

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 26(4)  
(515-650) (1980)

1980

tom 26 nr 4

PL ISSN 0032-5422



*Pw*

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

**Forma maszynopisu:** maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1980 TOM 26 ZESZYT 4

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 26(4)  
(5 15-650) (1980)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>



## RADA REDAKCYJNA

*Przewodniczący:* K. Zakrzewski (Warszawa)

*Zastępca:* W. Ardel (Warszawa)

*Sekretarz:* I. Szumiel (Warszawa)

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

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

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

W opracowaniu numeru brał udział A. Wieraszko

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1979

Nakład 2.340

Oddano do składania 23.VII.1980 r.

Ark. wyd. 11,5, ark. druk. 8,5

Podpisano do druku w lutym 1981 r.

Pap. offs. kl. V 71 g. 70×100

Druk ukończono w lutym 1981 r.

Zam. 999/12/80

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

HANNA STRZELECKA-GOŁASZEWSKA \*, URSZULA PIWOWAR \*\*

## Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych

### Polymorphism of Myosin in Muscle and Nonmuscle cells

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Wspólne cechy budowy cząsteczkowej i właściwości miozyny z różnych źródeł
- III. Funkcjonalne i strukturalne zróżnicowanie miozyny z szybkich i wolnych mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego kręgowców
  - III—1. Klasyfikacja włókien mięśniowych
  - III—2. Właściwości enzymatyczne miozyny izolowanej z mięśni różnego typu
  - III—3. Podjednostkowy skład miozyny izolowanej z mięśni różnego typu
  - III—4. Funkcjonalne i strukturalne zróżnicowanie lekkich łańcuchów miozyny
    - III—4.1. Rola „alkalicznych lekkich łańcuchów”
    - III—4.2. Rola „lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji”
  - III—5. Strukturalne zróżnicowanie ciężkich łańcuchów miozyny izolowanej z mięśni różnego typu
- IV. Izoenzymy miozyny występujące w pojedynczych mięśniach o jednorodnej budowie
- V. Miozyna mięśni gładkich kręgowców
- VI. Polimorficzne formy miozyny w homologicznych mięśniach różnych kręgowców
- VII. Miozyna mięśni bezkręgowców
- VIII. Miozyna w systemach niemięśniowych

#### Contents

- I. Introduction
- II. Common features of the molecular structure and properties of myosin from different sources
- III. Functional and structural differences between myosins from fast and slow skeletal muscle and cardiac muscle of vertebrates
  - III—1. Classification of muscle fibers
  - III—2. Enzymatic properties of myosin isolated from various types of muscle
  - III—3. Subunit structure of myosin isolated from various types of muscle

\* Doc. dr hab., \*\* Mgr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

- III—4. Functional and structural differences between myosin light chains
- III—4.1. The role of „alkali light chains”
- III—4.2. The role of „phosphorylatable light chains”
- III—5. Structural differences between heavy chains of myosin isolated from various types of muscle
- IV. Isoenzymes of myosin in single homogeneous muscles
- V. Vertebrate smooth-muscle myosin
- VI. Polymorphism of myosin from homogeneous muscles of various vertebrates
- VII. Myosin from non-vertebrate muscle
- VIII. Myosin in nonmuscle systems

## I. Wprowadzenie

Miozyna spełnia w mięśniu podwójną rolę:

— jest białkiem strukturalnym stanowiącym główny składnik tzw. grubych filamentów, które wraz z filamentami cienkimi, zbudowanymi z aktyny i białek regulujących, tworzą elementy kurczliwe komórki mięśniowej — miofibryle;

— jest enzymem katalizującym hydrolizę ATP; aktywatorem miozynowej ATPazy jest aktyna, a energia uwalniana w wyniku hydrolizy ATP zużywana jest na wytworzenie napięcia lub przesuwanie się filamentów grubych i cienkich wzdłuż siebie, co prowadzi do skracania się mięśnia podczas skurczu.

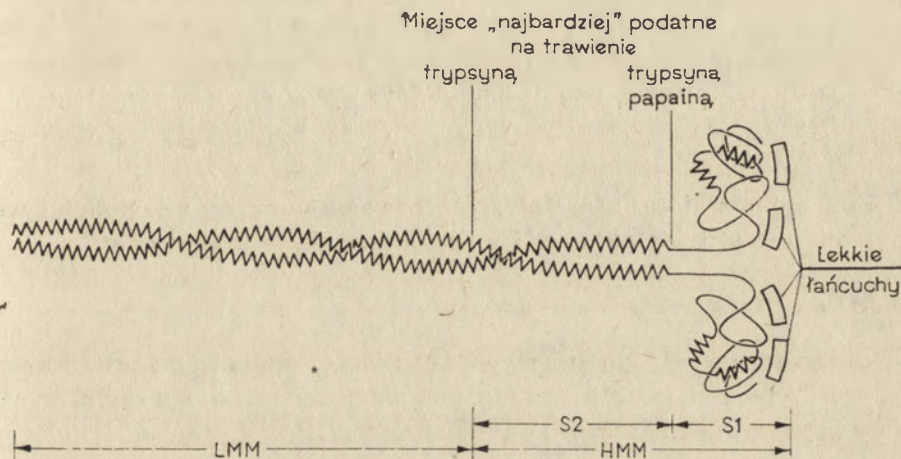
Badania ostatnich kilkunastu lat wykazały, że białko o budowie i właściwościach podobnych do miozyny mięśniowej występuje również we wszystkich badanych dotąd komórkach niemięśniowych. Równoczesna obecność aktyny pozwala przypuszczać, że reagowanie miozyny z aktyną jest podstawą wszelkiej ruchliwości komórkowej. Zