S do $tRNA^{Phe}$ (25).

Tak otrzymany $tRNA^{Phe}$ ulegał aminoacylacji fenyloalaniną podobnie jak $tRNA^{Phe}$ niezmodyfikowany. Obecność s^2C nie powoduje więc zakłóceń konformacji obszaru odpowiedzialnego za rozpoznanie syntetazy (74).

Obecność s^2C w ramieniu aminokwasowym można wykorzystać do ba-

dania przestrzennego usytuowania końca CCA w stosunku do reszty cząsteczki. 2-tiocytydyna bardzo łatwo ulega reakcji kompleksowania p-hydroksyrtęciobenzoesanem sodu. W ten sposób można wprowadzić do cząsteczki tRNA atom ciężki (Hg). Jest to bardzo przydatne w badaniu struktury w stanie krystalicznym metodami rentgenograficznymi.

W reakcji z jodoacetamidem zamieniono tRNA_{C75} w pochodną zawierającą rodniki nitroksydowe (25). Przyłączenie tego komponentu do s²C₇₅ również nie zmieniło zdolności tRNA^{Phc} do aminoacylacji. Obecność paramagnetycznych rodników nitroksydowych w cząsteczce umożliwia zastosowanie spektroskopii EPR do badań konformacyjnych. Widma EPR wykonane w różnych temperaturach w obecności lub braku jonów Mg⁺⁺ wykazały sztywne powiązanie końca CCA z resztą cząsteczki za pomocą oddziaływań warstwowych. Nie przeczy to wyżej opisanym wynikom wskazującym na wyeksponowanie końca CCA w reakcji aminoacylacji.

V. Badanie oddziaływań w oligo- i polinukleotydach zawierających siarkę.

Badania parowania zasad i asocjacji warstwowej polinukleotydów mogą w pewnym stopniu rozwiązać zagadnienie roli tionukleozydów w tRNA. Stwierdzono między innymi, że stabilność podwójnego heliksu poli-s²U jest znacznie większa, niż poliU (temperatura przejścia poliU = +8°C a poli s²U = +68,5°C). Kompleks ten jest tak trwały, że poli s²U nie asocjuje z poli A i nie może służyć jako matryca w syntezie polipeptydu (74, 75, 76). Ta wysoka stabilność poli s²U nie może być wywołana działaniem stosunkowo słabych wiązań wodorowych N—H⁺...S. Badania krystalograficzne (77) sugerują silne oddziaływania między atomami N₁(1)...S₂(2). Łatwo polaryzowalne grupy tiokarbonylowe oddziałują z ładunkiem ujemnym przy atomach azotu układu π-elektronowego sąsiedniej zasady pirymidynowej. Podobne oddziaływania N₁...S₂, mogą stabilizować heliksy zawierające inne pochodne z grupą 2-tioketo: poli-s²C i poli-s²s⁴U. Natomiast poli-s⁴U wykazuje znacznie mniejszą trwałość, podobną do poli-U (78). W strukturze drugorzędowej poli-s⁴U nakładanie się atomu S₄ jednej zasady z atomem N₃ sąsiedniej jest ograniczone lub wręcz niemożliwe. Z tych badań wynika, że zmodyfikowany nukleozyd 2-tiopirymidynowy może stabilizować sąsiadujące z nim podwójnie helikalne fragmenty tRNA. Ostatnio (79) badano wpływ podstawienia siarki w urydynie na wzajemne oddziaływania adenozyne-tiourydyna w kopolimerach: poli (A, s²U) i poli (A, s²s⁴U). Stwierdzono stabilizujący wpływ grupy 2-tioketonowej na strukturę helikalną polinukleotydów poprzez oddziaływania warstwowe sąsiadujących puryn i pirymidyn.

W pętli antykodonowej tRNA³¹⁰ z drożdży stwierdzono występowanie od strony 3' estru metylowego 2-tio-5-karboksymetylourydy (80). Spo-

śródm dwóch możliwych kodonów dla kwasu glutaminowego (GAA i GAG), tRNA^{Glu} rozpoznawał tylko kodon GAA. Utworzenie więc pary zasad między 2-tio-5-karboksymetylourydyną i guanozyną jest utrudnione. Obecność pochodnej 2-tiourydyny w antykodonie zapewnia wybór adenozyne a nie guanozyny jako trzeciej litery sekwencji kodonowej. Systematyczne badania podstawowe wpływu tionukleozydów na oddziaływania kodon-antykodon (81) przeprowadzono stosując trójnukleotydy zawierające w różnych położeniach tiourydyny (s⁴U, s²U, s²s⁴U). Określano zdolność tych „trójek”, które stanowiły odpowiednik kodonu, do stymulacji wiązania tRNA^{Phe} z *E. coli* do rybosomów (antykodon: GAA). Stwierdzono, że s²U silnie wiąże się z adenozyną, natomiast z guanozyną nie tworzy pary komplementarnej. Potwierdza to wyniki badań opisanych wyżej (80). Parowanie zasad między adenozyną i 4-tiourydyną jest znacznie słabsze niż w przypadku oddziaływań 2-tiourydyny z adenozyną. Możliwe jest natomiast powstanie słabej pary G...s⁴U. 2,4-dwutiourydyna nie oddziałuje z guanozyną.

VI. Uwagi końcowe.

Możliwości wykorzystania tionukleozydów, a szczególnie 4-tiourydyny, do badania konformacji i funkcji tych tRNA, które zawierają tionukleozydy — są znaczne. Dimeryzacja fotochemiczna s⁴U^C₁₃ stanowi cenne kryterium poprawności proponowanych modeli przestrzennych tRNA: modele należy tak konstruować, by oba komponenty mogły wzajemnie ustawić się w przestrzeni zgodnie z zaproponowanym mechanizmem fotodimeryzacji (50). Ostatnio określono rentgenograficznie strukturę tRNA^{Phe} z drożdży w stanie krystalicznym (47, 82). Stwierdzono, że bliskie sąsiedztwo nukleozydów w pozycji 8 i 13 ułatwia reakcję fotodimeryzacji.

Obecność s⁴U można również wykorzystać do badania zmian konformacji tRNA pod wpływem określonego czynnika jak i podczas działania biologicznego danego tRNA. Charakterystyczna absorpcja UV pozwala śledzić zachowanie się 4-tiourydyny w cząsteczce tRNA niezależnie od pozostałych komponentów makrocząsteczki. Tym samym można wnioskować o zmianach w otoczeniu przestrzennym s⁴U stosując różne metody: spektroskopowe (UV, CD i ORD), luminescencję oraz profile temperaturowe. W związku z tym byłoby interesujące opracowanie metody selektywnego wprowadzania 4-tiourydyny lub pochodnych 2-tiourydyny w określone miejsca cząsteczek tych tRNA, które nie posiadają tionukleozydów. Dlatego też celowe są dalsze badania podstawowe nad własnościami tionukleozydów.

PIŚMIENICTWO

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1970), *Eur. J. Bioch.*, **15**, 203—208.
2. Barciszewski J., Rafalski A., Wiewiórowski M., Atlas struktur tRNA (w przygotowaniu).
3. Geller M., Pohorille A., Jaworski A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 1—8.
4. Mautner H. G., Bergson G., (1963), *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1694—1700.
5. Yano M., Hayatsu H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 303—310.
6. Hayatsu H., Yano M., (1969) *Tetrahedron Letters*, 755—758.
7. Sono M., Hayatsu H., (1973), *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 955—1000.
8. Hayatsu H., (1969), *J. Amer. Chem. Soc.*, **91**, 5693—94.
9. Ziff E. B., Fresco J. B., (1968), *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 7338—7342.
10. Burton K., (1970), *FEBS Letters*, **6**, 77—79.
11. Miller W. H., Roblin R. O., Astwood E. B., (1945), *J. Amer. Chem. Soc.*, **67**, 2201—2204.
12. Lipsett M. N., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4067—4071.
13. Carbon J. A., Hung L., Jones D. S., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 979—986.
14. Scheit K. H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 285—293.
15. Iida S., Hayatsu H., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 163—167.
16. Iida S., Chung K. C., Hayatsu H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 198—204.
17. Saneyoshi M., Nishimura S., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 389—399.
18. Saneyoshi M., Nishimura S., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 123—131.
19. Secrist J. A., Barrio J. R., Leonard N. J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1262—1269.
20. Sato E., Kanaoka Y., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **232**, 213—216.
21. Lipsett M. N., Doktor B. P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4072—4077.
22. Sprinzl M., Scheit K. H., Cramer F., (1973), *Eur. J. Bioch.*, **34**, 306—310.
23. Scheit K. H., Faerber P., (1973), *Eur. J. Bioch.*, **33**, 545—552.
24. Hara N., Horiuchi T., Saneyoshi M., Nishimura S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 305—311.
25. Cramer F., Use of modified tRNA's in biochemical studies — referat na konferencji: Recent developments in oligonucleotide synthesis and chemistry of minor bases of tRNA, Poznań-Kiekrz, 1974, A. Mickiewicz University Press.
26. Carbon J., David H., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3851—3860.
27. Saneyoshi M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1501—1506.
28. Walker R. T., Rajbhandary U. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 907—914.
29. Saneyoshi M., Nishimura S., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **246**, 123—131.
30. Söll D., (1971), *Science*, **173**, 293—309.
31. Faulkner R. D., Uziel M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **238**, 464—474.
32. Lipsett M. N., Doctor B. P., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4072—4077.
33. Ziff E. B., Fresco J. R., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3242—3251.
34. Burton K., (1970), *FEBS Letters*, **6**, 77—85.
35. Carbon J. A., Hung L., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **53**, 979—986.
36. Shugart L., (1972), *Arch. Bioch. Biophys.*, **148**, 488—495.

37. Ziff E. B., Fresco U. B., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, 871.
38. Pochon F., Balny C., Scheit K. M., Michelson A. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 49—56.
39. Pal B. C., Shugart L. R., Isham K. R., Stulberg M. P., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 86—90.
40. Heitner H. J., Lippard S. J., Sunshine H. R., (1972), *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 8936—8945.
41. Sunshine H. R., Lippard S. J., (1974), *Nucleic Acid. Res.*, **1**, 673—683.
42. Seno T., Kobayashi M., Nishimura S., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 71—85.
43. Yang C. H., Söll D., (1973), *J. Biochem. (Tokyo)*, **73**, 1243—1252.
44. Yang C. H., Söll D., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2838—2842.
45. Yang C. H., Söll D., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3615—3621.
46. Yang C. H., Söll D., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 70—81.
47. Kim S. H., Suddath F. L., Quigley G. J., Mc Pherson A., Susman J. L., Wang A. H. J., Seeman N. C., Rich A., (1974), *Science*, **185**, 435—445.
48. Favre A., Yaniv M., Michelson A. M., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 266—271.
49. Yaniv M., Favre A., Barell B. G., (1969), *Nature*, **223**, 1331—1333.
50. Bergstrom D. E., Leonard N. L., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1—8.
51. Paszyc S., Bujarski J., *Bull. Acad. Pol. Sci.*, (w druku).
52. Bujarski J., (1975), Praca doktorska, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań.
53. Favre A., Michelson A. M., Yaniv M., (1971), *J. Mol. Biol.* **58**, 367—378.
54. Delaney P., Bierbaum J., Ofengand J., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 260—267.
55. Yaniv M., Chestier A., Gross F., Favre A., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 381—396.
56. Krauskopf M., Ofengand J., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 111—115.
57. Siddiqui M. A. Q., Ofengand J., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 105—110.
58. Favre A., Fourrey J. L., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 507—515.
59. Ofengand J., Bierbaum J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1977—1984.
60. Favre A., Buckingham R., Thomas G., (1975), *Nucleic Acid. Res.*, **2**, 1421—1428.
61. Siddiqui M. A. Q., Ofengand J., (1972), *FEBS Letters*, **22**, 169—173.
62. Roe B., Dudock B., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 399—407.
63. Kumar S. A., Krauskopf M., Ofengand J., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 341—347.
64. Singhal R. P., Best A. N., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 357—367.
65. Favre A., Yaniv M., (1971), *FEBS Letters*, **17**, 236—241.
66. Bergstrom D. E., Leonard N. J., (1972), *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 6178—6189.
67. Favre A., Fourrey J. L., Roques B., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 209—212.
68. Vormbrock R., Morawietz R., Gassen H. G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 348—359.
69. Helene C., Yaniv M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **15**, 500—504.
70. Pleiss M. G., Cerutti P. A., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3093—3099.
71. Pleiss M. G., Ochiai H., Cerutti P. A., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **34**, 70—76.
72. Pleiss M. G., Cerutti P.A., (1971), *Methods Enzymology*, **20**, 144—145.

73. Sprinzl M., Scheit K. H., Cramer F., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **34**, 306—310.
74. Sternbach H., Von der Haar F., Schlimme E., Gaertner E., Cramer F., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **22**, 166—172.
75. Saenger W., (1973), *Angew. Chem. Int. Ed.*, **12**, 591—602.
76. Bähr W., Faerber P., Scheit K. H., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 535—544.
77. Mazumdar S. K., Saenger W., Scheit K. H., (1974), *J. Mol. Biol.*, **85**, 213—230.
78. Simuth J., Scheit K. H., Gottschalk E. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 371—380.
79. Scheit K. H., Faerber P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 549—555.
80. Yoshida M., Takeishi K., Ukita T., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 153—166.
81. Vormbrock R. V., Morawietz R., Gassen H. G., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **340**, 348—358.
82. Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F. C., Klug A., (1974), *Nature*, **250**, 546—553.

BARBARA CZARTORYSKA*)

Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisacharydów

Lysosomal Glycosidases in Heteropolysaccharide Catabolism

Spis treści

Wprowadzenie

- I. Biosynteza, rozmieszczenie i działanie kwaśnych hydrolaz
- II. Ogólna charakterystyka glikozydaz
- III. Charakterystyka poszczególnych glikozydaz
 - III-1. β -heksozoaminidaza (E.C.3.2.1.30)
 - III-2. β -galaktozydazy (E.C.3.2.1.23)
 - III-3. β -glukozydaza (E.C.3.2.1.21)
 - III-4. α -galaktozydaza (E.C.3.2.1.22)
 - III-5. α -fukozydaza (E.C.3.2.1.51)
 - III-6. α -mannozydaza (E.C.3.2.1.24)
 - III-7. β -glukuronidaza (E.C.3.2.1.31)
 - III-8. Neuraminidaza (E.C.3.2.1.18)
- IV. Uwagi końcowe

Contents

Introduction

- I. Biosynthesis, distribution and mode of action of acid hydrolases
- II. General characteristics of glycosidases

*) Dr, Zakład Genetyki, Instytut Psychoneurologiczny, ul. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: Gal — galaktoza; Glc — glukoza; GlcNAc — N-acetyloglucozaamina; GalNAc — N-acetylogalaktozoamina; Fuk — fukoza; Man — mannoza; GlcUA — kwas glukuronowy; G_{M1} — gangliozyd monosjalotetraheksozyloceramid; G_{M2} — gangliozyd-monosjalotriheksozyloceramid; G_{M3} — gangliozyd-monosjalodiheksozyloceramid; G_{D1a} i G_{D1b} — gangliozyd-disjalotetraheksozyloceramid; G_T — gangliozyd-trisjalotetraheksozyloceramid; Gl_3 — trójheksozyloceramid; p-CMB — parachloro-merkurobenzoesan, p-OHCMB — parahydroksymerkurobenzoesan; 4-MUB — 4-metylo-umbelliferon; pNP-paranitrofenol; cer — ceramid.

III. Characteristics of individual glycosidases

- III-1. β -hexosaminidase (E.C.3.2.1.30)
- III-2. β -galactosidase (E.C.3.2.1.23)
- III-3. β -glucosidase (E.C.3.2.1.21)
- III-4. α -galactosidase (E.C.3.2.1.22)
- III-5. α -fukozydase (E.C.3.2.1.51)
- III-6. α -mannosidase (E.C.3.2.1.24)
- III-7. β -glucuronidase (E.C.3.2.1.31)
- III-8. neuraminidase (E.C.3.2.1.18)

IV. Final remarks.

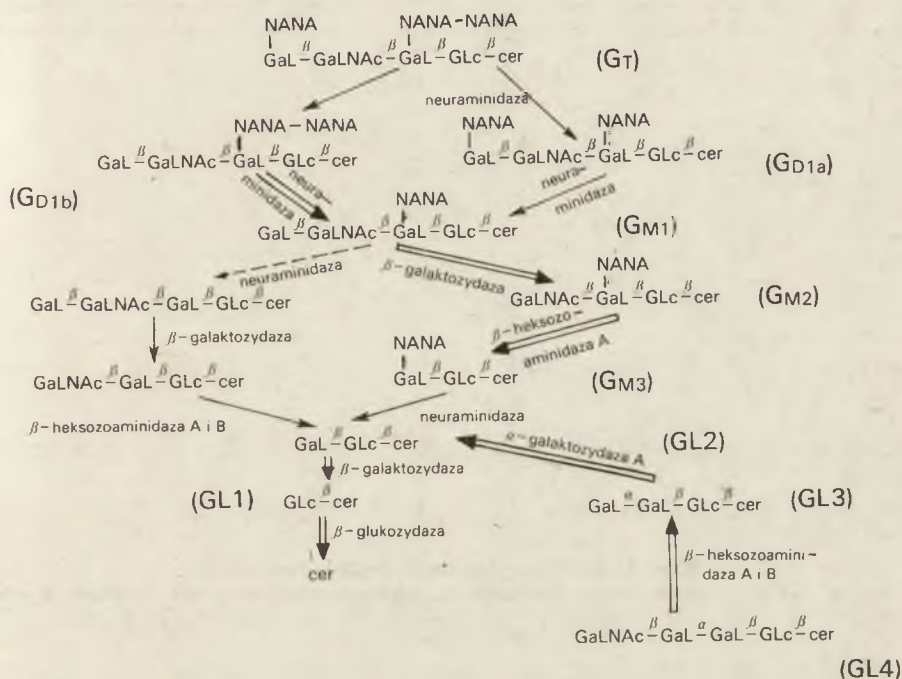
Biochemicy poświęcają więcej uwagi biosyntezie i funkcji makromolekuł, mniej zaś interesują się szlakami ich degradacji, choć lata pięćdziesiąte przyniosły odkrycia mające kapitalne znaczenie dla rozwoju badań nad tym właśnie aspektem metabolizmu.

Fundamentalne prace De Duve'a i Wattiaux (1, zob. 2) rzuciły światło na rolę lizosomów jako struktur zawierających hydrolazy kwaśne. W ich obrębie zachodzi rozpad makrocząsteczek do cząsteczek drobnych, łatwo dializujących, które bądź to zostają reutilizowane, bądź też zostają usunięte poza komórkę. W lizosomach właśnie rozkładane są heteropolisacharydy — glikolipidy, glikoproteidy, proteoglikany — pochodzące między innymi ze zniszczonych błon komórkowych. W procesie tym biorą między innymi udział tak zwane kwaśne egzoglikozydazy (E.C. 3.2.1.), enzymy, które w kwaśnym środowisku odszczepiają ostatnią cząsteczkę cukru od nie redukującego końca łańcucha oligosacharydowego. Enzymy te stały się ostatnio obiektem szczególnego zainteresowania biochemii medycznej. Okazało się bowiem, że dziedzicznie uwarunkowany brak aktywności lub zmiana właściwości określonej glikozydazy powoduje bardzo głębokie zaburzenia powodujące na ogół cofnięcie się rozwoju fizycznego i psychicznego — aż do głębokiego upośledzenia (3, 4 a,b,c,d). Dodatkowym czynnikiem stymulującym poszukiwania było udoskonalenie metodyki badawczej. Wyliczyć tu należy przede wszystkim wprowadzenie:

- syntetycznych substratów fluorogennych, które pozwoliły na opracowanie bardzo czułych metod oznaczania aktywności enzymatycznej;
- znakowanych *in vitro* substratów naturalnych — co pozwala na badanie swoistości enzymów;
- rozmaitych mikrotechnik rozdziału białek — co pozwala na izolowanie i badanie właściwości poszczególnych form molekularnych;
- hodowli *in vitro* komórek prawidłowych i nieprawidłowych, które pozwalają śledzić poza ustrojem procesy zachodzące w żywej komórce.

Ogólny zarys katabolizmu glikolipidów (5) i proteoglikanów (6) znajdzie czytelnik w numerach *Postępów Biochemii* z lat ubiegłych. Od tego czasu

przybyło wiele nowych informacji na temat występowania i właściwości fizykochemicznych różnych form molekularnych glikozydaz. Kilka z nich zostało oczyszczonych. Wyniki badań lat ostatnich rzucają też światło na ich powstawanie, transport do lizosomów oraz sposób działania *in vivo*. Ryciny 1 i 2 przedstawiające schematycznie przypuszczalne sekwencje



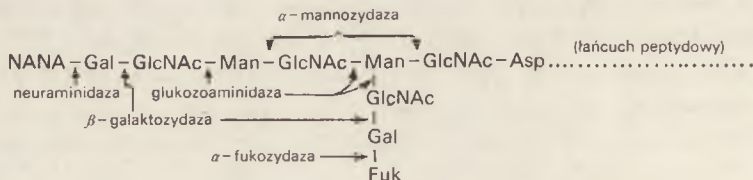
Ryc. 1. — Schemat katabolizmu glikolipidów.

Na rysunku zaznaczono główne szlaki katabolizmu glikolipidów, pomijając boczne, na przykład powstawanie disjalotri- i disjalodihexosylceramidów (G_{D2} i G_{D3}). Szlaki pewne oznaczono strzałką podwójną, szlaki ustalone *in vitro* — strzałką ciągłą, szlaki prawdopodobne — strzałką przerywaną.

G_T — trój- i disjalotetraheksosylceramid, G_{D1a} i G_{D1b} — disjalotetraheksosylceramid, G_{M1} — monosjalotetraheksosylceramid, G_{M2} — monosjalodihexosylceramid, G_{M3} — monosjalodihexosylceramid — nomenklatura gangliozydów według Swennerholma (zob. 3). GL_1 — tetraheksosylceramid, tzw. globozyd, GL_3 — trihexosylceramid, tzw. glikolipid Fabry'ego, GL_2 — dihexosylceramid, tzw. laktoceramid lub cytopilina H, GL_4 — glukozyloceramid.

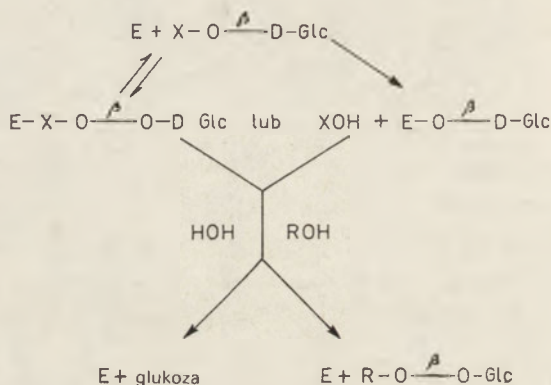
rozpadu cząsteczek — glikolipidów i glikoproteidów — oraz miejsce działania poszczególnych enzymów, ułatwią zapewne czytelnikowi orientację.

W artykule przedstawiono przede wszystkim wyniki ostatnich badań nad niektórymi, stosunkowo lepiej poznanymi glikozydazami tkanek ludzkich, zwłaszcza nad tymi, które grają kluczową rolę w katabolizmie tkanki nerwowej.



Ryc. 2. Schemat katabolizmu glikoproteidów.

Oligosacharydowy łańcuch boczny glikoproteidu. Strzałki wskazują miejsca działania glikozydaz. Na rysunku uwzględniono jedynie działanie egzoglikozydaz, które działają kolejno, odszczepiając ostatnią cząsteczkę cukru.



Ryc. 3. Schemat działania β-glikozydazy.

E — enzym, X-4-metyloumbelliferon, p-nitrofenol, dezoksykortikosteryd lub ceramid, R — ceramid.

I. Biosynteza, rozmieszczenie i działanie kwaśnych hydrolaz

Aktywność kwaśnych hydrolaz koncentruje się głównie w pęcherzykach lizosomalnych (1). Organelle te są przedmiotem badań bardzo licznej grupy cytologów i fizjologów. „Lizosomologia” stała się wiedzą skomplikowaną i rozległą. Szczegóły wyników badań tych struktur znajdzie czytelnik w obszernych pracach przeglądowych (2, 7 a,b,c,d, 8). Enzymy lizosomalne są glikoproteidami. Na ogół uważa się, że rdzeń białkowy enzymu syntetyzowany jest na polisomach, a następnie, podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych glikoproteidów (9, zob. 5), polipeptyd przemieszcza się do aparatu Golgiego, gdzie przyłączane są kolejne cząsteczki cukrów. W lizosomie znajduje się w pełni już „wykończona” cząsteczka enzymu. Proces glikozylacji może zachodzić bezpośrednio na błonie retikulum tzn. cząsteczka przesuwa się jak na taśmie (9,10, zob. 7a) — od polisomu aż do miejsca działania tj. lizosomu. Za takim mechanizmem wydają się przema-

wiać prace zespołu Goldstone'a i Koeniga, którzy z frakcji mikrosomalnej nerki wyodrębnili subfrakcję wzbogaconą w kwaśne hydrolazy (10) różniące się od analogicznych enzymów frakcji lizosomalnej wyższym pI, niższą zawartością kwasu sjałowego oraz tym, że trudniej uwalniają się do roztworu (10,12). Subfrakcja ta byłaby więc miejscem syntezy „preenzymów” lizosomalnych silnie związanych z błoną. Dopiero modyfikacja cząsteczki — na przykład przez dołączanie większej ilości kwasu sjałowego — w aparacie Golgiego przekształca białko w kwaśniejsze, łatwiej rozpuszczalne. Nie można jednak wykluczyć innego mechanizmu a mianowicie pierwotnie rozpuszczalne białko może być wychwytywane z cytoplazmy przez endoplazmatyczne retikulum, zagęszczane i glikozylowane w świetle kanalików aparatu Golgiego i następnie transportowane do lizosomów (11 a,b). Argumentem przemawiającym na korzyść tej drugiej wersji są wyniki prac zapoczątkowanych przez zespół Neufeld (13a,b,c,d). Okazało się bowiem, że jeżeli wspólnie hodować fibroblasty prawidłowe z fibroblastami nieprodukującymi na przykład α -iduronidazy, enzym przechodzi z komórek zdrowych do chorych, powodując korekcję ich metabolizmu (13a). Lizosomy fibroblastów inkorporują niektóre glikozydazy podane zewnątrzkomórkowo (13b) prawdopodobnie na zasadzie pinocytozy. Łatwość przenikania do fibroblastów zależy od źródła, z którego otrzymano oczyszczone enzymy — na przykład najłatwiej pobierana jest β -glukuronidaza izolowana z płytek krwi (14), a α -heksozoaminidaza izolowana z moczu (15). Zgodnie z hipotezą przedstawioną przez Winterburna (16) a także Bratschera (11 a,b) struktura łańcucha oligosacharydowego gra tu zapewne rolę swoistego markera: β -heksozoaminidaza zmodyfikowana działaniem nadjodanu (17a), a α -heksozoaminidaza zmodyfikowana działaniem β -galaktozydazy (17b) — zachowując aktywność enzymatyczną, tracą w dużym stopniu zdolność wnikania do lizosomów. Ostatnio stwierdzono jednak, że nie jest to zjawisko powszechne — β -galaktozydaza i α -glukozydaza nie przenikają z jednych fibroblastów do drugich (18).

Hydrolazy kwaśne odnajduje się też w innych frakcjach subkomórkowych oraz w cytosolu; pozostaje wciąż zagadnieniem otwartym, o ile fakt ten odzwierciedla stan w nieuszkodzonej komórce, czy też jedyną przyczyną jest heterogenność lizosomów oraz ich uszkodzenie w trakcie preparatyki. W płynach pozakomórkowych (surowicy, moczu, łzach, w pożywce otaczającej hodowlę fibroblastów) stwierdza się również obecność kwaśnych hydrolaz pochodzących zapewne przede wszystkim z rozpadu komórek; być może są to także enzymy nie „wychwywane” przez lizosomy i wydalane poza komórkę. W przypadku martwicy nerek stwierdza się podwyższone wydalanie enzymów w moczu (19) a w przypadku cukrzycy (20) i uszkodzenia wątroby na przykład w zatruciach alkoholem (21) — wzrost ich ilości w surowicy krwi. W pożywce otaczającej hodowlę zdrowych fibroblastów stwierdza się te same izoenzymy co w komórkach (22), natomiast w surowicy krwi (19,22,23), płynie mózgowo-rdzeniowym (19) i, w

niektórych przypadkach, w moczu (19,24) występują izoenzymy o niższym pI. Za wspólnym pochodzeniem enzymów wewnątrz i zewnątrz komórkowych przemawia ich pokrewieństwo immunologiczne a także fakt, że w tzw. defektach metabolicznych obserwuje się brak danego enzymu zarówno w komórkach jak i w płynach ustrojowych (zob. 7 b,c). Enzymy osocza mają prawdopodobnie więcej kwasu sjałowego (22,23,25). Opóźnia to zapewne wychwytywanie ich z krwioobiegu przez hepatocyty, które szybciej inkorporują glikoproteidy pozbawione kwasu sjałowego (26, zob. też 16). Enzymy wydalone z moczem pochodzą częściowo ze złuszczonych komórek kanalików nerkowych, częściowo z krwi (19).

Dodatkowym źródłem informacji na temat zależności budowy enzymu i jego ulokowania się w pęcherzyku lizosomalnym są badania nad enzymami nieprawidłowymi. Znana jest choroba lizosomalna zwana mukolipidozą II (lub *I-cell disease*), która objawia się między innymi bardzo niską aktywnością szeregu hydrolaz lizosomalnych w niektórych komórkach — na przykład w fibroblastach — przy równoczesnym bardzo wysokim poziomie tych enzymów w surowicy krwi chorych (27). Wbrew pierwotnym przypuszczeniom, że podłożem jest nieprawidłowość błony lizosomalnej i „ucieczka” enzymów (27), obecnie wydaje się, że podłożem jest błąd budowy cząsteczek całej grupy enzymów. Hodowane *in vitro* fibroblasty pochodzące od chorych wydzielają do pożywki znaczne ilości hydrolaz o niższym pI od enzymów wydzielanych przez fibroblasty prawidłowe (22), a zbliżonym do pI enzymów obecnych w surowicy osób zdrowych. Hydrolazy te, w odróżnieniu od enzymów wydzielanych przez komórki pochodzące od osób zdrowych, wyizolowane i dodane do pożywki nie są inkorporowane przez fibroblasty pochodzące od osób dotkniętych innymi chorobami metabolicznymi (28).

Prawdopodobnie nieprawidłowa budowa cząsteczki nie wpływa na ich właściwości enzymatyczne, natomiast uniemożliwia „rozpoznanie” przez błonę lizosomalną — czy prelizosomalną — i wbudowanie do lizosomu.

Dotychczas bardzo niewiele wiadomo o sposobie działania enzymów wewnątrz lizosomu, o mechanizmie i kinetyce reakcji. Środowisko wewnątrz lizosomu jest kwaśniejsze od otoczenia o 1,0 — 1,5 jednostek pH (29). Przyczyną tego zjawiska jest prawdopodobnie asymetryczna budowa błony lizosomalnej. Wchodzące w jej skład gangliozydy (30) i kwaśne glikoproteidy (31) znajdują się po wewnętrznej stronie, a akumulacja niedyfundujących anionów powoduje gromadzenie jonów wodorowych (29,31), które łatwiej niż kationy metali przechodzą przez błonę lizosomalną. Utrzymujący się gradient pH tłumaczy się równowagą Dönnana (29,31).

W pęcherzyku lizosomalnym enzymy prawdopodobnie częściowo swobodnie dyfundują, częściowo związane są z błoną. Nieswoiste, odwracalne wiązanie enzymów z błoną zależy od pH oraz siły jonowej i zachodzi prawdopodobnie przy udziale reszt kwasu sjałowego błony i zasadowych regionów białka enzymatycznego (31). Według niektórych autorów glikozydazy związane z błoną tworzą swoisty system wieloenzymatyczny (32,33).

Warunkiem prawidłowego katabolizmu jest właściwy kontakt nierozpuszczalnego substratu z odpowiednim miejscem błony prowadzący do utworzenia swoistego kompleksu, w którym zachodzi kolejne odszczepianie poszczególnych składników substratu przez odpowiednie enzymy (32, zob. 5).

Błona lizosomalna łatwo ulega uszkodzeniu: czynniki mechaniczne, szok osmotyczny, zamrożenie, działanie detergentów itp. — powodują zniszczenie organelli i wypływ enzymów. Zniszczenie lizosomu i solubilizacja enzymów niszczy struktury i, zmieniając warunki, zmienia właściwości enzymów. Badanie izolowanych i oczyszczonych enzymów stanowi konieczny etap prowadzący do poznania właściwości odpowiednich białek, co nie jest jednak równoznaczne z poznaniem działania danego enzymu *in situ* w lizosomie.

II. Ogólna charakterystyka glikozydaz

Jak już powiedziano w rozdziale I, zniszczenie lizosomu prowadzi do solubilizacji enzymów. Wiele informacji ogólnych o glikozydazach lizosomalnych znajdzie Czytelnik w starszych opracowaniach (4c, 34 a, b). Wszystkie znane glikozydazy są glikoproteidami o niskim pI (4—6) i są w pH bliskim pI trudno rozpuszczalne (35). Glikoproteidowy charakter tych białek wykorzystuje się w technice chromatografii powinowactwa. Przy pomocy lektyn roślinnych związanych z Sepharose można otrzymać roztwory wzbogacone w hydrolazy lizosomalne (36,37,38). Każda z hydrolaz może występować w różnych formach molekularnych, różniących się ładunkiem elektrycznym, termolabilnością, swoistością, właściwościami kinetycznymi, rzadziej masą cząsteczkową. Wydaje się, że w niektórych przypadkach formy te różnią się ilością kwasu sjałowego przyłączonego do tego samego rdzenia białkowego (10,12), dodatkowym drobnym peptydem (39), różnym sposobem połączenia podjednostek ze sobą (40) lub z innymi peptydami (41a); w innych przypadkach są to odrębne białka.

Enzymy lizosomalne w warunkach naturalnych są odporne na autolizę — jednak po uszkodzeniu pęcherzyka zarówno działanie egzogennej neuraminidazy (10,12), jak i dłuższe przechowywanie homogenatu komórkowego w warunkach sprzyjających autolizie (12) powoduje powolną zmianę ich ruchliwości elektroforetycznej i zmianę pI większości z nich (35).

Wyniki niektórych ostatnich badań podważają szeroko dotychczas przyjęte mniemanie, że glikozydazy zawdzięczają swój ujemny ładunek głównie obecności kwasu sjałowego. Niektóre oczyszczone enzymy nie zawierają bowiem tego związku (np. niektóre β -glukuronidazy, [42]) lub też nie zmieniają ruchliwości elektroforetycznej pod wpływem oczyszczonej neuraminidazy (25,43,44), co może być jednak wynikiem autolizy w trakcie preparatyki w pierwszym, a zamaskowania grup w drugim przypadku. Opty-

malne pH działania enzymów lizosomalnych przypada na obszar kwaśny 3,5 — 5,5, co umożliwia im działanie wewnątrz lizosomu a zapobiega niszczeniu innych struktur w przypadku uszkodzenia błony lizosomalnej i wydostania się enzymu do cytoplazmy.

Glikozydazy lizosomalne mają na ogół dość szerokie spektrum swoistości. Jak ilustrują przykłady w rozdziale III, enzymy „rozdzielają” rygorystycznie rodzaj wiązania glikozydowego, hydrolizując wyłącznie wiązanie α lub β , mniej precyzyjnie rozróżniając rodzaj cukru. Budowa aglikonu natomiast wydaje się mieć mniejsze znaczenie dla hydrolitycznego działania enzymu. Większość enzymów hydrolizuje nie tylko naturalne heteropolisacharydy ale także drobnocząsteczkowe sztuczne substraty na przykład pochodne p-nitrofenolu (p-NP) lub 4-metylumbelliferonu (4-MUB) — co znacznie ułatwia ich badanie. Sporą trudność metodyczną stanowi zmiana właściwości enzymatycznych zachodząca podczas oczyszczania enzymu. Czasem stwierdza się różnice między enzymami otrzymanymi z tkanki świeżej i zamrożonej (40), czasem utratę jakiejś aktywności po rozcieńczeniu (44) lub w trakcie oczyszczania enzymu (45 a,b, 46). Powodem tego może być na przykład oddzielenie glikopeptydowego aktywatora (46) lub zmiana konformacyjna (40). Zjawisko to jest źródłem rozbieżności między wynikami prac wielu autorów.

Z dotychczasowych badań wynika, że żadna ze znanych glikozydaz nie jest metaloproteidem. Jony metali nie mają też — poza nielicznymi wyjątkami — zasadniczego wpływu na reakcję enzymatyczną (zob. 4b). Komplex glikozydaz z przeciwciałem zachowuje na ogół aktywność enzymatyczną (41 a,b, 43,47,48), co stanowi właściwość rzadko wśród enzymów spotykaną a bardzo dogodną dla badań strukturalnych. Niektóre glikozydazy lizosomalne wykazują również aktywność transferazową (49,50a,b, 51a,b). W komórkach aktywność rozmaitych glikozydaz jest różna. Najaktywniejszym enzymem we wszystkich tkankach jest β -N-acetyloglukozoaminidaza (E.C.3.2.1.30), kilkaset razy niższa jest aktywność α -fukozydazy (E.C. 3.2.1.51), α -mannozydazy (E.C. 3.2.1.24) czy α -heksozoaminidazy (E.C. 3.2.1.50) — (Tabela 1). Trudno znaleźć wytłumaczenie tego faktu. Trudno też znaleźć uzasadnienie różnic tkankowych (Tabela 1 i 2). W obrębie jednej tkanki stwierdza się również różnice między typami komórek — na przykład w wątrobie najwyższą aktywność enzymów lizosomalnych wykazują komórki Kupfera, najniższą zaś komórki mięsiste (52a). Jest to zgodne z ogólną zasadą, iż komórki fagocytykujące zawierają więcej hydrolaz. Innym przykładem tego zjawiska są makrofagi z pęcherzyków płucnych (52b).

Enzymy lizosomalne pojawiają się już w komórkach płodu, przy czym krzywa zależności aktywności enzymu od wieku płodu oraz od wieku po urodzeniu — jest różna dla różnych enzymów (54,55). Enzymy komórek płodowych różnią się od enzymów osobników dojrzałych. Wraz ze starzeniem się organizmu wzrasta aktywność enzymów lizosomalnych, stają się

Tabela 1

Aktywność właściwa różnych glikozydaz lizosomalnych

Enzym	Tkanka mózgowa	Leukocyty obwodowe	Fibroblasty hodowane
β -glukozaaminidaza	260 ¹⁾ (55)	276 ^{x2} (53a) 1402 ²⁾ (53b)	3300—6100 ²⁾ (53c)
β -galaktozaaminidaza	—	190 ²⁾ (53b)	—
β -galaktozydaza	30 ¹⁾ (55) (100)	174 ²⁾ (53b)	282—606 ²⁾ (53c)
α -galaktozydaza	—	27 ²⁾ (53b)	18—33 ²⁾ (53c)
β -glukozydaza	15 ¹⁾ (55)	—	4—18 ²⁾ (53c)
α -fukozydaza	12 ¹⁾ (55)	—	18 ¹⁾ (53d)
α -mannozydaza	9 ¹⁾ (55)	181 ²⁾ (53b)	38—85 ¹⁾ (53c)
β -glukuronidaza	—	—	30—80 ²⁾ (144)
α -glukozaaminidaza	—	—	5.4 ¹⁾ (53d)
cerebrozydo- β -galaktozydaza	5—20* (53a) 50**)	3,2 (106) 0,81 ^x (53a)	0,56—5,6 (58, 100)
laktoceramido- β -galaktozydaza	20—50 (53b) 8.5 (100)	0,25 ^x (53a)	—
G _M - β ₁ -galaktozydaza	13 (100)	—	—

Aktywność wyrażona w nmolach substratu hydrolizowanych w ciągu 1 godziny przez 1 mg białka homogenatu tkankowego lub $\times 10^6$ komórek.

Tabela podaje wartości przybliżone, * — istota szara, ** — istota biała. Substraty pochodne: 1, pNP, 2, 4-MUB.

Tabela 2

Aktywność β -glukozaaminidazy w różnych tkankach (55)

Tkanka	Aktywność
Płyn mózgowo-rd.	0,6 ¹⁾
Surowica krwi	1,8 ¹⁾
Nerw obwodowy	24 ²⁾
Mięsień szkieletowy	25 ²⁾
Mózg	26 ²⁾
Trzustka	60 ²⁾
Jajnik	78 ²⁾
Tarczyca	120 ²⁾
Płuca	120 ²⁾
Serce	130 ²⁾
Śledziona	170 ²⁾
Nerki	205 ²⁾
Łożysko	240 ²⁾
Wątroba	250 ²⁾
Nadnercza	400 ²⁾

¹⁾ nmoli pNP- β -gluNAc na ml płynu i godzinę

²⁾ nmoli pNP- β -glcNAc na mg tkanki na godzinę

one łatwiej rozpuszczalne (54). W komórkach hodowanych *in vitro* aktywność właściwa glikozydaz lizosomalnych zależy od fazy wzrostu hodowli (56,57) i warunków hodowli (56,58). Wydaje się, że enzymy te syntetyzowane są we wszystkich fazach cyklu komórkowego (59). Stwierdza się jednak spore różnice między poszczególnymi subkulturami (58,60).

Ogólnym zaburzeniom metabolizmu towarzyszą też często zmiany właściwości enzymów lizosomalnych. Stwierdzono na przykład w niektórych przypadkach nowotworów wzrost ogólnej aktywności tych enzymów a także zmiany ich właściwości. W komórkach guza jelita dystalnego większość glikozydaz, nie różniąc się optimum pH działania, różni się od enzymów pochodzących z sąsiednich komórek zdrowych wartością stałej Michaelisa, pK_i wrażliwością na inhibitory oraz podwyższoną temperaturę. Krzywa inaktywacji cieplnej niektórych enzymów przybiera kształt sigmoidalny (61). Zmiany dotyczą prawdopodobnie struktury nieaktywnej części białka a nie centrum aktywnego. Charakterystyczne jest podobieństwo enzymów nowotworowych z enzymami płodowymi (61).

III. Charakterystyka poszczególnych glikozydaz

III-1. β -N-acetylohekszoaminidaza (E.C.3.2.1.30 — β -2-acetamido-2-deoksy-D-glukozidoacetamidoglukohydrolaza, β -hekszoaminidaza)

Enzym ten jest najwszechstronniej badany i najlepiej poznany ze wszystkich glikozydaz, ale jego budowa wciąż nie została ustalona. Trudności i problemy napotkane przy badaniu właściwości i wzajemnych stosunków różnych form molekularnych tego enzymu omówiono dość szczegółowo, są bowiem typowe dla badań tej grupy enzymów. Metodą elektroforezy na różnych podłożach — skrobi (62a,b,63,64), octanie celulozy (63, 65,66), żelu poliakryloamidowym (67), metodą elektroogniskowania (12,68, 70) oraz chromatografii jonowymiennej (19,62a,b, 64,69,70,71,72,73,74a i b) i powinowactwa (72) stwierdzono, że enzym ten występuje w kilku postaciach molekularnych. Przeważają dwie postaci — termolabilna, bardziej elektroujemna postać A oraz termostabilna postać B. Ich wzajemny stosunek ilościowy oraz obecność i ilość innych form jest różna w rozmaitych tkankach. Najwyższą aktywność enzymu stwierdzono w nadnerczach, nieco niższą w wątrobie, łożysku i nerkach, najniższą w tkance mózgowej i mięśniach (Tabela 2). W wątrobie, łożysku i nerkach jest stosunkowo najwięcej formy B (55). W większości tkanek występują dodatkowo termostabilne formy I_1 i I_2 o ruchliwości pośredniej między A i B (19). W płynach pozakomórkowych — moczu (19,73), limfie (73), ślinie (25), pożywce otaczającej hodowlę fibroblastów (22) występują te same formy molekularne co wewnątrz komórek. Wyjątek — jak już pisałam w rozdziale II — stanowi surowica krwi i płyn mózgowo-rdzeniowy (19) a także łyż (73), gdzie wy-

stępuje tzw. forma A^s — bardziej elektroujemna i słabiej wiązana przez DEAE celulozę (19,25,73). W surowicy kobiet ciężarnych (25,68) a także niektórych osób chorych na raka lub hiperlipidemię (68) występuje postać P termostabilna o ruchliwości pośredniej między A i B — a zbliżonej do ruchliwości I₂ (19). Enzym P nie występuje nigdy w innych płynach ustrojowych ani tkankach (25,68). Białko to często jest niejednorodne (68); jego ilość wzrasta z zaawansowaniem ciąży. Przypuszcza się, że pojawienie się formy P jest stymulowane przez hormony sterydowe (25). W tkankach chorych na wrodzony brak enzymu A i B (choroba Sandhoffa) (74a) wykryto inną termolabilną formę enzymu nazwaną S o wyższej ruchliwości elektroforetycznej (47, 74b). W tkankach ludzi zdrowych enzym ten stanowi 0,1⁰/o aktywności (47).

Wszystkie wyżej wymienione postacie enzymu hydrolizują syntetyczne β-pochodne zarówno N-acetylo-D-glukozaaminy jak N-acetylo-D-galaktozamininy, ale aktywność wobec β-N-acetyloglukozaaminidów jest kilkakrotnie wyższa (36,47,70,71,75). Reakcję enzymatyczną w wyciągach komórkowych stymuluje albumina (57,71), która działa ochronnie na enzym (71), a hamują jony octanowe (36,62a,76). Kationy metali nie mają wpływu na reakcję z wyjątkiem jonów Cu⁺⁺, które reakcję hamują (76). Inhibitorami o charakterze kompetytywnym są 2-acetamido-2-deoksy-D-galaktono- i 2-acetamido-2-deoksy-D-mannono-1,4-laktony; właściwość ta została wykorzystana do uzyskania metodą chromatografii powinowactwa preparatów wolnych od innych aktywności enzymatycznych a wzbogaconych we wszystkie formy molekularne β-heksozaminidazy (77).

W środowisku silnie kwaśnym (pH 2,0) wszystkie formy enzymu inaktywują się w sposób nieodwracalny (78). Inkubacja w pH 5,0 w temperaturze 50° w ciągu 3 godzin (20,36,68,78,79,80,81) lub 60° w ciągu 5 minut (79) a także w pH 2,8 w temperaturze 37° przez 5 minut (78) inaktywuje enzym A, nie wpływając na aktywność pozostałych form. Właściwość ta jest podstawą różnicowania aktywności A i B w mieszaninie.

Enzymy A i B zostały rozdzielone i częściowo oczyszczone po raz pierwszy przez Sandhoffa (75). Właściwości niektórych preparatów enzymatycznych zebrano w tabeli 3.

Nie wiadomo o ile różnice w masie cząsteczkowej i składzie cukrowym wyznaczanych przez różnych autorów wynikają z różnic metodycznych a o ile z rzeczywistych różnic narządowych. W przypadku innych glikozydaz różnice narządowe na pewno istnieją, skoro stopień inkorporacji enzymów podanych zewnątrzkomórkowo przez fibroblasty zależy od tego, z jakiego materiału został on izolowany (14,15). Izolowana β-heksozaminidaza B hydrolizuje substraty syntetyczne oraz globozyd i asjalo-G_{M2}-gangliozyd (75) (Ryc. 1), natomiast w przeciwieństwie do enzymu A (Tabela 3) nie rozkłada G_{M2} — gangliozydu (75) lub też rozkłada go w niewielkim stopniu przy zachowaniu odpowiednich warunków preparatyki (40,49), (enzym izolowany z tkanki niemrożonej — [40]). Prawdopodobnie swoistość poszcze-

Niektóre właściwości β -heksozoaminidazy pochodzącej z różnych źródeł

Materiał (pismienictwo)	m. cz. $\times 10^8$	pI	Opt. pH	K_M hydrolizy: ($\times 10^{-4}M$)				Inne substraty	U w a g i
				pNB- β GlcNAc	pNP- β GalNAc	4-MUB GlcNAc	4-MUB GalNAc		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tkanka mózgo- wa (enzym 3000-krotnie oczyszczony) (75)	—	—	4,8	—	—	—	—	G_{M_2} , asjalo- G_{M_1} , gło- bozyd, substraty syn- tetyczne	
Fibroblasty hodowane (71)	—	—	4,0	8,29	2,08	8,33	1,16	j. w.	Rekację stymuluje al- bumina, hamuje octan
Tkanka wątro- bowa (74b)	125 130 ⁽¹⁾	—	—	—	—	—	—		
Łożyско (enzym 4000-krotnie oczyszczony) (76)	140 ⁽¹⁾ 100 \pm ± 12	5,4	4,4	—	—	5,0	—		Ciepło aktywacji, 10500 kal. Inhibitory: Cu^{++} słabo, octan oraz p. OHMB-silnie.
Mocz (enzym 1000-krotnie oczyszczony) (36)	—	—	4,4—4,5	5,1	2,8	—	—		Zawiera: Gal, Man, GlcNAc i NANA. In- hibitory: aminocukry, octan, pCMB.
Surowica krwi (enzym tzw. A ^s 195 \times oczysz- czony) (83)	105 ⁽¹⁾⁽³⁾	4,73	4,5—5,0	8,3	1,7	5,55	1,08		Rekację stymuluje al- bumina. Inhibują: Hg^{++} , Ag^+ Zawiera mało heksoz, więcej GlcNAc i NANA. Nie dysocjuje w 6M chlo- rowodoru guaniny. Brak grup SH.

Termolabilna forma A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Termostabilna forma B	Tkanka mózgo- wa (75)	—	—	—	—	—	—	—	Substraty syntetyczne i glibozyd. Nie hydro- lizuje G _{M2} .	
	Fibroblasty hodowane (71)	—	—	—	8,33	3,12	8,30	1,1	j. w.	
Termolabilna forma S	Łożysko (enzym 2000-krotnie oczyszczony) (76)	140 ¹⁾ 101 ± ± 5 ²⁾	7,9	4,4	—	—	5,0	—		Inhibitory: pOHMB, octan, Cu ⁺⁺
	Homogenaty (74b)	151 ¹⁾	—	4,5	—	—	9,0	—		Inhibicja kompetytyw- na przez GalNac
	różnych tkanek (47)	158	—	4,5	—	—	—	—	Hydrolizuje: pochodne GlcNac: 4,6 × lepiej niż GalNac (enzym A—8,1 × lepiej) lub 2,8 × lepiej (A → 5,4 ×) (47)	i GlcNac mniejsza niż w przypadku A. Octan inhibuje słabo, mer- kaptocetanol nie inhi- buje (47)
B. termolabilna forma C	Łożysko Frakcja cyto- lowa (enzym 20-krotnie oczyszczony) (90)	~ 190 ¹⁾	5,7	7,0	—	—	8,3	—		Bardzo nietrwala
Termolabilny	Nerka konia A	125	6,07	—	—	5,7	—	—	Tetrasacharyd otrzy- many z glibozydu, asjalo-G _{M2} i G _{M2} -gan- glibozydu	
	B	125	8,20	—	—	0,8	—	—	Jedynie oligosacharydy nie zawierające kw. sja- lowego	Termostabilny
	A' (91)	250	6,25	—	—	2,46	—	—		B. termostabilny

1) — masa cząsteczkowa oznaczona przy pomocy sączenia molekularnego

2) — masa cząsteczkowa oznaczona przy pomocy ultrawirowania

3) — masa cząsteczkowa oznaczona przy pomocy innych metod

gólnych form *in vitro* i *in vivo* jest różna. U chorych na wrodzony brak β -heksozoaminidazy A (choroba Tay-Sachsa) obserwuje się gromadzenie dużych ilości G_{M2} -gangliozydu i, w mniejszym stopniu, jego asjalopochodnej (Ryc. 1) (84) *in vitro* rozkładanej przez enzym B. Widocznie nawet zwiększona ilość enzymu B — obserwowana w tych przypadkach — nie jest w stanie usunąć z komórki zbędnych już G_{M2} — gangliozydu i jego asjalowej pochodnej.

W niektórych chorobach stwierdza się dziedziczny brak β -heksozoaminidazy A lub też obu, A i B (41b,47,57,74a,84) — nigdy samej B — a więc istnieje związek genetyczny między tymi postaciami i powstanie formy A wydaje się być zależne od istnienia formy B. Enzym A reaguje z przeciwciałem przeciw postaci B i *vice versa* (41a,b,85). W latach 1972—73 stwierdzono, że dłuższe przechowywanie (41a,62b,75) oraz działanie niektórych handlowych preparatów neuraminidazy bakteryjnej (12,41a,80) oraz nieoczyszczonej neuraminidazy z mózgu (86) powoduje przejście formy A w postać „B-pochodną” — o identycznej termostabilności, ruchliwości elektroforetycznej, właściwościach immunologicznych i masie cząsteczkowej (43). Wyciągnięto wówczas z tego wniosek, iż postać A jest sjalową pochodną postaci B. Byłby to więc wyjątkowy przypadek, w którym dołączanie cząsteczki kwasu sjalowego zmieniałoby właściwości enzymatyczne — między innymi swoistość. Dalsze badania wykazały jednak, że oczyszczona neuraminidaza odszczepia kwas sjalowy jedynie od β -heksozoaminidazy A³, występującej w surowicy krwi (25). Czynnikiem przekształcającym enzym A w enzym „B-podobny” jest mertiolat (etylo-rtęciotio-salicylan) dodawany do handlowych preparatów enzymatycznych jako czynnik konserwujący (25,43). Działanie mertiolatu polega prawdopodobnie na blokowaniu grup -SH, gdyż dodanie cysteiny lub 2,3-dwumerkaptopropanolu chroni enzym A (43) przed przekształceniem w enzym „B-podobny”. Dalsze badania wykazały, że kilkakrotne zamrażanie roztworu oczyszczonej β -heksozoaminidazy A w 3 M roztworze NaCl powoduje powstanie nowych form B i S. Z mieszaniny enzymów B i S w tych samych warunkach powstaje enzym A niezależnie od tego, czy do doświadczenia użyto enzymów bezpośrednio izolowanych z tkanek czy też uzyskanych przez konwersję enzymu A (87). Immunizacja nieoczyszczonymi preparatami heksozoaminidazy lub oczyszczoną heksozoaminidazą A wywołuje powstawanie dwu rodzajów przeciwciał — jeden skierowany jest przeciw obu formom A i B, drugi skierowany jest wyłącznie przeciw formie A, ale reaguje też z formą S (47,74b). Postać „B-podobna” otrzymana przez działanie mertiolatu reaguje jedynie z przeciwciałem przeciw obu formom (43,82). W przypadku wrodzonego braku heksozoaminidazy A (choroba Tay-Sachsa) w teście immunoelektroforezy homogenat tkankowy daje z surowicą anty-heksozoaminidazie A jeden łuk precypitacyjny odpowiadający enzymowi B, w przypadku wrodzonego braku obu aktywności (choroba Sandhoffa) dwa łuki precypitacyjne, w pozycjach odpowiadających enzymom A i B, oba pozbawione aktywności

enzymatycznej (41a,b). Wyniki te wydają się potwierdzać hipotezę wysuniętą przez Robinsona i Carrola (88), że enzym składa się z podjednostek, z których jedna, β , zawiera centrum aktywne, druga α , modyfikuje cząsteczkę, umożliwiając reakcję z G_{M2} -gangliozydem. Schematyczny wzór enzymu A byłby więc $\alpha_n\beta_n$, enzymu B — $\beta_n\beta_n$ (41a,87) — na przykład $\alpha_3\beta_3$ i β_6 , natomiast forma S byłaby homopolimerem łańcucha α_6 (47,87). Przypuszczenie to potwierdzają wyniki badań nad β -heksozoaminidazą międzygatunkowych hybrydów komórkowych (63), choć tu opinie są sprzeczne (zob. 47). Robinson i wsp. (89) wyizolowali z homogenatów wątroby nieaktywny peptyd o masie cząsteczkowej 20 — 25 000, reagujący krzyżowo jedynie z przeciwciałem anty A. Przypuszczali więc, że jest to łańcuch α . Być może jednak, jest to ten sam glikopeptyd, który według Li i Li (46) nieswoiście stymuluje hydrolizę różnych glikolipidów (G_{M1} i G_{M2} — gangliozydów oraz trójheksozyloceramidu) przez odpowiednie glikozydazy.

Wyniki nowszych prac wnoszą nowe elementy. Według Tallmana i wsp. (40), którzy izolowali enzymy ze świeżej tkanki, oba enzymy składają się z takich samych 4 podjednostek o masie 33 000, a różnią się rodzajem wiązania tych podjednostek — byłyby to więc 2 konformery tego samego białka. Wyniki te są sprzeczne z wynikami większości innych autorów. Według Srivastavy i wsp. oba białka mają zablokowaną grupę aminową w N-końcowym aminokwasie a C-końcowy aminokwas stanowi seryna w enzymie A a asparagina lub kwas asparaginowy w enzymie B. Po S-karboksymetylacji lub działaniu bezwodnika kwasu maleinowego w obecności siarczanu dodecyłu enzym B dysocjuje dając jedną podjednostkę o masie cząsteczkowej 17 — 18 000, enzym A daje trzy podjednostki — jedną główną o masie cząsteczkowej również 17 — 18 000 i dwie o masie cząsteczkowej 35 000 i 55 000 (76).

Wydaje się, że formy I, I₂ i P są zbudowane z analogicznych łańcuchów glikopeptydowych różniących się łańcuchem oligosacharydowym, ale występują one w bardzo niewielkich ilościach i nie były szczegółowo badane (zob. 87).

Na podstawie ostatnich prac przypuszcza się, że przyczyną choroby Tay-Sachsa jest brak syntezy łańcucha α - wskutek czego powstaje jedynie enzym B, nie ma enzymów A ani S, natomiast przyczyną choroby Sandhoffa brak syntezy łańcucha β - wskutek czego nie powstaje enzym A ani B, natomiast łańcuchy α - tworzą homopolimer, enzym S (87). Ta hipoteza nie tłumaczy jednak obecności w tkankach chorych nieaktywnych enzymatycznie białek, w immunoelektroforezie zachowujących się jak enzymy A i B tj. reagujących w przeciwciałem przeciw łańcuchowi β (41a,b).

Sandhoff i wsp. (74a,84) zaobserwowali interesującą mutację, w której β -heksozoaminidazy A i B zachowały niezmienną właściwość elektroforetyczną i normalną zdolność do hydrolizy substratów syntetycznych, ale zatraciły zdolność hydrolizy G_{M2} -gangliozydu oraz jego asjalopochodnej,

co prowadziło do ogromnego gromadzenia obu związków w tkance mózgowej. (74a,84). Nie wiadomo na czym ta mutacja polega.

Heksozoaminidaza B i — w mniejszym stopniu — forma A, wykazują również aktywność transferazową (49) — przenosząc N-acetyloglukozoaminę z p-NP-GlcNAc na kwaśne terasacharydy pochodzące z hydrolizy siarczanu chondroityny. W warunkach optymalnych dla aktywności transferazowej (pH 6,5) aktywność hydrolityczna i transferazowa formy B są takie same, natomiast forma A wykazuje wyższą aktywność hydrolityczną. W e r n i e i wsp. wyrażają przypuszczenie, że heksozoaminidaza przed inkorporacją do lizosomu może spełniać w cytoplazmie rolę transferazy (49).

Glukozaaminidaza C, najbardziej nietrwała, termolabilna, o najwyższej ruchliwości elektroforetycznej, występująca głównie w łożysku i tkankach płodowych (65) a nigdy w surowicy (90) wydaje się nie być enzymem lizosomalnym a raczej rozpuszczalnym, cytosolowym (Tabela 3). Najwyższą aktywność stwierdzono bowiem we frakcji rozpuszczalnej homogenatu łożyska. Hydrolizuje ona jedynie β -N-acetyloglukozoaminy i nie reaguje z przeciwciałami skierowanymi przeciw heksozoaminidazie A i B (90). Podobieństwo właściwości elektroforetycznych enzymu C i S wywołuje duże zamieszanie. Niektórzy autorzy uważają, że to właśnie enzym C jest homopolimerem łańcuchów α , opierając się na spostrzeżeniu, że w międzygatunkowych hybrydach komórkowych geny kodujące syntezę enzymu A i C wydają się być sprzężone (63).

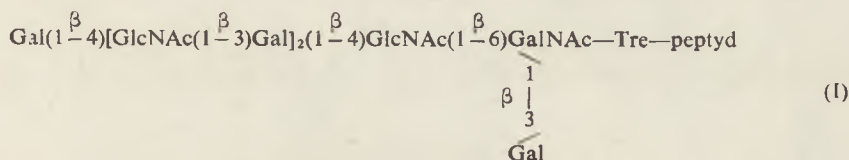
Przedstawione wyniki badań dotyczą β -heksozoaminidazy człowieka. Zwierzęta miewają odmienny układ izoenzymów. W nerce konia stwierdzono obecność trzech enzymów nazwanych A, B i A'. (Tabela 3). Postacie A i B wydają się być analogiczne do ludzkich. Nie stwierdzono przekształcenia enzymu A w B (91).

III-2. β -galaktozydazy (E.C.3.2.1.23, β -galaktozydgalaktohydrolazy).

Badając zdolność surowych homogenatów wątroby do hydrolizy β -galaktozydów w środowisku kwaśnym stwierdzono elektroforetycznie istnienie trzech form aktywności, z których 2 główne oznacza się zazwyczaj literami A i B (92,93,94), formy C jest bardzo niewiele. Właściwości niektórych preparatów enzymatycznych przedstawia tabela 4. Ogrzewanie w 50° inaktywuje oba enzymy A i B (95,96,97). W wyniku sączenia molekularnego na kolumnach z Sephadex G-200 uzyskać można dwie frakcje, ale enzymy w obu frakcjach mają dwa optima pH i stałą K_M tego samego rzędu (95). Oba enzymy w 95% absorbują się na kolumnie z konkanawaliną A i w 60% na kolumnie z lektyną z kielków pszenicy, z czego wynika, że zawierają α -mannozę i N-acetylogalaktozoaminę (38). Reakcję enzymatyczną hamują siarczanowe glikozoaminoglikany (98), natomiast chlorek sodu w stężeniu 125 mM stymuluje reakcję (94,96,97,99), zapewnia liniową zależność hydrolizy od czasu i ilości białka, stabilizuje enzym (94,96,97), zmie-

nia optimum pH reakcji (96) oraz znosi hamujący wpływ glikozaaminoglikanów (98). Obie formy enzymu hydrolizują zarówno syntetyczne substraty jak i G_{M1} — gangliozyd, asjalo- G_{M1} -gangliozyd i laktoceramid (94,95,100), natomiast nie hydrolizują galaktozyloceramidu (97) (Ryc. 1). Aktywność przy optimum pH równym 6,0 wydaje się nieswoista, znika bowiem w miarę oczyszczania enzymu, a w homogenatach optymalne pH hydrolizy G_{M1} -gangliozydu wynosi 4,2 — 4,5 (101).

Hydroliza glikolipidów zachodzi *in vitro* jedynie w obecności detergentów (94,100). Stwierdzono identyczność centrum aktywnego enzymu dla hydrolizy zarówno G_{M1} -gangliozydu jak i 4-MUB- β -gal (102). Norden i wsp. stwierdzili, że oczyszczona β -galaktozydaza A w bardzo słabym stopniu hydrolizuje również β -fukozydy, α -L-arabinozydy i laktulozę (102). Być może przyczyna leży jednak w niedostatecznym oczyszczeniu preparatu. W niektórych przypadkach wrodzonych niedoborów brak jest wszystkich trzech typów aktywności (94), w innych jedynie aktywności B i C (93,95, 101). Sugeruje to istnienie powiązania genetycznego między tymi formami. Sugestię tę potwierdza obserwacja, że przeciwciała uzyskane przez immunizację enzymem A wytrącają z homogenatów tkankowych zarówno enzym A jak i B (102), natomiast nie reagują z obojętną β -galaktozydazą o optimum pH 6,0 (97). Pośrednie dane świadczą o roli omawianego enzymu w katabolizmie proteoglikanów. W wątrobie chorych, u których stwierdzono brak jego aktywności, gromadzi się glikopeptyd będący prawdopodobnie pośrednim produktem katabolizmu siarczanu keratanu. Budowę jego łańcucha oligosacharydowego przedstawia wzór I. (103). Glikopeptydy o podobnej budowie chorzy wydalają z moczem (104). Dawson zaobserwował dziedziczny brak jedynie enzymu hydrolizującego laktoceramid, czego skutkiem była akumulacja w tkance mózgowej tego związku oraz niewielkich ilości asjalo G_{M2} -, G_{M2} i G_{M1} -gangliozydów (105). Trudno powiedzieć, czy obserwowana mutacja powodowała zmianę swoistości β -ga-



laktozydazy, czy też laktoceramid pochodzący z gangliozydów jest w tkance mózgowej rozkładany przez inny enzym, którego brak w chorobie Dawsona.

Wydaje się, że *in vivo* wszystkie trzy formy prawidłowego enzymu odszczepiają cząsteczkę galaktozy z zakończenia łańcucha oligosacharydowego zarówno glikoproteidów jak i glikolipidów o charakterze bardziej polarnym — głównie gangliozydów. Hydrofobowy charakter aglikonu uniemożliwia zapewne kontakt enzymu z galaktozyloceramidem; natomiast w przypadku laktoceramidu dodatkowa cząsteczka glukozy oddala dostatecznie

Właściwości β -galaktozydazy

I	Materiał (pismienictwo)	M. cz. $\times 10^3$	pI	Opt. pH	K_M hydrolizy ($\times 10^{-4}M$)			U w a g i
					pNP- - β -Gal	4-MUB - β -Gal	Inne substraty	
	2	3	4	5	6	7	8	9
	Homogenat wątroby	—	—	4,5 i 6,0	—	3,6	hydrolizuje G_{M1} - i asjalo- G_{M1} , gangliozyd oraz laktoceramid	termolabilny
	Homogenat mózgu (95)	—	—	4,5	—	—	—	—
	Ekstrakt z fibroblastów hodowanych (96)	—	—	4,0—4,5	—	4,12 i 5,0	—	Dwie populacje enzymu, obie termo- labilne, — NaCl stymuluje i stabilizuje enzym. Inhibitory: Gal, D-ga- laktono-1,4-lakton. pCMB
	Tkanka wątrobowa (94) A i mózgowa B	60—70 601	—	4,2—4,7 4,2—4,7	—	hydrolizuje	hydrolizuje laktoceramid	Stymulują detergenty jonowe oraz NaCl, który stabilizuje enzym.
	Tkanka mózgowa królika Enzym A oczyszczony 400-krotnie (100)	—	6,3	4,3—4,5	1,7	4,0	G_{M1} , — 0,78 laktoceramid — — 0,17	Stymuluje NaCl, hydrolizę gliko- lipidów stymulują detergenty. Hamują: D-Gal, D-galaktono-1,4- -lakton słabo laktoza.
	Tkanka wątrobowa Enzym A oczyszczony 200-krotnie (97)	—	—	4,0	—	—	hydrolizuje: G_{M1} , asjalo G_{M1} , lakto- ceramid, substraty syntetyczne	Termolabilny NaCl stymuluje hydro- lizę i stabilizuje enzym
	Tkanka wątrobowa Enzym A oczyszczony 17000-krotnie (102)	65—75	—	—	—	—	Hydrolizuje: laktoceramid, G_{M1} -ganglio- zyd, monogalaktozyd digliceryd, laktozę, N-acetylolaktozoamine, asjaloftuine, ga- laktazylohydroksylizynę, pNP- β -Gal, 4-MUB- β -Gal.	Hydrolizują również laktulozę, β -fukozidy i α -arabinozidy (nie- swoiscie?) Wspólne centrum aktywne hydrolizy substratów syntetycznych i glikoli- pidów.

Enzym hydrolizujący substraty syntetyczne

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cerebrozydo- β -galaktozydaza	Leukocyty obwodowe (107)	—	—	4,2	Hydrolizuje: Galaktozoceramid i lakto-ceramid. Nie hydrolizuje pNP- β -Gal i 4-MUB- β -Gal			Reakcję stymuluje kwas olejowy
	Tkanka mózgowa (50a, b) szczura			4,5 dla obu reakcji	Nie hydrolizuje pNP- β -Gal ani 4-MUB- β -Gal. Hydroliza Gal-cer/ K_M $17 \times 10^{-4}M$) reakcji przenoszenie Gal na ceramid K_M $1 \times 10^{-4}M$.			W reakcji transgalaktozylacji, dawcą galaktozy może być 4-MUB- β -Gal oraz Gal-digliceryd

galaktozę od ceramidu, co ułatwia jej dostęp do centrum aktywnego enzymu.

Cerebrozyd (tj. galaktozyloceramid), jeden z podstawowych lipidów mieliny, hydrolizowany jest przez swoistą cerebrozydo- β -galaktozydazę (54, 106), która rozkłada prócz tego również psychozynę (galaktozylo-sfingozynę), laktoceramid (107) oraz monogalaktozyłodwugliceryd (50a). Optymalne pH reakcji *in vitro* wynosi 4,2 (107) do 4,5 (54) a reakcja wymaga obecności taurocholanu i kwasu olejowego (54,107); stymuluje ją również Tween-20 i stearynian polioksoetyleny (54). Enzym nie hydrolizuje pNP- β -Gal ani 4-MUB- β -Gal — wydaje się więc, że reaguje jedynie z galaktozydami, których aglikon ma charakter hydrofobowy.

Cerebrozydo- β -galaktozydaza mózgowa wykazuje również działanie transgalaktozydazy. Donatorem galaktozy mogą być (w kolejności efektywności): pNP-Gal, Gal-cer, laktoceramid, laktozylosfingozyna, 4-MUB-Gal, asjalo- G_{M1} , G_{M1} oraz monogalaktozyłodwugliceryd (50b). W odpowiednich warunkach około 10% odszczepionej galaktozy zostaje przeniesiona na oleilo-sfingozynę (ceramid) z utworzeniem galaktozyloceramidu (50 a,b). Akceptorem, prócz ceramidu, może być prawdopodobnie glukozyloceramid; produktem reakcji w tym przypadku jest laktoceramid (50b). Wydaje się, że reakcja ta nie jest prostym odwróceniem reakcji hydrolizy. Prawdopodobnie tworzy się związek pośredni, z którego cząsteczka galaktozy może być przeniesiona na wodę (hydroliza) lub odpowiedni aglikon (synteza) (patrz rozdz. III-3) (50b).

W przypadku wrodzonego braku enzymu nierozłożony cerebrozyd wywołuje pojawienie się i rozrost tzw. komórek globoidalnych, cerebrozyd infiltruje do tych komórek i w nich gromadzi się (108). Podobny obraz (109) uzyskuje się przez podanie cerebrozydu do hodowanych *in vitro* komórek nerwowych. W rozwijającej się tkance mózgowej komórki globoidalne proliferując „zagłuszają” komórki oligodendrogleju, które zaprzestają produkcji mieliny (110,111). W wyniku tego procesu stwierdza się obniżenie ilości wszystkich lipidów wchodzących w skład mieliny — w tym również cerebrozydu (110). W odróżnieniu jednak od innych przypadków demielinizacji i dysmielinizacji zmieniony jest stosunek cerebrozydu do sulfatydu, który w istocie szarej zamiast 2,20 wynosi 3,53 (110). Wtórny następstwem jest zaburzenie metabolizmu wszystkich innych lipidów tkanki mózgowej — między innymi zmiana rozkładu odsetkowego gangliozydów (110, 112), zmiany w obrocie kwasów tłuszczowych itp. (112).

III-3. β -glukozydaza (E.C.3.2.1.21, β -glukozydoglukohydrolaza)

Surowe homogenaty tkankowe hydrolizują 4-MUB- β -Glc. W przypadku homogenatu leukocytów (113,114) i tkanki mózgowej (115) reakcja ma dwa szczyty optimum pH — około 4,5 i 5,3, w przypadku fibroblastów

jeden, szeroki, przy pH 4,0 — 4,5 (44,114). Na ogół Triton X-100 (44) i inne detergenty (51a,115,116) stymulują aktywność przy pH 4,5, według niektórych autorów w przypadku tkanki mózgowej przy pH 5,3 (115). W tkance mózgowej znajduje się najwyższa aktywność w podwzgórzu i korze mózgowej, najniższa w mózdzku (115).

Istnieją podstawy do przypuszczeń, że w tkankach występują dwa odrębne enzymy: rozpuszczalny o optimum pH 5,3 hydrolizuje glukozydy drobnocząsteczkowe między innymi 4-MUB- β -Glc (116,117) a także glukozydy sterydów (116), zaś nie hydrolizuje glukozyloceramidu, natomiast drugi, bardzo silnie związany ze strukturami subkomórkowymi, hydrolizuje 4-MUB- β -Glc, pNP-Glc (116,51a,b), 17- β -estradiolo-17- β -glukozyd i — 3- β -glukozyd (116) oraz glukozyloceramid (51a,b, 116) i glukozylosfin gozynę (118) a także, bardzo słabo, cellobiozę, gencjbiozę i β -metyloglukozyd (51a,b).

Tak więc, cerebrozydo- β -glukozydaza w odróżnieniu od cerebrozydo- β -galaktozydazy, hydrolizuje zarówno glikolipidy jak i glikozydy rozpuszczalne w wodzie. Niektóre właściwości β -glukozydazy przedstawia tabela 5.

Ho i O'Brien (122 a,b) stwierdzili, że pełna aktywność enzymatyczna β -glukozydazy przejawia się po połączeniu dwu składników — związanego z błoną składnika C i rozpuszczalnego glikoproteidu P. Składnik C, wrażliwy na podwyższoną temperaturę, hydrolizuje wprawdzie glukozyloceramid, ale prawie 10 razy szybciej hydrolizuje 4-MUB- β -Glc. Składnik P nie ma właściwości enzymatycznych i jest niewrażliwy na podwyższoną temperaturę. Dodanie czynnika P podwyższa 7,4 razy aktywność enzymatyczną składnika C wobec 4-MUB-Glc i aż 39 razy wobec Glc-cer tak, że w rekonstruowanym enzymie stosunek obu aktywności wynosi 1,8 (122 a i b). Czynniki P powoduje też przesunięcie optimum pH działania enzymu izolowanego z łożyska z 6,0 — 6,5 do 5,0 (121 a). Być może czynnik P jest identyczny z nieswoistym aktywatorem opisanym przez Li i Li (46). Spadek aktywności enzymu w czasie przechowywania (121 a) oraz po rozcieńczeniu homogenatu (44) można tłumaczyć nietrwałością enzymu, odłączaniem się czynnika P (121 a) lub też brakiem fosfolipidowego aktywatora (121 b).

Znane są przypadki wrodzonego braku obu postaci enzymu (tzw. postać dziecienna choroby Gaucher) lub też jedynie enzymu związanego z elementami strukturalnymi (postać młodzieńcza choroby Gaucher), (116) — co sugeruje związek genetyczny między obiema formami enzymu. W narządach wewnętrznych tych chorych gromadzą się — prócz glukozyloceramidu — ogromne ilości glikoproteidów o bardzo heterogennych łańcuchach oligosacharydowych, co świadczy o udziale enzymu w katabolizmie tych związków (119,120). W tkance nerwowej obserwuje się stosunkowo nieznaczne gromadzenie glukozyloceramidu, co nasuwa przypuszczenia, że cerebrozyd powstały z gangliozydów usuwany jest w inny sposób (33). *In vivo* inhibitorem glukocerebrozydazy jest N/n-heksylo-O-glukozylosfingo-

Właściwości β -glukozydazy

Materiał (piśmiennictwo)	M. cz. $\times 10^8$	Opt. pH	K_M hydrolizy ($\times 10^{-4}M$):			K_M przenoszenia ($\times 10^{-4}M$)		U w a g i
			pNP- β -Glc	4- -MUB β -Glc	Glc- cer	Glc na cer z: 4- -MUB β -Glc	Glc—cer β -Glc	
Tkanka mózgowa ^a (123)	—	4,5	—	25	2,5	20 ¹⁾	0,75 ¹⁾	Reakcje hydrolizy i przenoszenia stymulują: „glikopeptyd Gaucher” (119) i detergenty, zwłaszcza jonowe. Hamują — inne substraty (kompetytywne), D-glukono-1,4-lakton, nojirimycyna.
Śledziona (51a)	—	5,0	—	20	2,8	20 ¹⁾	0,75 ¹⁾	Hydrolizuje również glukozidy sterydów, glukozyl-sfin-gozyne, cellobiozę, gencjbiozę i β -metyloglukozyd.
Śledziona oczyszczony (51b)	—	5,0	—	25	1,25	1,49 ²⁾	1,49 ²⁾	Reakcję hydrolizy i transglukozylacji stymulują: „glikopeptyd Gaucher” (119), taurocholan sodu. Inhibują: inne substraty, D-glukono-1,4-lakton, nojirimycyna.
Łożyisko Enzym 86-krotnie oczyszczony (51b)	—	5,0	—	25	1,25	—	1,25 ¹⁾	Stymulują: j. w. Inhibują: j. w. glukozyd dezoksychohanu, condurital β -epoxide, siarczan pCMB.
Łożyisko Enzym oczyszczony 4000-krotnie (121a)	4 \times 60	6,0— —6,5	100	28	0,65	—	—	Nietrawny, stabilizują go gliceryd i dwutioerytrol — łatwo agreguje. W obecności Tritonu \times -100 monomer. Czynnik P (122) przesuwają optimum pH do 5,0. Aktywują enzym kwaśne fosfolipidy (121b).

¹⁾ Wartość stałej K_M obliczona dla donora glukozy²⁾ Wartość stałej K_M obliczona dla akceptora glukozy (ceramidu)

zyna. Hodowane komórki po dodaniu tego związku do pożywki tracą zdolność rozkładania glukozyloceramidu — stając się modelem choroby Gauchera (33). Katabolizm gangliozydów pozostaje niezmieniony (33). Oczyszczona cerebrozydo- β -glukozydaza wyizolowana z mózgu (123) i ze śledziony (51 a i b) wykazuje również aktywność transferazową. Donatorem glukozy może być 4-MUB- β -Glc, pNP- β -Glc, Glc-cer i, w bardzo słabym stopniu, dezoksykortykosterydo-glukozydy (51a), natomiast enzym nie stymuluje przyłączenia wolnej glukozy ani przeniesienia jej cząsteczki z β -metyloglukozydu (123), UDP-glukozy i 1-P-glukozy (51a). *In vitro* reakcja zachodzi jedynie w obecności detergenta (51a,123) a stymuluje ją również glikoproteid Gauchera (51a,b,123). K a n f e r i wsp. (51b) uważają, że tworzy się kompleks enzymu z substratem. Zależnie od warunków cząsteczka glukozy odłączona od kompleksu przeniesiona być może na cząsteczkę wody lub ceramidu. Proponowany schemat reakcji przedstawia rycina 3 (p. str. 232).

III-4. α -galaktozydaza (E.C.3.2.1.22, α -galaktozydogalaktohydrolaza)

Metodą elektroforezy oraz chromatografii jonowymiennej można wyróżnić dwie postacie kwaśnej α -galaktozydazy — termolabilną formę A i termostabilną formę B (48,124,125). Różnice w ruchliwości elektroforetycznej obu postaci zależą od podłoża i pH buforu. W elektroforezie na żelu skrobiowym w pH 7,0 enzym A ma wyższą ruchliwość anodową (125), na octanie celulozy w pH 6,5 — niższą (131). Stosunek ilościowy obu postaci jest różny w różnych tkankach (126). Metodą elektroogniskowania w wyciągu z fibroblastów można stwierdzić heterogenność enzymu — uzyskano 7 pasm aktywności o pI: 3,60; 3,74; 3,80; 4,34; 4,60; 6,40 oraz 6,80. Dwa ostatnie są prawdopodobnie agregatami (127). Właściwości enzymu przedstawia tabela 6.

Enzym A hydrolizuje zarówno substraty syntetyczne i mellibiozę jak i glikolipidy (patrz Ryc. 1). Reakcje hydrolizy trójheksozyloceramidu (Gl_3) i substratów syntetycznych różnią się od siebie optymalnym pH i charakterem krzywej Lineweavera-Burka, a wzajemne hamowanie hydrolizy jednego substratu — drugim nie ma charakteru kompetytywnego (128). Glikolipid Gl_3 rozkładany jest jedynie w obecności Tritonu X-100 i taurocholalanu sodu; albumina nieco hamuje reakcję, zaś obecność soli np. 0,2 M NaCl lub $(NH_4)_2SO_4$ całkowicie ją hamuje. Hydrolizę Gl_3 hamuje produkt reakcji — laktoceramid, wyższe stężenie Gal-Gal-cer oraz glukozyloceramid, natomiast obecność galaktozyloceramidu, ceramidu i kwasów tłuszczowych nie wpływa na przebieg reakcji a obecność Gal- α Gal-cer w niskich stężeniach reakcję stymuluje (128). Hydrolizę substratów syntetycznych hamuje galaktoza i mellibioza (48,128,129a) oraz mioinozytol (48,129a), natomiast obecność glikolipidów, albuminy ani detergentów nie wpływa na reakcję (128). Na tej podstawie H o przypuszcza, że hydroliza glikolipidów wyma-

Material	M. cz. $\times 10^6$	PI	Opt. pH	K_m hydrolizy ($\times 10^{-4}M$)			U w a g i
				4-MUB- α -Gal	Gl ₃	Inne substraty	
Forma A							
Homogenat fibroblastów i wątroby (127)	90	—	4,5 ¹⁾	40			Termolabilna
Homogenat leukocytów i fibroblastów (125)				49			Termolabilna
Tkanka wątrobowa Enzym 57-krotnie oczyszczony (128)	—	—	4,5 ¹⁾ 3,5 ²⁾	20	0,5	Gal ^{α} -Gal — cer	Hydrolizę Gl ₃ stymuluje Triton \times -100 + taurocholan hamuje albumina, NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄
Tkanka wątrobowa Enzym 2606-krotnie oczyszczony (131)		5,1		20	hydrolizuje	—	Termolabilna
Łożyisko (oczyszczenie 6—7-krotnie) (48)	150	4,7	4,5 ¹⁾ (szeroki zakres)	34	0,5	mellibioza — 406	Termolabilna. Hydrolizę Gl ₃ hamuje mellibioza i mioinozytol. Stymuluje Triton \times -100. Energia aktywacji 15700 kal.
Forma B							
Homogenat fibroblastów i leukocytów (125)	—	—	—	191	—	—	Termostabilny
Tkanka wątrobowa Enzym 223-krotnie oczyszczony (31)	—	4,9	—	117	—	bardzo słabo hydrolizuje Gl ₃	Termostabilny
Łożyisko (Oczyszczenie 6—7-krotnie) (48)	150	4,42	4,5 ¹⁾ (wąski zakres)	—	—	nie hydrolizuje mellibiozy ani Gl ₃	Termostabilny

1) Dla hydrolizy 4-MUB- α -Gal2) Dla hydrolizy Gl₃:Gl₃: Gal ^{α} -Gal β -Glc β -cer (patrz Ryc. 1)

ga odpowiedniej modyfikacji cząsteczki a niektóre glikolipidy (laktoceramid i glukoceramid) współzawodniczą o miejsce modyfikujące (128).

Enzym B, bardziej termostabilny, nie hydrolizuje mellibiozy (48,129a), natomiast, wbrew dawniejszym sugestiom (48,128), hydrolizuje — choć w bardzo niewielkim stopniu — trójheksozyloceramid (Gl₃) (129a). Brak aktywności α -galaktozydazy A w komórkach, któremu towarzyszy zazwyczaj podwyższenie aktywności α -galaktozydazy B (129 b) powoduje gromadzenie się w tkankach, trójheksozyloceramidu (zob. 4 a i b). Fakt ten sugeruje, że *in vivo* glikolipid jest hydrolizowany głównie, jeśli nie jedynie, przez enzym A. Krzywa zależności aktywności enzymu B od temperatury sugeruje, że w temperaturze 25° białko enzymatyczne zmienia konformację (48). Działanie neuraminidazą na mieszaninę enzymów powoduje zmniejszenie ruchliwości anodalnej poszczególnych postaci enzymu (126, 130), lecz nie powoduje przejścia jednej postaci w drugą (48,126,131). Działanie neuraminidazą na oczyszczony enzym nie zmienia właściwości enzymatycznych enzymu A, natomiast zmniejsza do 1/3 zdolność enzymu B do hydrolizy glikolipidu F a b r y ' e g o (131). Przeciwciała uzyskane przez immunizację oczyszczonym enzymem A precypitują jedynie enzym A i jego desjalową pochodną, to samo dotyczy przeciwciał przeciw enzymowi B (48, 124), co świadczy o odrębności obu białek. Dziedziczny brak aktywności α -galaktozydazy A (tzw. choroba Fabry'ego) przekazywany jest jako cecha związana z chromosomem X (132, zob. 4 a i b), dlatego przypuszczano, że „gen rządzący syntezą” α -galaktozydazy A mieści się na tym chromosomie. Okazało się jednak, że mieszańce konia i osła — zarówno muły jak i osłomuły — mają, niezależnie od płci, dwa izoenzymy pochodzące od obojga rodziców (125). Wydaje się więc, że gen strukturalny mieści się na innym chromosomie, natomiast na chromosomie X znajduje się gen kontrolujący ekspresję enzymu, albo też, że enzym zbudowany jest z podjednostek i synteza jednej z nich kontrolowana jest przez gen umieszczony na chromosomie X.

III-5. α -fukozydaza (E.C.3.2.1.51, α -L-fukozydofukohydrolaza)

Udział fukozydazy lizosomalnej wydaje się konieczny w katabolizmie glikoproteidów i złożonych fukoglikolipidów na przykład substancji grupowych krwi. Niektóre fakty pośrednio potwierdzają to przypuszczenie — brak aktywności α -fukozydazy kwaśnej prowadzi do gromadzenia obu rodzajów związków w tkankach chorego (133 a i b). Niestety bardzo mało wiemy o tym enzymie. Zostały oczyszczone α -fukozydazy Nielizosomalne na przykład z najądrza szczura enzym o masie cząstkowej 210—220 000, pI 6,3 i optimum pH 6,3 (134). Przy pomocy elektroforezy na skrobi w homogenacie wątroby (135) w fibroblastach i limfoblastach (23) można wyróżnić 6 pasm enzymu aktywnego w pH 4,8, w leukocytach obwodowych — 3 do 4, natomiast w osoczu tylko jedno pasmo różniące się od pozostałych naj-

wyższą ruchliwością anodalną (23). pI poszczególnych pasm otrzymanych z homogenatu wątroby wynosi: 6,9, 6,5, 6,1, 5,9, 5,7, 5,5, (135). Działanie neuraminidazą na homogenat zmniejsza ruchliwość dwu pasm anodalnych (23, 135). Jedynie niektóre z tych form są zapewne pochodzenia lizosomalnego. Turner i wsp. zauważyli polimorfizm genetyczny α -fukozydazy kwaśnej, widoczny najwyraźniej po rozdziale metodą elektroogniskowania białek homogenatu leukocytów poddanego najpierw działaniu neuraminidazy. Wyróżnia się trzy fenotypy — 1, 2 i 2-1, będące rezultatem działania dwu allelicznych genów kodominujących Fu^1 i Fu^2 . W badanej populacji Nowego Yorku wśród białych gen Fu^1 był trzy razy częstszy a wśród Murzynów 13 razy częstszy od genu Fu^2 (136).

Metodą sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-200 rozdzielić można z homogenatów różnych tkanek dwie główne aktywności α -fukozydazy. Obie frakcje łącznie są termostabilne. Oddzielna frakcja I zachowuje termostabilność a inaktywuje się w czasie inkubacji w pH alkalicznym (137,138); lepiej rozkłada 4-MUB- α -Fuk (optimum pH 5,5) (138) a nieco gorzej pNP- α -Fuk — (optimum pH 4,5—5) (137,138). Oddzielona frakcja II staje się termolabilną, inaktywuje się po inkubacji w środowisku kwaśnym (pH 5,5) (137,138) a optimum pH jej działania wynosi 5,5 (137) czy też 6,0 — 6,5 (138). Wydaje się, że enzymem lizosomalnym jest jedynie enzym I (138). Badając hydrolizę 4-MUB- α -Fuk przez homogenat wątroby w pH 5,4 oznaczono K_M równe $8,5 \times 10^{-5}$ M (135).

III-6. α -mannozydaza (E.C.3.2.1.24, α -D-mannozydomannohydrolaza)

Enzym ten jest bardzo mało poznany. Z homogenatów tkankowych przy pomocy chromatografii na kolumnie z DEAE-celulozy można rozdzielić trzy aktywności kwaśnej α -mannozydazy A, B i B₂ o optymalnym pH hydrolizy i wzajemnym stosunku charakterystycznym dla danej tkanki (139,140). Formy te prawdopodobnie różnią się zawartością kwasu sjałowego i, być może, konformacją (140). Według niektórych autorów forma A przechodzi w B nie tylko pod wpływem neuraminidazy (140) ale także spontanicznie w czasie przechowywania, przy czym nie tylko maleje pI, ale wzrasta też masa cząsteczkowa (139). Aktywność obu enzymów hamuje EDTA oraz jony Co^{++} a stymulują jony Zn^{++} (139). Termolabilny enzym o optymalnym pH 6,5 (139,140) prawdopodobnie nie jest enzymem lizosomalnym.

III-7. β -glukuronidaza (E.C.3.2.1.31, β -D-glukuronidoglukuronohydrolaza)

β -glukuronidaza występuje zarówno w lizosomach jak i w mikrosomach — w obu przypadkach dość silnie związana jest z błoną organelli. Zawiesina mikrosomów hydrolizuje β -fenolftaleinoglukuronid, co sugeru-

Właściwości β -glukuronidazy

Material (piśmiennictwo)	M. cz. $\times 10^3$	Siła sedymentacji	Opt. pH	K_M $\times 10^{-4}M$	U w a g i	Skład cukrowy
Gruczoł napełtkowy szczura (42)	320 4×79^{1b}	12S	4,5	5,3 ²⁾		5,7% węglowodanów brak NANA
Gruczoł napełtkowy szczura (142)					Po rozdziale na kolumnie z aparaty trzyna frakcje — A, B i C. Wiązanie — polisacharyd — białko odporne na działanie alkaliów (...Glc-Asp...)	A i B: 2,8% Man., 1,94% GlcNac, 0,27% Fuk, 0,16% Gal, 0,17 Glc. C: 0,6% Fuk., 1,1% Gal, 1,5% Glc. % innych cukrów jak A.
Nerki myszy (143)	300 $(4 \times 74)^1$	—	4,7	11,8 ²⁾	Enzym termolabilny	
Wątroba wołu (144a)	280 $(4 \times 75)^{1b}$		4,4 i 4,9	7,1 ²⁾	Mało SH-aminokwasów, dużo Asp i Glu. W niskich stężeniach substratu jeden szeroki szczyt optimum pH, w wysokich — dwa szczyty.	
Wątroba wołu Enzym oczyszczony 10700-krotnie (144b)	290	14S	4,4 (szeroki zakres)	3,3 ²⁾		6,3% węglowodanów: Man:Gal:Glc: GlcNac:NANA w stosunku 45:8:7: 32:5 ślady fukozy

1) W obecności siarczanu dodecyłu

2) substrat: pNP- β -GlcUA3) substrat: fenolfaleino- β -GlcUA

je, że enzym znajduje się po zewnętrznej stronie błony, gdyż substrat ten nie wchodzi do wnętrza kanalików (39). Wniosek ten potwierdzają badania nad solubilizacją enzymu (141). W mikrosomach występuje on w licznych formach o ruchliwości podobnej do mniej elektroujemnych form występujących w lizosomach. Działanie trypsyną, chymotrypsyną lub wyciągiem z lizosomów powoduje przesunięcie w obrazie elektroforogramu, który staje się podobny do obrazu bardziej elektroujemnych enzymów lizosomalnych (39). Być może, że w myśl teorii Goldstone'a i wsp. (10), niektóre z enzymów mikrosomalnych są prekursorami enzymów lizosomalnych. Włączenie do systemu lizosomów odbywałoby się w tym przypadku nie po dołączeniu kwasu sjałowego a raczej po odcięciu jakiegoś peptydu. W lizosomach wątroby szczura stwierdzono metodą elektroogniskowania obecność około 12 pasm aktywności o pI od 5,58 do 6,02, wrażliwych na działanie neuraminidazy (39). Właściwości niektórych preparatów enzymatycznych przedstawia tabela 7.

Przedstawione w tabeli dane ilustrują różnice zarówno międzygatunkowe jak i międzyrodzajowe. Niestety niewiele wiemy o β -glukuronidazie ludzkiej. Elektroforetycznie stwierdza się różnice tkankowe — na przykład w płytkach krwi występują trzy formy, a w łożysku dwie (14). Enzym reaguje z przeciwciałami uzyskanymi przez immunizację enzymem izolowanym z tkanek szczura (14). Brak aktywności β -glukuronidazy w tkankach prowadzi do nadmiernego gromadzenia oraz wydalania z moczem nierozłożonych mukopolisacharydów. Choroba ta znana jest pod nazwą mukopolisacharydozy VI (zob. 3).

III-8. Neuraminidaza (E.C. 3.2.1.18, mukopolisacharydo-N-acetyloneuraminylohydrolaza, sjałidaza)

Na podstawie niezbyt obfitych danych doświadczalnych można przypuszczać, że istnieją co najmniej trzy rodzaje neuraminidazy — rozpuszczalna, związana z błoną plazmatyczną lub synaptyczną oraz lizosomalna — patrz tabela 8. Przyczyną rozbieżności opinii na temat właściwości neuraminidazy lizosomalnej może być obecność lub nieobecność w badanych preparatach enzymu z błon synaptycznych lub plazmatycznych. Według Gielena (153) głównym zadaniem rozpuszczalnej neuraminidazy jest regulacja metabolizmu glikoproteidów rozpuszczalnych przez regulację wydalania ich poza komórkę i wychwytywania przez hepatocyty (26), natomiast enzym wbudowany w błonę synaptyczną czy plazmatyczną, mając bezpośredni kontakt ze współtworzącymi ją glikoproteidami i gangliozydami regulują strukturę a więc i funkcję tych błon. Neuraminidaza lizosomalna degraduje makrocząsteczki, pochodzące ze zniszczonych czy zużytych struktur. Być może, że w prawidłowej komórce do lizosomu docierają gangliozydy częściowo rozłożone przez neuraminidazę synaptosomalną. Sek-

Niektóre właściwości neuraminidazy zwierzęcej

Enzym cytosolowy	Materiał (písmiennictwo)	Opt. pH	Hydrolyzuje substraty:	Stymulatory (+) i inhibitory (-)
Enzym z błon plazmatycznych	Gruczoły mleczne (145)	5,8	sjalolaktoza, siarczan sjalolaktozy, glikopeptydy, słabo gangliozydy, nie hydrolyzuje glikoproteidów.	(+) Triton X-100 (-) Zn^{++} , Hg^{++} , Cu^{++}
	Tkanika mózgowa wątroba (146)	5,8	j. w.	—
	Błony synaptyczne (147)	3,9	sjalolaktoza ($K_M = 20 \times 10^{-4}M$) dwi- i trójisialogangliozydy — ($K_M = 0,8 \times 10^{-4}M$)	—
Enzym z błon plazmatycznych	Błona plazmatyczna wątroby (148a)	—	gangliozydy np. G_{M3}	—
	Błona plazmatyczna limfocytów (148b)	—	sjalolaktoza	—
	Gruczoły mleczne (145)	4,4	sjalolaktoza, siarczan sjalolaktozy, glikoproteidy, słabo gangliozydy	(-) LiCl, NaCl, KCl, (-) Triton X-100
Enzymy lizosomalne	Ściana jelita (149)	5,0	G_{M2} — gangliozydy	(+) Zn^{++} (-) siarczan pCMB
	Limfocyty (148b)	—	Sjalolaktoza	(+) niskie stężenie Tritonu X-100 (-) wysokie stężenie Tritonu X-100
	Frakcja lizosomalna mózgu (150)	4,4	Gangliozydy, np. G_{M2}	—
	Preparat enzymatyczny z tkanki mózgowej (151)	—	Gangliozydy, w których kwas sjalowy stanowi zakończenie łańcucha np. GT, G_{D1a} , G_{M3} . Nie hydrolyzuje G_{M1} , G_{M2} oraz sjalolaktozy ani sjaloproteidów	—
	Preparat enzymatyczny z tkanki mózgowej (152)	4,4	Tylko dwusialogangliozydy (np. K_M hydrolyzy G_{D1b} wynosi $10^{-4}M$) oraz G_{M2}	(-) gangliozydy w stężeniu $\geq 10^{-4}$ (tj. ponad krytyczne stężenie micelarne)
Enzym oczyszczony $3500 \times$ (45b)	—	5,1	G_{D1a} ($K_M = 1,13 \times 10^{-4}M$), G_{D1b} ($K_M = 1,00 \times 10^{-4}M$), G_{D1b} ($K_M = 0,9 \times 10^{-4}$), G_{M2} ($K_M = 0,43 \times 10^{-4}M$) oraz fetuinę. Nie hydrolyzuje sjalolaktozy.	(-) pCMB, Cu^{++} , Fe^{++} , (NH_4) ₂ SO ₄ , (+) detergenty Nie hamują reakcji inhibitory neuraminidazy bakteryjnej np. p-nitrofenylooksamid ani kwas 2-dezoksy 2,3-dehydro-N-acetylonauraminowy

wencja degradacji gangliozydów w mózgu jest niejasna (Ryc. 1). Z jednej strony wydaje się, że tkanka posiada komplet enzymów pozwalający na degradację trójsjalo-gangliozydów według schematu zaproponowanego przez Tallmana i Brady'ego (45 b), tj. że każdy gangliozyd ma dwie możliwości katabolizmu i albo neuraminidaza odszczepia kwas sjałowy albo odpowiednia glikozydaza galaktozę lub heksozoaminę. Z drugiej strony w przypadku wrodzonego braku aktywności β -galaktozydazy lub β -heksozoaminidazy gromadzi się głównie gangliozyd i minimalne ilości asjaloganliozydu. Wydaje się, że przyczyną tego faktu są przeszkody przestrzenne wynikające bądź to z budowy cząsteczki gangliozydu, która utrudnia dostęp enzymu, gdy kwas sjałowy przyłączony jest w środku łańcucha oligosacharydowego bądź też z „mikroarchitektury” lizosomu, utrudniającej kontakt gromadzonego związku z enzymem.

IV. Uwagi końcowe

W poprzednim rozdziale czytelnik znalazł garść informacji o wynikach badań nad solubilizowanymi i izolowanymi glikozydazami lizosomalnymi. Należy specjalnie podkreślić różnicę między sytuacją w próbówce i sytuacją w lizosomie w nienaruszonej komórce. Dotyczy to przede wszystkim swoistości enzymu — że powtórzymy przykład β -heksozoaminidazy B, która *in vitro* hydrolizuje asjalo- G_{M_2} -gangliozyd i G_{M_2} -gangliozyd a usunąć ich z komórki nie jest w stanie. W lizosomie różna jest zarówno konformacja białka enzymatycznego jak i forma substratu. Większość heteropolisacharydów trudno rozpuszcza się w wodzie i łatwo tworzy kompleksy z innymi związkami. W przypadku glikolipidów cząsteczka ma charakter mniej lub więcej hydrofobowy, czego wynikiem jest charakterystyczna kinetyka reakcji. W różnych przypadkach różna jest zależność reakcji od stężenia enzymu, stężenia substratu oraz obecności innych białek, w zależności od tego, czy z enzymem reaguje substrat w formie monomeru czy micelli oraz czy zachodzi równowaga między tymi formami (154). W zdrowej komórce aktywność enzymów lizosomalnych wydaje się być wystarczająca do usunięcia wszelkich zbędnych makrocząsteczek. Inaczej bywa w stanach patologicznych. Medycyna wyróżnia całą grupę tzw. chorób lizosomalnych. Pierwotną ich przyczyną jest błąd w zapisie informacji genetycznej, którego skutkiem jest brak lub zmiana określonej aktywności enzymatycznej. Opisano choroby związane z brakiem lub obniżeniem każdej z omawianych glikozydaz, prócz neuraminidazy, choć ostatnio ukazała się praca, której wyniki sugerują brak aktywności neuraminidazy w fibroblastach chorych na mukopolidozę II (*I-cell disease*) (155). Znane są analogiczne choroby zwierząt. Psy miewają chorobę analogiczną do choroby Krabbego — tj. w tkankach chorych brak aktywności galaktocerebrozydazy (157). Zdarzają się koty sjamskie, w których tkankach brak aktywności β -galaktozydazy

rozkładającej substraty syntetyczne i G_{M1} -gangliozyd (156 a i b). Najbardziej ewidentnym następstwem braku enzymu w lizosomach jest akumulacja nierozłożonego metabolitu — glikolipidu, glikoproteidu, glikozaaminoglikanu — w tkankach a ściśle mówiąc w cytoplazmie komórek. Stąd dawna nazwa choroby spichrzeniowe. O rozmiarach akumulacji świadczy na przykład fakt, że u chorych, w komórkach których brak jest aktywności β -glukozydazy, nierozłożone metabolity powodują, że w wieku kilkunastu lat śledziona ważyć może ponad 2 kg — zamiast kilkuset gramów (120). Nie rozkładaony związek czy związki gromadzą się w lizosomach — często w postaci agregatów z innymi substancjami. Powoduje to pęcznienie, proliferację, wreszcie pęknięcie lizosomów, wylewanie się enzymów do cytoplazmy, zachwianie równowagi metabolicznej. Zmiany te mają zawsze charakter postępujący.

W przypadku braku β -heksozoaminidazy A w cytoplazmie kory mózgowej powstają tzw. „błonowe ciała cytoplazmatyczne” (MCB), pochodzenia lizosomalnego, metodami histochemicznymi stwierdzono w nich bowiem obecność kwaśnej fosfatazy (158 a). Podobne twory znajduje się w przypadku braku β -galaktozydazy (158 b, c). W obu przypadkach zbudowane są one z gangliozydu G_{M1} lub G_{M2} , który stanowi 1/3 ich suchej masy, a także z cholesterolu, fosfolipidów — głównie lecytyny —, niewielkich ilości glikolipidów obojętnych — w tym głównie glukozyloceramidu — oraz białka stanowiącego około 11% suchej masy (158 b). Powstawanie analogicznych tworów w cytoplazmie hodowanych *in vitro* fibroblastów pochodzących od chorych można sprowokować przez podanie zewnątrz komórkowo odpowiedniego gangliozydu (109). Prawdopodobnie są to „zablokowane” lizosomy. W przypadku braku β -glukozydazy — w śledzionie chorych obserwuje się szereg gęsto upakowanych, skręconych tworów złożonych z dwu warstw (*ang. bilayers*) o grubości 6 nm. Lipidy — glukozyloceramid, fosfolipidy i wolny cholesterol w stosunku molowym 12:8:2 — stanowią 88% tych struktur, reszta to glikoproteid o masie cząstkowej 95 000 oraz peptyd o masie cząsteczkowej 26-38 000. Glikoproteid jest prawdopodobnie umiejscowiony wewnątrz tych tworów, bowiem są one odporne na działanie pronazy (159). Powstawanie tych tworów jest przykładem „błonetwórczych” właściwości glikolipidów. W wyższych stężeniach agregują one z innymi substancjami, tworząc struktury błonowe, w których inne składniki są niedostępne dla właściwych enzymów lizosomalnych. Być może następuje też reagregacja fragmentów błon. W przypadkach braku β -galaktozydazy stwierdza się nieprawidłowości w składzie estrów cholesterolu. Estry te zawierają nienasycone kwasy tłuszczowe a więc kwasy występujące zazwyczaj w pozycji β -lecytyny. Tłumaczyć to można aktywacją fosfolipazy A lub też transacylacją (160). W przypadkach braku heksozoaminidazy A stwierdza się różnice w składzie wolnych aminokwasów w tkance mózgowej między innymi spadek ilości hydroksyproliny, glutaminy, glicyny, alaniny a wzrost ilości asparaginy, kwasu asparaginowego (161). Te

dwa przykłady ilustrują — jak odległe bywają wtórne skutki omawianych schorzeń od ich przyczyn. Nieprawidłowości katabolizmu gangliozydów wywołują zmiany degeneracyjne najpierw w korze mózgowej, a później również w istocie białej, powodując rozpad początkowo prawidłowo utworzonej mieliny.

Tak więc wszelkie nieprawidłowości w działaniu enzymów lizosomalnych zaburzają prawidłowe działanie organizmu a obserwacja stanów patologicznych zwraca uwagę na ogromną i doniosłą pracę wykonywaną przez te organelle w zdrowej komórce.

Spostrzeżenia te pobudzają do nowych badań. Wciąż jeszcze wiemy niewiele o szeregu nie omawianych w artykule enzymach: α -heksozoamini-dazie i α -iduronidazie — głównych czynnikach katabolizmu glikoamino-glikanów oraz β -ksylozydazie, α -arabinidazie β -fukozydazie itp. Nieznana jest „mikroarchitektura” lizosomu i rozmieszczenie w nim enzymów, nieznaną sposob kontakt makrocząsteczki z kompletem odpowiednich enzy-mów, mechanizm reakcji, czynniki *in vivo* modyfikujące swoistość. Nie znamy też dokładnie mechanizmów rządzących powstawaniem lizosomu i umiejscowieniem w nim poszczególnych enzymów. Wszystkie te zagad-nienia są przedmiotem intensywnych badań.

Artykuł nadszedł 3.11.1976; po rewizji autorskiej otrzymano 22.12.1976.

PIŚMIENICTWO

1. DeDuve C. D., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appel-mans F., (1955) *Biochem. J.*, **60**, 604—617
2. DeDuve C. D., Wattiaux R., (1966), *Ann. Rev. Physiol.*, **28**, 435—492.
3. Van Hoof F., Hers H. G., (1968) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 34—44.
- 4a. Brady R. O., (1972) *Biochimie*, **54**, 723—733.
- 4b. Desnick R. J., Thorpe S. R., Fiddler M. B., (1976) *Physiol. Rev.*, **56**, 57—100.
- 4c. Hers H. G., (1973), w *Lysosomes and Storage Diseases*, red. Hers H. G., Van Hoof F., str. 148—171, Academic Press, New York.
- 4d. O'Brien J. S., Okada S. O., Ho M. W., Fillerup D. L., Veath M. L., Adams K., (1971), *Fed. Proc.*, **30**, 956—969.
5. Czartoryska B., (1971) *Post. Biochem.*, **17**, 3—25.
6. Tomaszewski J., (1974) *Post. Biochem.*, **20**, 446—469.
- 7a. Novikoff A. F., Essner E., Quintana N., (1964) *Fed. Proc.*, **23**, 1010—1022.
- 7b. Hirsch J. G., Cohn Z. A., (1964) *Fed. Proc.*, **23**, 1023—1025.
- 7c. Novikoff A. F., (1973), w *Lysosomes and Storage Diseases*, red. Hers H. G., Van Hoof F., str. 2—42, Academic Press, New York.
- 7d. Vaes G., (1973), w *Lysosomes and Storage Diseases*, red. Hers H. G., Van Hoof F., str. 43—78, Academic Press, New York.
8. Koćmierska - Grodzka D., (1975) *Post. Hig. i Med. Dośw.*, **29**, 719—737.
9. Lawford G. R., Schachter H., (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5408—5418.
10. Goldstone A. D., Koenig H., (1973) *Biochem. J.*, **132**, 267—282.
- 11a. Bratscher M. S., (1973) *Science*, **181**, 622—629.
- 11b. Bratscher M. S., Raff M. C., (1975) *Nature*, **258**, 43—49.

12. Needleman S. B., Koenig H., Goldstone A. D., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 57—73.
- 13a. Fratantoni J. C., Hall C. W., Neufeld E. F., (1969) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 360—366.
- 13b. Neufeld E. F., Cantz M. J., (1971) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **179**, 580—587.
14. Brot F. E., Glaser J. H., Roozen K. J., Sly W. S., Stahl P. D., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1—8.
15. Figura Von K., Lögering M., Kresse H., (1975) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **13**, 285—289.
16. Winterburn P. J., (1972) *Biochem. J.*, **128**, 118—119P.
- 17a. Hickman S., Shapiro L. J., Neufeld E. F., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 55—61.
- 17b. Kresse H., Figura Von K., (1974) w *Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases*, red. Tager, J. M. Hooghwinkel G. J. M., Daems W. Th., str. 173—174, North Holland Publ. Comp., Amsterdam.
18. Reuser A., Halley D., de Witt E., Hoogeveen A., Van der Kamp I., Mulder M., Galjaard H., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 311—319.
19. Ellis B. G., Tucker S. M., Thompson A. E., Price R. G., (1975) *Clin. Chim. Acta*, **64**, 195—202.
20. O'Brien J. S., Okada S., Chen A., Fillerup D. L., (1970) *New Engl. J. Med.*, **283**, 15—20.
21. Geokas M. C., Rinderknecht H., (1973) *Clin. Chim. Acta*, **46**, 27—32.
22. Vladutiu G. D., Rattazzi M. C., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 956—965.
23. Turner B. M., Beratis N. G., Turner V. S., Hirschhorn K., (1974), *Clin. Chim. Acta*, **57**, 29—35.
24. Hultberg B., Öckerman P. A., Nordén N. E., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **52**, 239—243.
25. Swallow D. M., Stokes D. C., Corney C., Harris H., (1974) *Ann. Hum. Gen. Lond.*, **37**, 287—302.
26. Morell A. G., Gregoliadis G., Scheinberg I. H., Hickman J., Aschwell G., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1461—1467.
27. Weisman U. N., Lighbody J., Vasella F., Herschkowitz N. N., (1971) *New Engl. J. Med.*, **284**, 109—110.
28. Hickman S., Neufeld E. F., (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 992—999.
29. Hennig R., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 307—316.
30. Hennig R., Stoffel W., (1973) *Hoppe Seyler's Z., Physiol. Chem.*, **354**, 760—770.
31. Hennig R., Plattner H., Stoffel W., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **330**, 61—75.
32. Gatt S., (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 192—195.
33. Dawson G., Stoelmler A. C., Radin N. S., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4638—4646.
- 34a. Gatt S., (1970) *Chem. Phys. Lipids*, **5**, 235—249.
- 34b. Barrett A. J., (1973) w *Lysosomes in Biology and Pathology*, red. Dingle J. T., Fell H. B., t. II, str. 245—312. North Holland Publ. Comp., Amsterdam, Londyn.
35. Needleman S. B., Koenig H., (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 43—56.
36. Bannerjee D. K., Basu D., (1975) *Biochem. J.*, **145**, 113—118.
37. Bishayee S., Bachhavat B. K., (1974) *Neurobiol.*, **4**, 48—56.

38. Norden A., O'Brien J. S., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 193—198.
39. Owens J. W., Gammon K. L., Stahl P. D., (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 258—272.
40. Tallman J. F., Brady R. O., Quirk J. M., Villalba M., Gal A. E., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 3489—3499.
- 41a. Srivastava S. K., Beutler E., (1973) *Nature*, **241**, 463.
- 41b. Srivastava S. K., Beutler E., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2054—2057.
42. Himeno M., Ohhara H., Arakawa Y., Kato K., (1975) *J. Biochem.*, (Tokyo), **77**, 427—438.
43. Carmody P. J., Rattazzi M. C., (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 117—125.
44. Ho M. W., Seck J., Schmidt D., Veath M. L., Johnson W., Brady R. O., O'Brien J. S., (1972) *Am. J. Hum. Gen.*, **24**, 37—45.
- 45a. Jungalwala F. B., Robins E., (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 4258—4266.
- 45b. Tallman J. F., Brady R. O., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 434—443.
46. Li S. C., Li Y. T., (1974) *Fed. Proc.*, **33**, 1299.
47. Beutler E., Kuhl W., Commings D., (1975) *Am. J. Hum. Gen.*, **27**, 628—638.
48. Beutler E., Kuhl W., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 7195—7200.
49. Werries E., Neue J., Buddeche E., (1975) *Hoppe Seyler's Physiol. Z.*, **356**, 953—960.
- 50a. Carter T. P., Kanfer J. N., (1975) *Fed. Proc.*, **34**, 645.
- 50b. Carter T. P., Kanfer J. N., (1976) *J. Neurochem.*, **27**, 53—62.
- 51a. Kanfer J. N., Raghawan S. S., Mumford R. A., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 129—140.
- 51b. Mumford R. A., Raghawan S. S., Kanfer J. N., (1976) *J. Neurochem.*, **27**, 943—948.
- 52a. Munthe-Kaas A. C., Berg T., Seljelich R., (1976) *Exp. Cell Res.*, **99**, 146—155.
- 52b. Scharfman A., Houdret N., Rousell P., Biserte G., Aerts C., Tonnel A. B., Voisin C., (1975) *Clin. Chim. Acta*, **63**, 369—376.
- 53a. Svennerholm L., Håkansson G., Vanier M. T., (1975) *Acta Paed. Scand.*, **64**, 649—656.
- 53b. Hindman J., Cotlier E., (1972) *Clin. Chem.*, **18**, 971—975.
- 53c. Butterworth J., Sutherland G. R., Broodhead D. M., Bain A. D., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **53**, 239—246.
- 53d. Zielke K., Veath M. L., O'Brien J. S., (1972) *J. Exp. Med.*, **136**, 197—199.
54. Bowen D. M., Radin N. S., (1969) *J. Neurochem.*, **16**, 501—511.
55. Harzer K., Sandhoff K., (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 2041—2050.
56. Heukels-Dully M. J., Niermeijer M. F., (1975) *Exp. Cell Res.*, **97**, 304—312.
57. Okada S., Veath M. L., Leroy J., O'Brien J. S., (1971) *Am. J. Hum. Gen.*, **23**, 55—61.
58. Young E., Willcox P., Whitfield A. E., Patrick A. D., (1975) *J. Med. Gen.*, **12**, 224—229.
59. Berg T., Melbye B., Johnsen S. R., Prydz H., (1975) *Exp. Cell Res.*, **94**, 106—110.
60. Sutherland G. R., Butlerworth J., Broadhead D. M., Bain A. D., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **52**, 211—217.
61. Mian N., Harries D. G., Cowen D. M., Batte E. A., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 179—188.

- 62a. Robinson D., Price R. G., Dance N., (1967) *Biochem. J.* **102**, 525—532.
- 62b. Dance N., Price R. G., Robinson D., (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 662—664.
63. Nguyen Van-Cong, Weil D. W., Rebourect R., Frézal J., Richard-Mollard A. M., (1975) *Ann. Hum. Gen. Lond.*, **39**, 111—123.
64. Young E. P., Ellis R. B., Lake B. D., Patrick A. D., (1970) *FEBS Letters*, **9**, 1—7.
65. Poeneru L., Dreyfus J. C., (1973) *Clin. Chim. Acta*, **43**, 439—442.
66. Lie K. K., Thomas G. H., Taylor H. A., Sensenbrenner J. A., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **45**, 243—248.
67. Friedland J., Schach L., Saifer A., Pourfor M., Volk B. V., (1970) *Clin. Chim. Acta*, **28**, 397—402.
68. Yanase K., Kritchevsky D., (1973) *Clin. Chim. Acta*, **46**, 455—464.
69. Ellis R. B., Ikonne J. U., Masson P. K., (1975) *Anal. Biochem.*, **63**, 5—11.
70. Robinson D., Jordan T. W., Horburgh T., (1972) *J. Neurochem.*, **18**, 1975—1985.
71. Kanfer J. N., Spielvogel C., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 203—207.
72. Geiger B., Yoseph Y. B., Arnon R., (1975) *FEBS Letters*, **45**, 276—281.
73. Ikonne J. U., Ellis R. B., (1973) *Biochem. J.*, **135**, 457—462.
- 74a. Sandhoff K., (1969) *FEBS Letters*, **4**, 351—354.
- 74b. Ikonne J. U., Rattazzi M. C., Desnick R. J., (1975) *Am. J. Hum. Gen.*, **27**, 639—650.
75. Sandhoff K., (1970) *FEBS Letters*, **11**, 342—344.
76. Srivastava S. K., Yoshida A., Awasthi Y. C., Beutler E., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2049—2053.
77. Pokorny M., Glaudemans P. J., (1975) *FEBS Letters*, **50**, 66—69.
78. Saifer A., Rosenthal A. L., (1973) *Clin. Chim. Acta*, **43**, 417—421.
79. Rosenberg D., Cutler R., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **53**, 247—253.
80. Murphy J. V., Craig L., (1972) *Clin. Chim. Acta*, **42**, 267—272.
81. O'Brien J. S., Okada S., Fillerup D. C., Veath M. L., Adornato B., Brenner P. H., Leroy J. G., (1971) *Science*, **172**, 61—64.
82. Bartholomew W. R., Rattazzi M. C., (1974) *Int. Arch. Allergy*, **46**, 512—524.
83. Verpoorte J. A., (1974) *Biochemistry*, **13**, 793—799.
84. Sandhoff K., Harzel K., Wässle W., Jatzkewitz H., (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 2469—2489.
85. Carroll M., Robinson D., (1973) *Biochem. J.*, **131**, 91—96.
86. Murphy J. V., Craig L., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **51**, 67—73.
87. Beutler E., Kuhl W., (1975) *Nature*, **258**, 262—264.
88. Robinson D., Carroll M., (1972) *Lancet*, **1**, 322—323.
89. Robinson D., Carroll M., Stirling J. L., (1974) *Nature*, **243**, 415—416.
90. Penton E., Poenaru L., Dreyfus J. C., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 162—169.
91. Seyema Y., Yamakawa T., (1974) *J. Biochem.*, (Tokyo), **75**, 495—507.
92. Ho M. W., O'Brien J. S., (1971) *Clin. Chim. Acta*, **32**, 443—450.
93. Singer H. S., Schafer J. A., (1972) *Am. J. Hum. Gen.*, **24**, 454—463.
94. Norden A. G. W., O'Brien J. S., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 383—392.
95. Yutaka T., Okada S., Mimaki K., Sugita T., Yabuuchi H., (1975) *Clin. Chim. Acta*, **59**, 283—290.
96. Kanfer J. N., Spielvogel C., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **289**, 359—366.

97. Miesler M., Rattazzi M. C., (1974) *Am. J. Hum. Gen.*, **26**, 683—691.
98. Ho M. W., Fluharty A., (1975) *Nature*, **253**, 660.
99. Suzuki Y., Suzuki K., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2098—2104.
100. Callahan J. W., Gerrie J., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 141—153.
101. Pinsky L., Powell E., Callahan J., (1970) *Nature*, **228**, 1093—1095.
102. Norden A. G. W., Tennant L. L., O'Brien J. S., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 7969—7976.
103. Tsay S. C., Dawson G., Yu-Teh-Li, (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **385**, 305—311.
104. Ng Ying Kin N. M. K., Volfe L. S., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 123—130.
105. Dawson G., (1972) *J. Lip. Res.*, **13**, 207—219.
106. Suzuki Y., Suzuki K., (1971) *Science*, **171**, 73—75.
107. Wenger D. A., Sattler M., Clark C., Mc Kelvey H., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **56**, 199—207.
108. Liu H. M., (1970) *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **29**, 241—262.
109. Stern J., Novikoff A. B., Terry R. D., (1972) w *Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders*, red. Volk B. W., Aronson S. M., str. 651—660, Plenum Press N.Y.
110. Berra B., Brunngraber E. G., Aguilar V., Aro A., Zambotti, 1973 *Clin. Chim. Acta*, **47**, 325—328.
111. Suzuki K., Suzuki Y., (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 302—309.
112. Vannier M. T., Svennerholm L., (1975) *Acta Paed. Scand.*, **64**, 641—648.
113. Beutler E., Kuhl W., (1970) *Lancet*, **1**, 612—613.
114. Beutler E., Kuhl W., Trynidad F., Teplitz R., Nadler H., (1971) *Am. J. Hum. Gen.*, **23**, 62—66.
115. Blaenboer A. J., Hoogwinkel G. J. M., (1974) *Neurobiology*, **4**, 43—47.
116. Kanfer J. N., Raghavan S. S., Mumford R. A., Labow R. S., Williamson D. G., Layne D. S., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 683—688.
117. Mellor J. D., Layne D. S., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4377—4380.
118. Raghavan S. S., Mumford R. A., Kanfer N. J., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 256—263.
119. Friedman R. B., Kanfer J. N., (1974) *Biochem. Med.*, **9**, 327—333.
120. Kanfer J. N., Stein M., Spielvogel C., (1972) w *Sphingolipids, Sphingolipidoses and Allied Disorders*, red. Volk B. W., Aronson S. M., str. 225—236, Plenum Press, New York.
- 121a. Pentchev P. G., Brady R. O., Hibbert S. R., Gal A. E., Shapiro D., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 5256—5261.
- 121b. Dale G. L., Villacorte D. G., Beutler E., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 1048—1054.
- 122a. Ho M. W., O'Brien J. S., Radin N. S., Erickson J. S., (1973) *Biochem. J.*, **131**, 173—176.
- 122b. Ho M. W., (1974) w *Enzyme Therapy in Lysosomal Storage Diseases*, ed. Tager J. M., Hoogwinkel G. J. M., Daems W. T., str. 239—246, North. Holland Publ. Comp. Amsterdam, Oxford.
123. Raghavan S. S., Mumford R. A., Kanfer J. N., (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 99—106.
124. Beutler E., Kuhl W., (1972) *Nature New Biology*, **239**, 207—208.
125. Beutler E., Kuhl W., (1972) *Am. J. Hum. Gen.*, **24**, 237—249.
126. Beutler E., Guinto E., Kuhl W., (1973) *Am. J. Hum. Gen.*, **25**, 42—46.
127. Ho M. W., Beutler S., Tennant L., O'Brien J. S., (1972) *Am. J. Hum. Gen.*, **24**, 256—266.

128. Ho M. W., (1973) *Biochem. J.*, **133**, 1—10.
- 129a. Rietra P. J. G. M., Van Den Bergh F. A. J. T. M., Tager J. M., (1975) *Clin. Chim. Acta*, **62**, 401—413.
- 129b. Romeo G., Childs B., Migeon B. R., (1972) *FEBS Letters*, **27**, 161—166.
130. Kint J. A., (1971) *Arch. Int. Physiol. Bioch.*, **79**, 633—641.
131. Romeo G., Di Matteo G., d'Urso M., Su-Chen-Li, Yu-Tech-Li, (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 349—360.
132. Brady R. O., Uhlendorf B. W., Jacobson C. B., (1971) *Science*, **172**, 174—175.
- 133a. Van Hoof F., Hers H. G., (1968) *Lancet*, **1**, 1198.
- 133b. Durand P., Boronne C., Della Cella G., Philippot M., (1968) *Lancet*, **1**, 1198.
134. Carlsen R. B., Pierce J. G., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 23—32.
135. Alhadeff J. A., Miller A. L., Wenger D. A., O'Brien J. S., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **57**, 307—313.
136. Turner B. M., Turner V. S., Beratis N. G., Hirschorn K., (1975) *Am. J. Hum. Gen.*, **27**, 651—661.
137. Wiederschain S. Y., Kolibata L. G., Rosenfield E. L., (1973) *Clin. Chim. Acta*, **46**, 305—310.
138. Robinson D., Thorpe R., (1975) *Clin. Chim. Acta*, **55**, 65—69.
139. Phillips N. C., Robinson D., Winchester B. G., (1974) *Clin. Chim. Acta*, **55**, 11—19.
140. Chester M. A., Lunblad A., Masson P. K., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 341—348.
141. Mameli L., Gianetto R., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 316—320.
142. Keller R. K., Touster O., (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4770—4776.
143. Lin C. W., Orcutt M. L., Fishman W. H., (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4737—4743.
- 144a. Stahl P. D., Touster O., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 5398—5406.
- 144b. Himeno M., Hashiguchi Y., Kato K., (1974) *J. Biochem. (Tokyo)* **76**, 1243—1252.
145. Tulsiani D. R. P., Carubelli R., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 139—153.
146. Carubelli R., Tulsiani D. R. P., (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 78—87.
147. Schengrund C. L., Rosenberg A., (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6196—6200.
- 148a. Schengrund C. L., Jensen D. S., Rosenberg A., (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 2742—2746.
- 148b. Carubelli R., Yen A. K., (1974) *Behr. Inst. Mitt.*, **55**, 80—96.
149. Kolodny E. H., Kanfer J. N., Quirk J. M., Brady R. O., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1426—1431.
150. Tallman J. S., Johnson W. G., Brady R. O., (1972) *J. Clin. Inv.*, **52**, 2339—2345.
151. Gatt S., Leibovitz Z., (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 136—143.
152. Ohman R., Rosenberg A., Svennerholm L., (1970) *Biochemistry*, **9**, 3774—3782.
153. Gielsen W., (1974) *Behring Inst. Mitt.*, **55**, 85—88.
154. Gatt S., Barenholz Y., Borkowski-Kubiler I., Leibovitz-Ben Gershon Z., (1972) w *Sphingolipids, Shingolipidosis and Allied Disorders* red. Volk B. W., Aronson S. M., str. 237—257, Plenum Press, New York.

155. Thomas G. H., Tiller G. E. Jr., Reynolds L. W., Miller C. S., Bace J. W., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 188—196.
- 156a. Handa S., Yamakawa T., (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1275—1281.
- 156b. Backer H. J. Jr., McKhan G. M., Farrell D. F., (1971) *Science*, **174**, 838.
157. Suzuki Y., Miyatake T., Fletcher T. F., Suzuki K., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2109—2112.
- 158a. Wallace B. J., Volk B. W., Lazarus S. S., (1964) *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **23**, 676—691.
- 158b. Suzuki K., Suzuki Y., Kamoshita S., (1969) *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **28**, 25—73.
- 158c. Mossakowski M. J., Zelman I. B., Majdecki T., (1971) *Neuropat. Pol.*, **9**, 201—209.
159. Glew R. H., Lee R. E., (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 626—639.
160. Eto Y., Suzuki K., (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1007—1016.
161. Zarry E. A., Saifer A., Schneck L., Volk B. W., (1971) *J. Neurochem.*, **18**, 1369—1370.

BARBARA SUSZKA*), JÓZEF CHMIEL**)

Wyodrębnianie i oznaczanie glikozoaminoglikanów tkanki łącznej

Isolation and Determination of Connective Tissue Glycosaminoglycans

Spis treści

- I. Wyodrębnianie glikozoaminoglikanów
 - I-1. Przygotowanie tkanki
 - I-2. Uwalnianie glikozoaminoglikanów z kompleksów białkowych
 - I-3. Wytrącanie glikozoaminoglikanów z wyciągów tkankowych
- II. Metody rozdzielania glikozoaminoglikanów
 - II-1. Chromatografia kolumnowa
 - II-2. Chromatografia cienkowarstwowa
 - II-3. Rozdzielanie kompleksów cetylopirydyniowych glikozoaminoglikanów
 - II-4. Metody elektroforetyczne
- III. Oznaczanie poszczególnych glikozoaminoglikanów w mieszaninie.

Contents

- I. Isolation of glycosaminoglycans
 - I-1. Tissue preparation
 - I-2. Release of glycosaminoglycans from protein complexes
 - I-3. Precipitation of glycosaminoglycans from tissue extracts
- II. Methods of glycosaminoglycans separation
 - II-1. Column chromatography
 - II-2. Thin-layer chromatography
 - II-3. Separation of cetylpyridinium complexes of glycosaminoglycans
 - II-4. Electrophoretic methods
- III. Determination of individual glycosaminoglycans in the mixture

*) Dr, **) Prof. dr hab., Zakład Biochemii, Instytut Chemii i Analityki, Akademia Medyczna, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: Ch-4-S — chondroityno-4-siarczan; Ch-6-S — chondroityno-6-siarczan; DS — dermatanu siarczan; Δ Di-OS — 4,5- β -_D-glukurozo-1,3-diazotio-2-dezoksy-_D-galaktoza, Δ Di-4S — 4,5- β -_D-glukurozo-1,3-diazotio-2-acetyloamino-2-dezoksy-4-sulfo-_D-galaktoza; Δ Di-6S — 4,5-_D-glukurozo-1,3-diazotio-2-acetyloamino-2-dezoksy-6-sulfo-_D-galaktoza.

Budowa chemiczna związków zaliczanych do grupy glikozoaminoglikanów oraz ich kompleksów białkowych, a także rola biologiczna i metabolizm zostały omówione niedawno na łamach *Postępu Biochemii* (1). W niniejszej pracy opisane będą metody wyodrębniania glikozoaminoglikanów z tkanek, ich rozdzielania i ilościowego oznaczania.

I. Wyodrębnianie glikozoaminoglikanów.

I-1. Przygotowanie tkanki.

Pierwszym etapem wyodrębniania glikozoaminoglikanów z tkanek jest dokładne rozdrobnienie badanego materiału przy użyciu homogenizatorów nożykowych lub tłoczkowych, przy równoczesnym chłodzeniu.

Następnie tkankę poddaje się odtłuszczeniu mieszaniną alkoholu lub acetonu z eterem albo chloroformu z metanolem, ponieważ lipidy utrudniają penetrację kwasów i wodnych roztworów do tkanki. Tkanki bogate w wapń (kości i chrząstki) powinny być odwapnione wersenianem w pH wyższym od 8 w temperaturze 37°C.

1-2. Uwalnianie glikozoaminoglikanów z kompleksów białkowych.

Glikozoaminoglikany tkanki łącznej występują przeważnie w formie kowalencyjnych połączeń z białkami, dlatego kolejnym etapem wyodrębniania jest uwolnienie ich od komponenty białkowej.

Najlepszą jak dotąd i najczęściej stosowaną metodą jest hydroliza składnika białkowego przy użyciu enzymów proteolitycznych. Szczególnie odpowiednie do tego celu są proteazy roślinne: papaina, bromelina i ficyna. Trawienie papainą przeprowadza się w pH bliskim obojętnego (pH 6,0 — 7,5). Odporność enzymu na stosunkowo wysoką temperaturę 65 — 70°C pozwala na prowadzenie proteolizy w warunkach uniemożliwiających rozwój bakterii. Dla uzyskania pełnej aktywności, papainę należy aktywować czynnikami redukującymi (cysteiną, 2,3-dwumerkaptopropanolem) lub cyjankiem potasu (2) w obecności EDTA (3,4,5). Odpowiednie stężenie EDTA, z uwagi na jego zdolność kompleksowania jonów wapniowych, jest szczególnie ważne. Ekstrahowanie glikozoaminoglikanów z tkanek bogatych w wapń wymaga stosowania wyższych stężeń EDTA podczas proteolizy (6). EDTA kompleksuje również jony metali ciężkich, których śladowe ilości katalizują reakcję utleniania cysteiny zmniejszając jej aktywujące działanie na enzym. Zbyt wysokie jednak stężenie EDTA zmienia właściwości glikozoaminoglikanów szczególnie hialuronianu, wpływając na schemat elucji w toku późniejszego ich frakcjonowania (6). Pronaza B działa podobnie jak papaina, nie wymaga jednak uprzedniej aktywacji.

Czas prowadzenia proteolizy zależy od rodzaju badanej tkanki

i wynosi zwykle od kilku do kilkunastu godzin. Ilość uwolnionych glikoaminoglikanów z aorty królika po 4-godzinnym trawieniu nie różniła się od ilości uzyskanej po 12 godzinach trawienia tkanki (6). Całkowity zaś rozpad tkanki skórnej trawionej papainą następował po 6 godzinach (7). Chrzątka z kolei wymaga znacznie dłuższej proteolizy sięgającej nawet 24 godzin (8). Po enzymatycznej hydrolizie ewentualnie niestrawioną pozostałość usuwa się przez wirowanie.

1-3. Wytrącanie glikoaminoglikanów z wyciągów tkankowych.

Jednym z najprostszych sposobów wydzielania glikoaminoglikanów z wyciągów tkankowych jest ich wytrącenie dwu- lub trzykrotną objętością etanolu w obecności chlorku sodowego lub wapniowego, a najlepiej octanu sodowego (9), ze względu na dobrą rozpuszczalność tej soli w alkoholu. Jeśli równocześnie z polisacharydami wytrącają się sole nieorganiczne, można je usunąć przez rozpuszczenie osadu w wodzie i ponowne wytrącenie alkoholem. Stosowanie etanolu do wytrącania glikoaminoglikanów z wyciągów tkankowych stwarza niebezpieczeństwo równoczesnego wytrącenia białka. Można tego uniknąć usuwając białko, np. kwasem trójchlorooctowym przed wytrąceniem glikoaminoglikanów.

W 1955 roku Scott (10) zastosował po raz pierwszy do wytrącenia polianionów długołańcuchowe alifatyczne sole amoniowe. Glikoaminoglikany tworzą ze związkami takimi jak bromek cetylotrójmetyloamoniowy, chlorek cetylopirydyniowy lub bromek cetylopirydyniowy, czwartorzędowe kompleksy amoniowe, trudno rozpuszczalne w roztworach wodnych o niskiej sile jonowej. Siarczan keratanu nie wytrąca się z roztworów o pH bliskim 7, można go jednak wytrącić w obecności boranu przy pH 9,5 (9).

Wytrącanie glikoaminoglikanów przy użyciu długołańcuchowych soli amoniowych stosowano zarówno w pracach na skalę makro jak i mikro, w badaniach składu krążków międzykręgowych (11,12) chrząstki (11,13) i ściany aorty (6,14).

W przypadku stosowania soli amoniowych do wytrącania glikoaminoglikanów z hydrolizatu tkankowego pominąć można etap odbiałczania. Punkt izoelektryczny większości białek jest znacznie wyższy od pH warunkującego jonizację anionowych grup glikoaminoglikanów. Dodawanie zatem soli amoniowej do roztworu powoduje wytrącanie glikoaminoglikanów, podczas gdy białka oraz produkty trawienia pozostają w roztworze.

1-4. Otrzymywanie rozpuszczalnych soli glikoaminoglikanów.

Czwartorzędowe kompleksy amoniowe glikoaminoglikanów oddzielone od produktów proteolizy, można zamienić w rozpuszczalne w wodzie sole potasowców lub wapniowców. Metody otrzymywania soli glikoami-

noglikanów można podzielić na dwie zasadnicze grupy. Pierwsze z nich opierają się na rozpuszczalności kompleksów amoniowych glikozoaminoglikanów w stężonych wodnych roztworach soli nieorganicznych. „Zdolność rozpuszczająca” roztworów soli nieorganicznych zależy głównie od rodzaju kationu, a w mniejszym stopniu również od anionu i układu się w szereg $K^+ > Na^+ > Li^+ > Ca^{++} > Mg^{++}$. Kompleksy rozpuszczają się łatwiej w podwyższonej temperaturze (35—40°C) w obecności niewielkiej ilości etanolu. Dodanie do roztworu 2—3-krotnej objętości etanolu powoduje wytrącenie soli glikozoaminoglikanów z nieorganicznym kationem, gdyż w tych warunkach ta właśnie kombinacja jonów charakteryzuje się najmniejszym iloczynem rozpuszczalności.

Oddzielenie glikozoaminoglikanów od soli amoniowej można osiągnąć również przez usunięcie tej ostatniej z roztworu. W stężonych roztworach soli nieorganicznych rozpuszczalność soli amoniowych (np. chlorku cetylopirydyniowego i bromku cetylotrójmetyloamoniowego) poniżej tzw. „temperatury krytycznej rozpuszczalności” jest bardzo mała. Ochłodzenie roztworu do temperatury około +4°C powoduje prawie całkowite wytrącenie soli amoniowej. Pewne adsorbenty wykazują silne powinowactwa do soli amoniowych, można je przeto stosować do usuwania tych soli z roztworu. Szczególnie nadają się do tego celu ziemia Fullera (odczynnik Lloyda) i węgiel aktywowany. Zamiast adsorbentów użyć można żywic jonowymiennych silnie zasadowych typu Dowex 1 lub Amberlit IRA-400. Najbardziej celowe jest połączenie obu metod: wstępnego wytrącania przez ochłodzenie, po którym następuje usunięcie ostatnich śladów soli amoniowej drogą adsorpcji.

Drugi ze sposobów otrzymania rozpuszczalnych w wodzie soli glikozoaminoglikanów polega na rozpuszczeniu kompleksu amoniowego w etanolu (15). Dodanie stężonego etanolowego lub wodnego roztworu soli nieorganicznej powoduje wytrącanie soli glikozoaminoglikanów z nieorganicznym kationem.

Pewną odmianą tej metody jest bezpośrednio potraktowanie osadu kompleksu glikozoaminoglikanów alkoholowym roztworem soli. Zachodzi tu swego rodzaju „wymiana jonowa” między osadem a jonami w roztworze, w wyniku której jony amoniowe kompleksu zastąpione zostają jonami metalu. Ponieważ wymiana jonów przebiega na granicy dwóch faz, stałej i ciekłej, proces należy prowadzić co najmniej przez 30 minut, przy równoczesnym mieszaniu, a następnie powtórzyć go dwu- lub trzykrotnie ze świeżą porcją roztworu.

II. Metody rozdzielania glikoaminoglikanów.

II-1. Chromatografia kolumnowa.

Metody chromatograficzne to głównie metody kolumnowe z użyciem wymiennicy jonowych. Chromatografia jonowymienna została po raz pierwszy zastosowana do rozdzielania glikoaminoglikanów przez Davidsona i Meyera (16). Polisacharydy adsorbowano na kolumnie zawierającej Dowex 1×1 i eluowano roztworami kwasu solnego. Rozdzielano również glikoaminoglikany ze skóry szczura na amionicie Dowex 1×2 w skokowym gradiencie NaCl (17), nie uzyskując dobrych rezultatów, chociaż wzorcową mieszaninę czystych glikoaminoglikanów udało się zadowalająco rozdzielić. Ponadto Dowex 1 powodował częściową destrukcję heparyny, połączonej z utratą jej aktywności biologicznej. Używano również podobnego typu żywicy Deacidite FF-X8 (18,19). Ringertz i Reichard (20) zastosowali celulozę ECTEOA do rozdzielania kwasu hialuronowego, chondroityno-4-siarczanu i heparyny eluując je roztworami 0,1 N kwasu solnego o skokowo wzrastającej zawartości NaCl. Metodą tą badano skład glikoaminoglikanów rogówki (21) i chrząstki (22). Stosowano również dwuetyloaminoetylowe pochodne celulozy i dekstranu: DEAE-celulozę i DEAE-Sephadex (23—29).

Wspólną wadą metod jonowymiennych było niezadawalające odzyskiwanie składników naniesionych na kolumnę. Stosując żywicę Deacidite FF×8 i elucję roztworami chlorku sodu można było uzyskać zaledwie 30—50% glikoaminoglikanów wprowadzonych na kolumnę (19). Kwas hialuronowy udało się odzyskać w 70% z kolumny Dowex 1×2 eluowanej chlorkiem sodu w 8 M roztworze mocznika (30) i w 80% z DEAE-Sephadex (31). Również wydajność elucji innych glikoaminoglikanów z DEAE-Sephadex (32) nie przekraczała 70%. Wydajność ilościową, w granicach błędów oznaczenia uzyskał Hallen (33), stosując wstępny rozdział przy użyciu kolumny z Sephadex G-50 i elucję 0,15 M roztworem NaCl. Frakcję wysokocząsteczkową rozdzielono następnie na DEAE-celulozie (Whatman DE-52) w temperaturze 60°C, stosując gradient chlorku litu w pH 4.

II-2. Chromatografia cienkowarstwowa

Do rozdzielania glikoaminoglikanów stosowano również chromatografię cienkowarstwową na płytkach powleczonych żelazem krzemionkowym (bez dodatku gipsu) (34). Mieszanina n-propanolu z wodnym roztworem amoniaku stanowiła fazę rozwijającą. Uzyskano rozdzielanie mieszaniny zawierającej izomerycznie siarczany chondroityny, siarczan keratanu, siarczany heparanu i kwas hialuronowy.

Ciekawą metodę rozdzielania chondroitynosiarczanów oraz siarczanów

keratanu i dermatanu, na bibule z włókna szklanego, opublikowali L i p i e l l o i M a n k i n (35). Wykorzystano tu różną rozpuszczalność wymienionych glikozoaminoglikanów w etanowych roztworach soli wapniowych zakwaszonych kwasem octowym. Ten sam chromatogram rozwijano kolejno w pięciu roztworach octanu wapniowego o różnej zawartości alkoholu. Odczynnikiem wywołującym był alkoholowy roztwór błękitu toluidynowego. Metoda ta została wykorzystana do badania składu glikozoaminoglikanów moczu (36) i chrząstki (37).

Chromatografię cienkowarstwową na płytkach pokrytych mieszaniną Sephadex G-100 i celulozy (4:1) wykorzystano do oznaczania masy cząsteczkowej chondroityno-4-siarczanu, chondroityno-6-siarczanu i siarczanu dermatanu a także heparyny oraz do badania składu glikozoaminoglikanów ściany dwunastnicy (38).

II-3. Rozdzielanie kompleksów cetylopirydynowych glikozoaminoglikanów

Tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów glikozoaminoglikanów z długołańcuchowymi solami amoniowymi zostało wykorzystane również do rozdzielania glikozoaminoglikanów. Kompleksy te, jak już wspomniano, rozpuszczają się w roztworach elektrolitów a zmiana rozpuszczalności, często raptowna, następuje w wąskich granicach stężeń elektrolitu. Stężenie soli nieorganicznej, przy której następuje nagłe załamanie krzywej rozpuszczalności amoniowego kompleksu glikozoaminoglikanu nazwano „krytycznym stężeniem soli” (9); w roztworach elektrolitów o stężeniach niższych od „krytycznego stężenia soli” rozpuszczalność kompleksu jest bardzo mała, prawie taka jak w czystej wodzie. Wielkość „krytycznego stężenia soli” kompleksów amoniowych różnych glikozoaminoglikanów jest różna i w znacznej mierze zależy od masy cząsteczkowej i budowy chemicznej. Frakcjonowanie glikozoaminoglikanów oparte na różnych wartościach „krytycznego stężenia soli” przeprowadza się w trojaki sposób:

- polisacharydy i czwartorzędowy związek amoniowy miesza się z roztworem soli o dostatecznie wysokim stężeniu, nie dopuszczającym do utworzenia nierozpuszczalnych kompleksów; podczas rozcieńczenia wodą tego roztworu kompleksy poszczególnych glikozoaminoglikanów wytrącają się kolejno z malejącym krytycznym stężeniem soli (39),
- kompleks glikozoaminoglikanu z solą amoniową wytrąca się z roztworu soli nieorganicznej o stężeniu wystarczająco dużym, aby zapobiec wytrącaniu innych składników mieszaniny (40).
- kompleksy wszystkich polisacharydów wytrąca się czwartorzędowym związkiem amoniowym, a następnie przeprowadza je kolejno do roztworu przez ekstrakcję roztworami soli o wzrastającym stężeniu.

W ostatnim przypadku okluzja kompleksów już rozpuszczonych na substancjach pozostających jeszcze w osadzie może utrudniać uzyskanie ost-

rych rozdziałów. Trudności tej można uniknąć, jeżeli kompleksy wytrąci się w postaci cienkiej warstewki na obojętnym nośniku takim jak celuloza lub Cellit.

Na tej podstawie opracowano metodę rozdzielania glikozoaminoglikanów na kolumnie z celulozy nasyconej 1% roztworem chlorku cetylopirydyniowego (41). Na wierzchołek kolumny nanoszono mieszaninę glikozoaminoglikanów w 0,005 M roztworze siarczanu sodowego i kolumnę przemywano roztworem chlorku cetylopirydyniowego, w wyniku czego kompleksy cetylopirydyniowe glikozoaminoglikanów wytrącały się na celulozie. Przy przemywaniu roztworami soli (NaCl lub $MgCl_2$) o wzrastających stężeniach, kompleksy rozpuszczały się i ulegały wymywaniu z kolumny. Nie jest to metoda chromatograficzna w ogólnie przyjętym znaczeniu tego słowa. Jest ona raczej pokrewna metodom wytrącania i rozpuszczania stosowanym do rozdzielania kwasów nukleinowych i białek. Opracowano również metodę opartą na tych samych założeniach, przeznaczoną dla małych ilości tkanki (15 do 20 μg glikozoaminoglikanów (11)), stosując kolumnienki o średnicy 3 mm i długości 6 cm. Ilość poszczególnych glikozoaminoglikanów określano oznaczając zawartość heksozamin w uzyskanych frakcjach. Wadą powyższych metod jest trudność w rozdzieleniu izomerycznych glikozoaminoglikanów chondroityno-4-siarczanu, chondroityno-6-siarczanu i siarczanu dermatanu.

Kompleksy glikozoaminoglikanów z czwartorzędowymi jonami amoniowymi są również rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych (9). Biorąc to pod uwagę, a także fakt, że pK_a kwasu glukuronowego w chondroityno-4-siarczanie jest niższe niż kwasu iduronowego w siarczanie dermatanu, wprowadzono do sekwencji roztworów eluujących rozpuszczalnik organiczny będący mieszaniną n-propanalu, metanolu i kwasu octowego (42). Pozwoliło to na lepsze rozdzielanie izomerycznych chondroitynosiarczanów. W oparciu o opisane doświadczenia zaproponowano prostą i szybką mikrometodę rozdzielania glikozoaminoglikanów (8). Wytrącone na sproszkowanej celulozie cetylopirydyniowe kompleksy glikozoaminoglikanów eluowano roztworami soli o wzrastających stężeniach, włączając rozpuszczalnik organiczny do sekwencji roztworów eluujących. Uzyskano rozdzielanie mieszaniny na siedem frakcji, które zawierały kolejno: 1 — siarczan karatanu, 2 — kwas hialuronowy i chondroitynę, 3 — siarczan heparanu, 4 — chondroityno-4-siarczan, 5 — chondroityno-6-siarczan, 6 — siarczan dermatanu i 7 — heparynę. Oznaczanie heksozamin zastąpiono oznaczaniem kwasów uronowych, jako miary zawartości glikozoaminoglikanów w uzyskanych frakcjach. Nie wymaga ono uprzedniej hydrolizy, co znacznie skraca czas oznaczania. Prowadząc równolegle rozdzielanie tej samej próbki na czterech kolumnienkach i oznaczając w eluatach z poszczególnych kolumnienek kwasy uronowe, galaktozę, sulfaminoheksozy i kwas iduronowy, można uzyskać dodatkowe informacje na temat obecności poszczególnych glikozoaminoglikanów w otrzymanych frakcjach.

Bohn i Kolbhen (43) przeprowadzili badania porównawcze technik kolumnowych najczęściej stosowanych do rozdzielania glikozoaminoglikanów. Doświadczenia wykazały, że dwa sposoby — użycie celulozy nasyconej chlorkiem cetylopirydyniowym oraz celulozy DE-52 — znacznie przewyższają wszystkie pozostałe (Dowex 1×2, Zerolit H-IP, SRA 132, DEAE-Sephadex A-25, QAE-Sephadex A-50, celuloza ECTEOLA). W żadnym jednak wypadku nie udało się uzyskać całkowitego rozdzielenia mieszaniny zawierającej kwas hialuronowy, siarczan karatanu, siarczan dermatanu, chondroityno-4-siarczan, chondroityno-6-siarczan, siarczan heparanu i heparynę. Mieszaninę tę można rozdzielić stosując kombinowaną technikę chromatograficznego frakcjonowania glikozoaminoglikanów przy użyciu celulozy nasyconej chlorkiem cetylopirydyniowym, celulozy DE-52 i Dowexu 1×2, kolejno jako wypełniaczy.

II-4. Metody elektroforetyczne.

Spośród elektroforetycznych metod rozdzielania glikozoaminoglikanów największą popularność zdobyła elektroforeza na octanie celulozy, ze względu na swą znaczną zdolność rozdzielczą i dużą czułość reakcji wywołujących (44,45,46). Metody te mogą być użyteczne do analizowania dużej ilości próbek oraz zastosowane do ilościowych oznaczeń glikozoaminoglikanów (47,48). Sprawdzono przydatność tych metod do badania składu glikozoaminoglikanów tkanki skórnej (49).

Elektroforeza dwukierunkowa na paskach octanu celulozy, w dwóch różnych buforach o pH 3 i 8, pozwoliła na rozdzielenie (50) i ilościowe oznaczenie (51) siedmiu głównych glikozoaminoglikanów.

Elektroforetyczne metody rozdzielania glikozoaminoglikanów na żelu poliakrylamidowym (52,53) zostały zastosowane do badania masy cząsteczkowej glikozoaminoglikanów.

Rozdzielanie glikozoaminoglikanów na żelu agarozowym umożliwia ilościowe oznaczanie heparyny (54), a połączenie tej metody z elektroforezą bibułową pozwala na rozdzielenie siarczanu heparanu, siarczanu chondroityny i hialuronianu (55).

III. Oznaczanie poszczególnych glikozoaminoglikanów w mieszaninie.

Istnieją metody pozwalające na bezpośrednie oznaczenie siarczanu keratanu (56), siarczanu dermatanu (57) w obecności innych glikozoaminoglikanów tkanki łącznej, z pominięciem czasochłonnego rozdzielania mieszaniny. Metody termograwimetryczne, oparte na pomiarze ubytku masy mieszaniny glikozoaminoglikanów, który jest proporcjonalny do stężenia poszczególnych glikozoaminoglikanów w badanej próbce (50), pozwalają

na oznaczenie trzech grup glikozaaminoglikanów: polikarboksylowych (kwas hialuronowy, chondroityna), polikarboksylo-siarczanowych (chondroityno-4-siarczan, chondroityno-6-siarczan i siarczan dermatanu) oraz polisiarczanowych (siarczan keratanu).

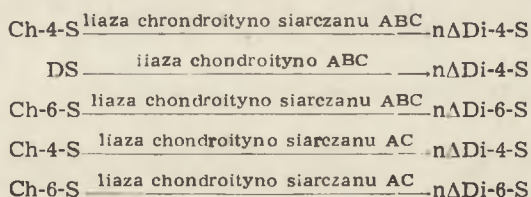
Najodpowiedniejsze jednak dla oznaczania pojedynczych glikozaaminoglikanów w mieszaninie są metody enzymatyczne z uwagi na swą wysoką specyficzność. Kwas hialuronowy można oznaczyć po degradacji hialuronidazą w obecności innych glikozaaminoglikanów (59). Ważnym krokiem naprzód w rozwoju metod oznaczania glikozaaminoglikanów było wyodrębnienie przez Yamagata i wsp. (60) enzymów bakteryjnych rozkładających w specyficzny sposób izomeryczne chondroityno siarczany. Enzymami tymi są:

- liaza chondroityno siarczanu ABC (4.2.2.4. Chondroitin ABC lyase (61))
- liaza chondroityno siarczanu AC (4.2.2.5. Chondroitin AC lyase)
- chondro-4-sulfataza (3.1.6.9)
- chondro-6-sulfataza (3.1.6.10).

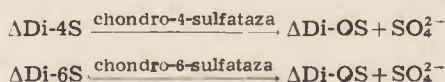
Wykorzystując powyższe enzymy opracowano mikrometodę (62) oznaczania chondroityno siarczanów w obecności kwasu hialuronowego, chondroityny, siarczanu heparanu, siarczanu keratanu i heparyny. Badaną próbkę glikozaaminoglikanów poddaje się oddzielnie działaniu liazy chondroityno siarczanu ABC i oddzielnie działaniu liazy chondroityno siarczanu AC. W wyniku reakcji eliminacji powstają nienasycone disacharydy:

- $\Delta 4,5\text{-}\beta\text{-D-glukuronozyl-o-(1}\rightarrow\text{3)-2-acetyloamino-2-dezoksy-4-sulfo-D-galaktoza } (\Delta \text{ Di-4S}),$
- $\Delta 4,5\text{-}\beta\text{-D-glukuronozyl-o-(1}\rightarrow\text{3)-2-acetyloamino-2-dezoksy-6-sulfo-D-galaktoza } (\Delta \text{ Di-6S})$

zgodnie z schematem reakcji:



Utworzone nienasycone disacharydy, $\Delta \text{ Di-4S}$ pod działaniem chondro-4-sulfatazy i $\Delta \text{ Di-6S}$ pod działaniem chondro-6-sulfatazy, przechodzą w bezsiarczanowy, nienasycony disacharyd: $\Delta 4,5\text{-}\beta\text{-D-glukuronozyl-o-(1}\rightarrow\text{3)-2-acetyloamino-2-dezoksy-D-galaktozę } (\Delta \text{ Di-Os},$ z równoczesnym uwolnieniem nieorganicznego siarczanu, zgodnie ze schematem reakcji.



Oznaczenie ilościowe można przeprowadzić w trojaki sposób:

- powstające nienasycone disacharydy, $\Delta \text{ Di-4S}$ i $\Delta \text{ Di-6S}$, oznaczyć po

uprzednim rozdzielaniu metodą chromatografii bibułowej (63)

- po hydrolizie enzymatycznej z udziałem sulfohydrolaz oznaczyć nieorganiczny siarczan,
- powstałe nienasycone bezsiarczanowe disacharydy (Δ Di-OS) oznaczyć kolorymetrycznie np. reakcją Morgana-Elsona (64).

Oznaczenie niektórych charakterystycznych składników monosacharydowych glikozoaminoglikanów umożliwia określenie zawartości tych glikozoaminoglikanów w mieszaninie wyodrębnionej z tkanki bez ich uprzedniego rozdzielania np. zawartość galaktozy jest wykładnikiem ilości siarczanu keratanu, podobnie jak ilość sulfaminoheksos odpowiada zawartości heparyny i siarczanu heparanu. Oznaczenia te przeprowadza się powszechnie znanymi metodami, których omawianie przekracza ramy niniejszego artykułu.

Artykuł nadszedł 22.9.1975; po rewizji autorskiej otrzymano 20.11.1976.

PIŚMIENICTWO

1. Tomaszewski J., (1973), *Postępy Biochem.*, **19**, 447—469.
2. Greiling H., (1974) w *Clinical Biochemistry Principles and Methods*, red. H. Ch. Curtius i M. Roth, tom II, str. 944—971, Walter de Gruyter, Berlin-New York.
3. Antonopoulos C. A., Cardell S., Hamnström B., (1965), *J. Atheroscler. Res.*, **5**, 9—15
4. Ogston A. G., Sherman T. F., (1959), *Biochem. J.*, **72**, 301—305.
5. Hjerquist S. O., (1964), *Acta Soc. Med. Upsalien.*, **69**, 83—104.
6. Thunell S., (1967), *Acta Univers. Lunden.*, **2**, 1—59.
7. Muir P. D., Wood M., (1969), *Clin. Chim. Acta*, **24**, 105—111.
8. Švejcár J., Von B. Robertson W., (1967), *Anal. Biochem.*, **18**, 333—350.
9. Scott J. E., (1963), w *Methods of Biochemical Analysis*. red. D. Glick tom 8, str. 145—195, Intersc. Publ., New York.
10. Scott J. E., (1955), *Chem. Ind.*, (London) 168—169.
11. Antonopoulos C. A., Gardell S., Szirmai J. A., De Tyssonsk E.R., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 1—19.
12. Davidson E. A., Small W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 445—452.
13. Hjertquist S. O., (1964), *Acta Soc. Med. Upsalien.*, **69**, 23—40.
14. Tomaszewski J., Hanzlik J., Łopatyński J., Gilatowska B., (1971), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, **47**, 51—57.
15. Bera B. C., Foster F. A. B., Stacey M., (1955), *J. Chem. Soc.*, 3788—3793.
16. Davidson E. A., Meyer K., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 605—611.
17. Schiller S., Slover G. A., Dorfman A., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 983—987.
18. Barker S. A., Cruickbank C. N. D., Webb T., (1965), *Carbohydr. Res.*, **1**, 52—61.
19. How N. J., Wood P. J., Cruicksbank C. N. D., (1969), *Carbohydr. Res.* **11**, 103—111.
20. Ringertz N. R., Reichard P., (1960), *Acta Chem. Scand.*, **14**, 303—311.
21. Anseth A., Laurent T. C., (1961), *Exp. Eye Res.*, **1**, 25—38.

22. Greiling H., Herbertz T., Stuhlssatz H. W., (1964), *Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem.*, **336**, 149—162.
23. Cleland R. L., Cleland N. C., Lipsky J. J., Lyn V. E., (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 3141—3149.
24. Jermy M. A., (1962), *Aust. J. Biol. Sci.*, **15**, 787—798.
25. Kraemer P. M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1437—1445.
26. Lloyd P. F., Roberts G. P., Lloyd K. O., (1960), *Biochem. J.*, **75**, 14P—14P.
27. Silbert J. E., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1310—1315.
28. Berman E. R., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 120—122.
29. Schmidt M., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 346—348.
30. Pearce R. H., Mathieson J. M., Grimmer B. J., (1968), *Anal. Biochem.*, **56**, 465—471.
31. Preston B. N., Davies M., Ogston A. G., (1965), *Biochem. J.*, **96**, 449—471.
32. Lehtonen A., (1960), *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, **310**, 1—78.
33. Hallen A., (1972), *J. Chromatog.*, **71**, 83—91.
34. Marzullo G., Lash J. W., (1967), *Anal. Biochem.*, **18**, 575—578.
35. Lipiello L., Mankin H. J., (1971), *Anal. Biochem.*, **39**, 54—58.
36. Humbel N., Chalmos N. A., (1972), *Clin. Chim. Acta*, **40**, 290—293.
37. Mankin W. J., Lipiello L., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1712—1719.
38. Tortolani G., Romagnoli E., (1975), *Anal. Biochem.*, **66**, 29—34.
39. Scott J. E., Gardell S., Nilsson L. M., (1957), *Biochem. J.*, **67**, 7P—8P.
40. Scott J. E., (1955), *Biochem. J.*, **62**, 31P—31P.
41. Antonopoulos C. A., Berelius E., Gardell S., Hamnström B., Scott J. E., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **54**, 213—226.
42. Antonopoulos C. A., Gardell S., (1963), *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1474—1476.
43. Bohn R., Kalbhen D. A., (1971), *J. Chromatog.*, **62**, 339—408 i 409—415.
44. Herd J. K., (1968), *Anal. Biochem.*, **23**, 117—121.
45. Seno N., Anno K., Kondo K., Nagase S., Saito S., (1970), *Anal. Biochem.*, **37**, 197—202.
46. Wessler E., (1968), *Anal. Biochem.*, **26**, 439—444.
47. Endo M., Yosizawa Z., (1975), *Anal. Biochem.*, **65**, 537—539.
48. Hsu D., Hoffman P., Mashburn Jr. T. A., (1972), *Anal. Biochem.*, **46**, 156—163.
49. Breen M., Weistein H. G., Andersen M., Veis A., (1970), *Anal. Biochem.*, **35**, 146—159.
50. Hata R., Nagai Y., (1972), *Anal. Biochem.*, **45**, 462—468.
51. Hata R., Nagai Y., (1973), *Anal. Biochem.*, **52**, 652—656.
52. Hilborn J. C., Anastassiadis P. A., (1971), *Anal. Biochem.*, **39**, 88—92.
53. Hsu D., Hoffman P., Mashburn Jr. T. A., (1973), *Anal. Biochem.*, **52**, 382—394.
54. Jaques L. B., Wollin A., (1973), *Anal. Biochem.*, **52**, 219—233.
55. Dietrich C. P., Dietrich S. M. C., (1972), *Anal. Biochem.*, **46**, 209—215.
56. Wortman B., (1962), *Anal. Biochem.*, **4**, 10—16.
57. Di Ferrante N., Donsky P. V., Berglund R. K., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 549—553.
58. Bihari-Varga M., (1971), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **6**, 271—275.
59. Hatae Y., Nakita A., (1975), *Anal. Biochem.*, **64**, 30—36.
60. Yamagata T., Saito H., Habuchi O., Suzuki S., (1969), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1523—1535.

61. Florkin M., Stotz E. H., (1973), *Enzyme Nomenclature w Comprehensive Biochemistry*, Tom 13, Elsevier, Amsterdam.
62. Saito H., Yamagata T., Suzuki S., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1536—1542.
63. Suzuki S., Saito E., Yamagata T., Anno K., Seno H., Kawai Y., Furuhashi T., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1545—1550.
64. Morgan W. T. J., Elson A., (1934), *Biochem. J.*, **28**, 988—995.

VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny

Rzym, 27 sierpień — 3 wrzesień, 1976

VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, zorganizowany z ramienia Comité International de Photobiologie (CIP) w Rzymie zgromadził około 600 uczestników z 37 krajów świata. Kongres zorganizowany był przez trzy włoskie instytucje: Instytut Zdrowia, Włoską Grupę Fotobiologiczną oraz Narodowy Komitet Energii Atomowej. Program naukowy podzielono na 15 sympozjów, 4 sesje komunikatów — plakatów (*poster sessions*), 4 dyskusje „okrągłego stołu” (*round tables*) i dyskusje panelowe. Organizacja Kongresu umożliwiła nie nużący, a jednocześnie efektywny udział w różnych formach obrad: podczas sympozjów porannych zaproszeni lektorzy referowali w krótkich, 30—45-minutowych wykładach dotychczasowe osiągnięcia i aktualny stan badań w zakresie wybranych specjalności fotobiologicznych. W sumie wygłoszono 70 wykładów sympozjalnych reprezentujących najważniejsze problemy współczesnej fotobiologii. Rozwinięciem i uzupełnieniem sympozjów były 4 popołudniowe sesje komunikatów w formie plakatów. Na VII Kongresie Fotobiologicznym zaprezentowano 360 komunikatów w formie plakatowej.

Na jedno nierzad dwugodzinne posiedzenie „okrągłego stołu” składały się 10—15-minutowe wprowadzenia i dyskusje dotyczące z góry ustalonych kilku zagadnień. W ramach Kongresu odbyło się również krótkie sympozjum na temat fotodegradacji chlorodwuoksyn, na którym omówiono procesy fotochemiczne, stymulujące detoksyfikację wysoce szkodliwych dla organizmów zwierzęcych produktów polimeryzacji pestycydów typu chlorofenoli. Ponadto Prof. G. Porter, laureat nagrody Nobla za opracowanie metody fotolizy błyskowej miał piękny wykład pt: „Solar Energy”, analizujący współczesne możliwości i kierunki wykorzystania energii słonecznej oraz rolę fotobiologii w tym zakresie.

Tematyka Kongresu obejmowała następujące zagadnienia (w nawiasach podano liczbę referatów sympozjalnych i komunikatów — plakatów):

1. Fotofizyczne i fotochemiczne własności stanów wzbudzonych (30).
2. Fotoreakcje w biologicznych makrocząsteczkowych kompleksach (14).
3. Fototaksje mikroorganizmów (10).
4. Fotosynteza (80).
5. Porównanie efektów działania promieniowania jonizującego oraz widzialnego i UV (10).
6. Fotosensybilizowane reakcje kwasów nukleinowych i białek (24).
7. Naprawa uszkodzeń radiacyjnych (61).
8. Układy przekształcające energię słoneczną (11).
9. Fotobiologia w medycynie (57).
10. Rakotwórcze efekty promieniowania (10).
11. Światło i rozwój (31).
12. Schorzenia skóry indukowane światłem: chroniczne zapalenia skóry (5).

13. Oddziaływania przestrzeni okołoziemskiej ze środowiskiem: modyfikacje fotobiologiczne (8).
 14. Procesy widzenia (26).
 15. Mutagenne efekty promieniowania (15).
- Konferencje okrągłego stołu:
1. Jednostki, nomenklatura i dozymetria w fotobiologii (4).
 2. Miejscowa ochrona skóry przed promieniowaniem UV (4).
 3. Ochrona skóry przed promieniowaniem UV i widzialnym (24).
 4. Fotochemoterapia łuszczycy skóry (7).

Jak widać z powyższego, tematyka Kongresu obejmowała szeroki profil zagadnień z pogranicza fizyki, chemii, biochemii, biologii, medycyny, ochrony środowiska naturalnego i techniki. Nowa tematyka VII Kongresu Fotobiologicznego obejmowała aktualne problemy i trendy nurtujące współczesną fotobiologię o dużym znaczeniu aplikacyjnym. W związku z kryzysem energetycznym coraz szerzej rozwijają się badania nad wykorzystaniem energii słonecznej. Oprócz sposobów fizycznych i chemicznych, takich jak baterie fotoogniów krzemowych, procesy fotogalwaniczne i fotoliza wody zaadsorbowanej np. na TiO_2 , wiele uwagi poświęcono mechanizmom biochemicznym i biologicznym, umożliwiającym utylizację energii słonecznej. Należy tu wymienić syntetyczne podwójne błony zawierające chlorofil lub inny sensybilizator (tzw. „sztuczny liść”) oraz chlorofilowo-fosfolipidowe pęcherzyki (*vesicles*), reakcje wydzielania wodoru przez fotosyntetyczne bakterie oraz izolowane układy zawierające sensybilizator, donor wodoru (NADH, askorbinian, RSH) i hydrogenazy, a nadto hodowle glonów wykorzystujące odpadki i ścieki miejskie.

Drugim zagadnieniem, wzbudzającym coraz większe zainteresowanie, a zarazem niepokój, są możliwe skutki biologiczne zmniejszania stężenia O_3 w warstwie ozonowej. Jak wiadomo, wskutek daleko posuniętej ingerencji człowieka w atmosferę (wybuchy atomowe, transport naddźwiękowy, masowe użycie freonów) postępują procesy niszczące ochronną warstwę ozonu. Obserwuje się wzrost natężenia promieniowania UV w najbardziej niebezpiecznym zakresie spektralnym 250–310 nm, odpowiadającym widmom czynnym melanomy, dermatoz, fotouszkodzenia błon biologicznych oraz pasmom absorpcji kwasów nukleinowych i białek. Dlatego też dużo uwagi poświęcono biologicznym skutkom tego niepokojącego zjawiska, ze szczególnym uwzględnieniem zachorowalności na raka, zmian w ekosystemach roślin niszczących, a zwłaszcza planktonu oraz roślin uprawnych.

Stosunkowo nowym zagadnieniem, badanym od kilku zaledwie lat, jest fotodegradacja błon komórkowych. Wiąże się to z procesami starzenia raka skóry indukowanego promieniowaniem UV, fotolecznictwem itp. Wysiłki badaczy zmierzają w dwu kierunkach:

- 1) wyjaśnienia pierwotnych procesów fotochemicznych, zachodzących w błonach
- 2) znalezienia skutecznych inhibitorów najbardziej szkodliwych procesów. Dużą rolę w tym zakresie przypisuje się tworzeniu i reakcjom tlenu singletowego w obecności fotosensybilizatorów jak np. protoporfiryny oraz efektem działania takich inhibitorów jak β -karoten, α - tokoferol, obecnych w błonach biologicznych.

Referaty sympozjalne dotyczące zagadnień wymienionych w punktach 6, 7, 9, 10, 12, 15 przyciągnęły na Kongres bardzo wielu specjalistów pracujących w ośrodkach szpitalnych. Wyraźnie uwidoczniła to tematyka konferencji okrągłego stołu, obejmująca badania ostatniego dziesięciolecia w zakresie efektywnego leczenia łuszczycy i innych schorzeń skóry. Z powodzeniem zastosowano związki psoralenu z jednoczesnym kontrolowanym naświetlaniem lampami emitującymi ultrafiolet w pasmie około 400 nm do leczenia tych schorzeń tzw. metoda PUVA (*Psoralen+UV Application*). Metodę tę zaczyna się stosować również w Polsce.

W czasie trwania Kongresu wiele włoskich i zachodnioeuropejskich firm de-

monstrowało swoje wyroby, mające zastosowanie w badaniach fotobiologicznych jak aparatura pomiarowa, nowoczesne źródła promieniowania, urządzenia z zakresu światłolecznictwa i różnorodne zestawy czułych dozymetrów używane w klinikach przy leczeniu skóry.

Obrady miały miejsce w Pałacu Kongresów, zlokalizowanym w nowoczesnej dzielnicy Rzymu E.U.R. niczym nie przypominającej jego historycznej świetności. Jednakże ani organizatorzy, ani uczestnicy nie zrezygnowali z możliwości pobieżnego chociażby zapoznania się z zabytkami „wiecznego miasta” oraz Watykanu. Sprzyjało temu nie tylko właściwe rozdzielenie w czasie tematyki obrad i rozmieszczenie hoteli zajmowanych przez uczestników, lecz także potencjalne możliwości uczestniczenia w licznych wycieczkach, organizowanych przez włoskie biura turystyczne. Gospodarze Kongresu przygotowali dwie imprezy, dostępne ze względów finansowych dla wszystkich uczestników. Jedną z nich było oficjalne przyjęcie na Kapitolu, podczas którego prezydent CIP prof. R. B. Setlow (USA) wręczył trzy złote medale im. Finsena. Są one przyznawane za wybitne osiągnięcia w zakresie fotobiologii. Dla grupy polskiej szczególnie miłym momentem było odznaczenie prof. dr Davida Shugara za wybitne osiągnięcia w badaniu fotochemii i struktury kwasów nukleinowych i białek. Klasyczna renesansowa architektura Kapitolu projektowana między innymi przez Michała Anioła, bogate zbiory sztuki oraz nocna panorama roztaczająca się ze wzgórza Kapitolu na ruiny Forum Romanum, Koloseum i Tybr dostarczyły uczestnikom niezapomnianych wrażeń. Drugą imprezą był wydany z okazji Kongresu koncert muzyki kameralnej w kościele na pięknym placu Santa Maria del Popolo. Nastrój we wnętrzu zabytkowego kościoła, freski Caravaggio, doskonała akustyka stwarzały niepowtarzalny odbiór koncertu.

Polska grupa fotobiologiczna liczyła 7 osób, głównie z instytutów PAN w Warszawie, przy czym liczba zgłoszonych i wydrukowanych komunikatów wynosiła 9 (w tym przedstawionych 5). Plakaty — komunikaty, eksponowane przez 5 osób, reprezentowały większość głównych kierunków badań związanych z fotobiologią, prowadzonych w kraju, jak podstawowe badania spektroskopii biologicznie ważnych związków heterocyklicznych, efekty immunologiczne spowodowane przez fotodynamiczne działanie psoralenu, fototaksja pierwotniaków i struktura fotoreceptorów oraz chemiluminescencja i generowanie tlenu singletowego w procesie fotodegradacji melanin i kwasów humusowych. W ramach Kongresu odbyło się zebranie Komitetu Wykonawczego CIP z udziałem przedstawicieli grup fotobiologicznych poszczególnych krajów — członków CIP. Dokonano zmiany nazwy stowarzyszenia na „Association Internationale de Photobiologie” (AIP), która lepiej odpowiada strukturze organizacyjnej i perspektywom rozwojowym stowarzyszenia. Następny, VII Kongres Fotobiologiczny odbędzie się zgodnie z tradycją za cztery lata. Miejscem obrad będzie Francja, a głównym organizatorem Prof. Claude Helene z Paryża.

J. Sławiński

UWAGA P.T. AUTORZY!
REDAKCJA POSTĘPÓW BIOCHEMII UPRZEJMIE PRZYPOMINA
O KONIECZNOŚCI OGRANICZANIA OBJĘTOŚCI PRAC PRZESY-
ŁANYCH DO REDAKCJI.

RECENZJE

The Enzymes of Biological Membranes

pod redakcją A. Martonosi

1976, Plenum Press, New York, London

Seria zatytułowana „Enzymy błon biologicznych” redagowana przez Dr A. Martonosi'ego obejmuje cztery tomy. Recenzja dotyczy tomu 2 p.t. „Biosynteza składników komórki”, tomu 3 p.t. „Transport przez błony” oraz tomu 4 „Systemy transportu elektronów i ich receptory”.

Ogólnym zamierzeniem redaktora było przedstawienie czytelnikowi molekularnych aspektów funkcji enzymów błonowych. Zarówno redaktor tej serii jak autorzy poszczególnych artykułów są wybitnymi specjalistami w dziedzinie badań struktury i funkcji błon biologicznych, a ich prace przyczyniły się wydatnie do obecnego stanu wiedzy w tej dziedzinie. Wszystkie rozdziały cechuje jasne i syntetyczne przedstawienie aktualnych wyników. Wiadomości podane w omawianych tomach są na tyle szczegółowe, że przedstawiają również wyniki kontrowersyjne i mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań. Dzięki szerokiemu wachlarzowi omawianych zagadnień i wnikliwemu omówieniu bardzo mogą być pomocne dla wszystkich badaczy zainteresowanych błonami biologicznymi.

Tom. 2: Biosynthesis of cell components, stron 616.

Tom „Biosynteza składników komórki” obejmuje krytyczną analizę wyników dotyczących procesów biosyntezy składników ściany bakteryjnej i błon biologicznych: fosfolipidów, steroli, białek i glikoproteidów. Tom podzielony jest na trzy części. W części A składającej się z 6 rozdziałów omówiono między innymi enzymy błonowe w świetle ich roli w metabolizmie acylowych i eterowych pochodnych fosfolipidów w komórkach zwierzęcych i roślinnych oraz rolę enzymów błonowych w metabolizmie steroli w komórkach zwierzęcych i roślinnych. W części B zaś omówiono między innymi drogi biosyntezy ściany bakteryjnej, biosyntezy glikoproteidów, rolę endoplazmatycznego retikulum i aparatu Golgiego w biosyntezie glikoproteidów. Rozdział omawiający zmiany galaktosylotransferazy z hodowli tkanek w komórkach transformowanych wirusem jest bardzo interesujący również z medycznego punktu widzenia. W części C, najbardziej heterogenicznej tematycznie omówione są zmiany zachodzące w błonie jak również metabolizm u *Escherichia coli* pod wpływem bakteriofaga T₄. Jeden z rozdziałów tej części omawia rolę enzymów błonowych płytek krwi w hemostazie (Barton).

Dobrze poznane i scharakteryzowane enzymy są przedmiotem osobnych rozdziałów niniejszej książki, natomiast enzymy, na temat których jest mniej danych doświadczalnych, omawiane są w aspekcie omawianie dróg biosyntezy określonych związków. Dugan i Porter, w artykule zatytułowanym „Membrane bound enzymes of sterol metabolism” wykazali jak wielki postęp wiedzy nastąpił w dziedzinie określa-

nia sekwencji reakcji w procesie syntezy steroli. Autorzy podkreślają, że jednak nadal nie udało się oczyścić poszczególnych enzymów błonowych związanych z tymi procesami. Rozdział napisany przez Landsa i Crawforda omawia enzymy związane z metabolizmem fosfolipidów w błonach komórek zwierzęcych. Autorzy podają najnowsze dane (literatura obejmuje pozycje do 1975 roku) dotyczące znanych już dróg biosyntezy i rozpadu najpopularniej występujących fosfolipidów jak również fosfolipidów występujących w niewielkich ilościach, a odgrywających ważną rolę szczególnie w aktywności enzymów błonowych. Bardzo ciekawa jest część rozdziału omawiająca znaczenie poszczególnych składników cząsteczki fosfolipidów, mianowicie łańcucha acylowego, zasady azotowej i grupy fosforanowej w przepuszczalności błon biologicznych, roli błon w ontogenezie, wpływu peroksydacji fosfolipidów błonowych na aktywność enzymów związanych z błonami.

Tom 3: „Membrane transport” stron 438.

Tom ten podzielony jest również na trzy zasadnicze części. Część A omawianego tomu dotyczy transportu przez błony mikroorganizmów. Poruszane są takie zagadnienia jak transport białek przez błony bakteryjne (Kepes), bakteryjna transferaza fosfoenolopirogronianu (Kundig), struktura i funkcja ATPaz błon bakteryjnych (Abrams), oddychanie i przemiana energii u *Escherichia coli* (Hendler). Część B dotyczy aparatu fosfosyntezy, gdzie omawiane są takie zagadnienia jak molekularna organizacja fotosyntezy w błonach chloroplastów. W części C omawiane są zagadnienia transportu przez błony komórek zwierzęcych.

Jeden z rozdziałów poświęcony jest ATPazie transportującej jony wapnia w błonach sarkoplazmatycznego retikulum. Rolą tych błon jest regulacja poziomu wapnia w komórce mięśniowej w cyklu skurczowo-rozkurczowym. W czasie rozkurczu mięśnia wapń magazynowany jest w siateczce sarkoplazmatycznego retikulum otaczającej miofibryle i w wyniku impulsu nerwowego uwolniony jest z retikulum, umożliwiając interakcję aktyny z miozyną. MacLennan, który w roku 1971 po raz pierwszy oczyścił transportującą wapń ATPazę i kolejno charakteryzował inne białka tych błon swój artykuł poświęca omówieniu najnowszych osiągnięć w tej dziedzinie. Błony sarkoplazmatycznego retikulum, ze względu na bardzo wyspecjalizowaną funkcję i prosty skład chemiczny, są obiektem badań wielu badaczy zajmujących się zarówno mechanizmem transportu jak również interakcją lipidów i białek w błonach biologicznych.

E. Carafoli i Crompton omawiają rolę białek wiążących i transport substancji przez błony, proces transportu aminokwasów u bakterii i rolę w tym procesie białek wiążących aminokwasy. Innym rodzajem białek biorących udział w transporcie przez błony są białka wiążące wapń. Białka takie znaleziono w śluzówce jelita. Są one odpowiedzialne za absorpcję wapnia. Ich poziom uzależniony jest od obecności witaminy D. Białka wiążące wapń są obecne w mitochondriach i błonach sarkoplazmatycznego retikulum. Wszystkie te białka mogą być uwalniane z błon szokiem osmotycznym, co wskazuje na ich luźne powiązanie z błoną i hydrofilowy charakter. Według autorów białka te pełnią raczej funkcję receptorów odpowiednich substancji niż przekaźników poprzez błony.

M. G. Sarzała

Tom 4: Electron Transport Systems and Receptors, str. 431

Czwarty tom wydawnictwa „The Enzymes of Biological Membranes” poświęcony jest enzymom oksydoredukcyjnym błon mitochondrialnych i endoplazmatycznego retikulum, receptorom hormonów i neurotransmiterów oraz rodopsynie.

Pierwszy rozdział, autorstwa Y. Hatefi'ego, opisuje budowę i funkcję mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów enzymatycznych wchodzących w jego skład. Następnie Jane Vanderkooi i Maria Erecińska zajmują się cytochromem c. Rozdział ten traktuje w szczególności o właściwościach i funkcjach tego niskocząsteczkowego hemoproteidu w jego postaci związanej z błoną mitochondrialną i sztucznymi błonami modelowymi. Oksydazę cytochromową, jej budowę czwartorzędową, biosyntezę i organizację w błonie mitochondrialnej omawiają R. A. Capaldi i Margaret Briggs. Alexander Tzagoloff opisuje mitochondrialną ATP-azę, kompleks enzymatyczny funkcjonujący w mitochondriach normalnie w kierunku syntezy ATP sprzężonej z transportem elektronów. Przy okazji autor omawia krótko trzy hipotezy oksydacyjnej fosforylacji: chemiczną, chemiosmotyczną i konformacyjną. Wreszcie Yasuo Kagawa opisuje najbardziej spektakularne osiągnięcie współczesnej „mitochondriologii”, mianowicie rekonstrukcję w pełni sprawnego układu oksydacyjnej fosforylacji z izolowanych fragmentów.

Dwa dalsze rozdziały omawiają układy oksydoredukcyjne endoplazmatycznego retikulum. System zawierający cytochrom b_5 i jego reduktazę, funkcjonującą z NADH, bierze udział w desaturacji kwasów tłuszczowych (F. Scott Mathews i E. W. Czerwinski). Natomiast układ, dla którego donatorem elektronów jest NADPH i który zawiera cytochrom P-450, prowadzi reakcje hydroksylacji (Karl Dus). Wreszcie peroksydację lipidów błonowych i jej konsekwencje omawiają Paul B. McCay i J. Lee Poyer.

Druga część książki poświęcona jest receptorom błonowym. Otwiera ją rozdział o systemie cykazy adenylowej i roli lipidów w jego aktywacji (G. S. Levey i D. C. Lehotay). Następnie R. J. Lefkowitz i współpracownicy omawiają specyficzne powierzchniowe receptory hormonów ułożone w błonie komórkowej. Istotną rolę w przekazywaniu bodźców odgrywa receptor acetylocholino, który powoduje zmianę przepuszczalności błony komórkowej wobec jonów z chwilą przyłączenia acetylocholino. Receptor ten, występujący we wszystkich tkankach pobudliwych, izolowano i dokładniej poznano na razie wyłącznie z narządu elektrycznego pewnych ryb (opisuje to rozdział autorstwa Arthura Karlina). Natomiast enzymatyczny rozkład acetylocholino przez specyficzną esterazę związaną z błonami tkanek pobudliwych omawia T. L. Rosenberry.

Ostatni rozdział książki (napisany przez M. Montala i J. I. Korenbrot) traktuje o organizacji i właściwościach błon biologicznych czułych na światło i o roli rodopsyny w zamianie energii świetlnej na impulsy elektryczne.

Poszczególne rozdziały książki napisane zostały przez wybitnych specjalistów, którzy sami wnieśli znaczny wkład w omawiane zagadnienia. Podają oni najnowsze, najbardziej aktualne osiągnięcia i poglądy, ale nie kryją również luk i niedostatków naszej wiedzy na poszczególne tematy. Zwraca uwagę obszerna cytowana literatura. Książka stanowi nieocenioną lekturę dla badaczy zajmujących się traktowanymi w niej problemami.

Lech Wojtczak

Horst Reinbothe — „Einführung in die Biochemie”,**VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1975;****544 stron, 81 rycin, 115 tabel; cena 42,80 marek (N.R.D.)**

Jest to obszerny, gruntowny i nowoczesny podręcznik biochemii. Autor, specjalista w zakresie biochemii roślin, szczególnie wnikliwie potraktował zagadnienia fotosyntezy, wiązania molekularnego azotu, biosyntezy związków aromatycznych, metabolizmu siarki, jak również niektóre inne specyficzne problemy biochemii roślin, nie zawsze znajdujące wystarczające omówienie w podręcznikach biochemii. Natomiast książka mniej uwzględnia aspekty biochemii klinicznej. Jest zatem zdecydowanie adresowana do studentów biochemii kierunków przyrodniczych i rolniczych.

W układzie podręcznika zwraca uwagę wydzielenie w postaci jednego dużego rozdziału (ok. 120 stron) całej biochemii statycznej, czyli opisu budowy i właściwości związków naturalnych. Następne rozdziały to „Istota przemiany materii”, „Bioenergetyka” i „Enzymologia”. Oddzielnie omówione są również: lokalizacja procesów metabolicznych w komórce, zasady regulacji przemiany materii oraz metodyka biochemiczna. Dopiero po tym następują opisy poszczególnych przemian i szlaków metabolicznych. Końcowy rozdział omawia biosyntezę białka i kod genetyczny. Taki układ podręcznika, jakkolwiek nie pozbawiony logiki i przejrzysty dla bardziej zaawansowanych biochemików, może sprawiać pewne trudności studentom początkującym. Prowadzi on również niekiedy do rozczłonowania zagadnień ściśle ze sobą związanych. Na przykład oksydacyjna fosforylacja omawiana jest częściowo w rozdziale 4 („Bioenergetyka”) i częściowo w rozdziale 11 („Metabolizm wodoru i tlenu”). Struktura cząsteczki przenośnikowego kwasu rybonukleinowego pokazana jest już w rozdziale 2 („Chemiczny skład organizmów żywych”), ale dopiero w rozdziale 14 mowa jest o specyficznej funkcji tego związku.

Książka zaopatrzona jest w obszerny (7 stron) wykaz zalecanej literatury pomocniczej i indeks rzeczowy zawierający około 2000 haseł.

W sumie jest to wartościowy podręcznik, pomocny zarówno studiującym biochemię jak i pracownikom naukowym w zakresie biochemii i specjalności pokrewnych.

Lech Wojtczak

„Function and Metabolism of Phospholipids in the Central and Peripheral Nervous Systems”

wydana została przez G. Porcellati, Z. Amaduei i C. Galli w ramach wydawnictwa ciągłego „Advances in Experimental Medicine and Biology” Vol. 72 i zawiera zbiór referatów wygłoszonych na Sympozyjum satelitarnym 5-tego Kongresu Międzynarodowego Towarzystwa Neurochemii (Barcelona, 2—7.10.1975 r.).

Zawarte w tej książce referaty omawiają ostatnie osiągnięcia z zakresu funkcji i metabolizmu fosfolipidów w mózgu i obwodowym układzie nerwowym w aspektach biofizycznych, biochemicznych, fizjologicznych, cytologicznych, farmakologicznych i patologicznych. W sumie przedstawiono 30 referatów z różnych międzynarodowych ośrodków naukowych.

Dyskutowano głównie następujące zagadnienia:

1. Lokalizacja określonych fosfolipidów w błonach biologicznych
2. Natężenie metabolizmu fosfolipidów w tkance nerwowej
3. Funkcja fosfolipidów w układzie nerwowym (współzależność metaboliczna i fizjologiczna fosfolipidów i niektórych transmittarów).

Nie jest możliwe omówienie wszystkich referatów zawartych w tym tomie, w związku z tym ograniczono się do pobieżnego omówienia nielicznych, które zasługują na szczególną uwagę.

Finean i wsp. w swoim artykule wysuwają hipotezę na temat regulacyjnej roli jonów Ca^{++} w metabolizmie błonowych fosfolipidów, zwłaszcza fosfolipidów inozytoliowych. Sugerują oni również, że jony wewnątrzkomórkowe Ca^{++} stymulują biosyntezę diacylglicerolu, który jest prekursorem fosfolipidów. Artykuł Horrocks'a i wsp. poświęcony jest omówieniu syntezy fosfoglicerydów w mózgu. Autorzy dają szczegółową analizę matematycznego opracowania wyników, otrzymanych przy pomocy techniki izotopowej. Sposób opracowywania wyników, podany przez tych autorów, pozwala na precyzyjne określenie liczby obrotów (turnover) kwasów tłuszczowych fosfolipidów mózgu.

Regulacyjną rolę metabolizmu fosfolipidów mózgu przedstawia Orlando wraz ze współpracownikami. Stwierdzają oni, między innymi, że fosfolipidy otrzymane z mózgu wołu i wprowadzone dożylnie myszom działają aktywująco na kinazę pirydoksalową i cyklazę adenylową mózgu myszy.

Warto się zapoznać również z referatami poświęconymi zależności biosyntezy fosfolipidów i neurotransmitarów we frakcji synaptosomalnej mózgu. Obszerne omówienie tego zagadnienia, głównie na podstawie własnych badań, można znaleźć w referacie A. Y. Sun i G. Y. Sun. Autorzy sugerują, opierając się na licznych danych eksperymentalnych, że rola fosfolipidów w przepuszczalności błon synaptosomalnych dla jonów Na^+ , K^+ oraz Ca^{++} , jest jeszcze znaczniejsza niż się dotychczas uważało.

Zagadnienie wpływu neurotransmitarów na metabolizm fosfolipidów w błonach synaptosomalnych można znaleźć w opracowaniu Rowe i Gullis. Według tych autorów noradrenalina, acetylcholina, 5-hydrokсыtryptamina, histamina, dopamina, GABA, kwas glutaminowy i asparaginowy działają stymulująco na biosyntezę fosfolipidów błon synaptosomalnych. Mechanizm działania wyżej wymienionych transmittarów polegałby na aktywacji fosfolipazy A_2 , która w efekcie swojego działania dostarczałaby prekursorów do biosyntezy fosfolipidów.

Należy zaznaczyć, że poziom i układ poszczególnych referatów jest bardzo nierówny: jedne są omówieniami ogólnymi danego zagadnienia w oparciu o piśmiennictwo, inne stanowią przegląd publikowanych już dawniej własnych badań, a jeszcze inne mają postać zwykłych prac doświadczalnych. Szkoda, że książka nie zawiera dyskusji po wygłoszonych referatach, co często publikowane jest w opracowaniach sympozjalnych. Pomogłoby to zapewne w rozstrzygnięciu wątpliwości nasuwających się czytelnikowi przy zapoznawaniu się z niektórymi referatami.

W sumie jednak książka ta daje bogaty przegląd ostatnich osiągnięć w dziedzinie metabolizmu fosfolipidów w układzie nerwowym, zarówno ośrodkowym jak i obwodowym i może stać się dużą pomocą dla neurochemików, farmakologów, lekarzy oraz tych wszystkich, których interesują problemy związane z metabolizmem lipidów.

H. Dominas

Erol Başar — „Biophysical and Physiological Systems Analysis”.

Addison-Wesley Publishing Company, Reading,
Massachusetts 1976. Str. 429, 9 rozdziałów, 2 indeksy, bibliografia.

Dążenie do przekazywania wyników badań w naukach biologicznych w formie zbliżonej do przyjętych w naukach matematyczno-fizycznych czy technicznych przyczyniło się do szybkiego rozwoju biofizyki. Język, w jakim biofizyka interpretuje procesy biologiczne wymaga od współczesnego badacza gruntownego przygotowania matematycznego oraz znajomości zasad działania najnowszej aparatury badawczej. Autor omawianej książki, Dr Erol Başar studiował fizykę w Hamburgu, a po ukończeniu studiów, w latach 1965—68, doktoryzował się w tamtejszym Instytucie Fizjologii Uniwersytetu. Od 1969 r. kieruje Instytutem Biofizyki jednego z Uniwersytetów Ankar (Haceteppe Uniwrsitezi, nawiązującego do uniwersytetu założonego w 1206 r. w Kayseri [Cezarea], a refundowanego w 1967 r.).

Celem książki Dr Başara, napisanej na podstawie swych wykładów dla dyplomantów, jest próba ukazania korzyści jakie płyną z zastosowania matematycznej analizy do zjawisk biologicznych. Problem polega na dobraniu jednej metody matematycznej do analizy jednej właściwości wspólnej różnym procesom. W przypadku badań opisywanych przez Başara chodzi o rytmiczne oscylacje, które zachodzą w wielu narządach, jak na przykład w nerkach, w sercu, mięśniach gładkich i mózgu. W doświadczeniach z układem kanalików nerkowych i układem wieńcowym serca szczurów autor bada regulację przepływu krwi przez narząd pod wpływem zmian ciśnienia, w mięśniach naczyń i jelita grubego świnki morskiej rejestruje napięcie pod wpływem bodźców mechanicznych, a w mózgu kotów obserwuje interferencję spontanicznych i wywołanych bodźcami potencjałów elektrycznych. Analiza matematyczna wyników oparta na przekształceniu Fourier-Laplace'a stanowi podstawę programu komputerów połączonych z aparaturą badawczą. Pozwala to na uzyskanie charakterystyki częstotliwości oraz maksimum nasilenia drgań otrzymywanych z danego narządu w czasie doświadczenia. Autor przedstawia tylko podstawowe wzory zakładając, że zainteresowany czytelnik albo ma dostateczne przygotowanie albo może się zapoznać z podaną literaturą przedmiotu.

Autor zdaje sobie w pełni sprawę, że procesy biologiczne przebiegają w sposób niezmiernie skomplikowany, że bierze w nich udział wiele zmiennych, cechuje je niestabilność, a wynik rzadko odpowiada funkcji liniowej. Wobec tego uważa, że biofizyk nie może traktować badanego układu jako *black box*, w którym bierze pod uwagę tylko bodziec wprowadzany do układu (*input*) i efekt otrzymywany (*output*). Proponuje koncepcję *grey box*, czyli układu, którego struktura i funkcjonowanie są w dużym stopniu znane i muszą być brane pod uwagę w analizie matematycznej.

Książka Dr Başara ma dziewięć rozdziałów, każdy opatrzony odpowiednią bibliografią. Trzy pierwsze wyjaśniają zasady proponowanej analizy; rozdział czwarty i piąty traktują o analizie zjawisk w nerkach, układzie wieńcowym i mięśniach gładkich, której wyniki prowadzą do umocnienia teorii o myogennym charakterze regulacji ciśnienia krwi w kapillarach. Rozdział szósty omawia bardzo ważne w analizie matematycznej zagadnienie nieliniowego przebiegu procesów biologicznych. Rozdział siódmy przynosi interesujące neurobiologów analizy aktywności elektrycznej mózgu. W rozdziałach ósmym i dziewiątym autor podsumowuje wyniki otrzymanych analiz i w ich świetle jeszcze raz dyskutuje możliwości zastosowania analizy matematycznej do badań biologicznych.

Tego typu podejście analityczne znajduje zastosowanie przede wszystkim w nau-

kach fizjologicznych, ale wydaje się, że na przykład oscylacje zachodzące w niektórych procesach biochemicznych mogłyby być przedmiotem podobnej analizy o ile przebiegają z dostateczną częstotliwością i o ile uda się zarejestrować ich przebieg w czasie. Oczywiście konieczne jest urządzenie komputerowe oraz współpraca z matematykiem zainteresowanym tego typu analizami.

M. Dydńska

SPIS TREŚCI

M. Piechowska—Jednołańcuchowe frakcje dwułańcuchowego DNA . . .	139
K. Kańska-Brudzyńska, Z. Walter—Struktura chromatyny . . .	157
A. Niedźwiedzka, A. Kaliński—Rola histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny	175
E. M. Rakowicz-Szulczyńska—Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genu	189
J. J. Bujarski, S. Paszyc—Strukturalne tionukleozydy w badaniach struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych	211
B. Czartoryska—Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisacharydów	229
B. Suszka, J. Chmiel—Wyodrębnianie i oznaczenie glikoaminoglikanów tkanki łącznej	267
Sprawozdanie—VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Rzym, 27.VIII.—3.IX.1976 (J. Stawiński)	279
Recenzje	283

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1977

ARTICLES IN POLISH

Volume 23

Number 2

M. Piechowska—Single-Stranded Fractions of Double Stranded DNA (Dept. Mol. Biol., Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	139
K. Kańska-Brudzyńska, Z. Walter—Chromatin Structure (Dept. Biochem., Inst. Biochem. Biophys., University of Łódź, Łódź)	157
A. Niedźwiedzka, A. Kaliński—Role of Histone H1 in the Structure and Function of Chromatin (Int. Biochem. University of Warsaw, Warszawa)	175
E. M. Rakowicz-Szulczyńska—Non-histone Chromatin Proteins as Regulators of Gene expression (Dept. Human Genetics, Pol. Acad. Sci., Poznań)	189
J. J. Bujarski, S. Paszyc—Structural Thionucleosides in Investigation of Structure and Function of Transfer Ribonucleic Acids (Inst. Chem., University of Poznań, Poznań)	211
B. Czartoryska—Lysosomal Glycosidases in Heteropolysaccharide Catabolism (Dept. Human Genetics, Psychoneurological Inst., Warszawa)	229
B. Suszka, J. Chmiel—Isolation and Determination of Connective Tissue Glycosaminoglycans (Dept. Biochem., Inst. Anal. Chem., Medical School, Poznań)	267
Meeting Reports	279
Book reviews	283

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

Cena zł 20.—

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

półrocznie zł 40.—

rocznie zł 80.—

Prenumeratę krajową przyjmują Oddziały RSW „Prasa—Książka—Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na styczeń, I-szy kwartał, I-sze półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 miesiąca poprzedzającego okres prenumeraty na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki społecznej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa — Książka — Ruch”. Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW oraz prenumeratorzy indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter) 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona—Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P. O. Box 1001, Poland. Please send payments to the account of Ars Polona—Ruch in Bank Handlowy S. A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

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 autor(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) in *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P.N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58; Academic Press, London

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk 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 obejmując wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

SPIS TREŚCI

M. Piechowska—Jednołańcuchowe frakcje dwułańcuchowego DNA . . .	139
K. Kańska-Brudzyńska, Z. Walter—Struktura chromatyny . . .	157
A. Niedźwiedzka, A. Kaliński—Rola histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny	175
E. M. Rakowicz-Szulczyńska—Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów	189
J. J. Bujarski, S. Paszyc—Strukturalne tionukleozydy w badaniach struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych	211
B. Czartoryska—Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisacharydów	229
B. Suszka, J. Chmiel—Wyodrębnianie i oznaczenie glikoaminoglikanów tkanki łącznej	267
Sprawozdanie—VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Rzym, 27.VIII—3.IX.1976 (J. Stawiński)	279
Recenzje	283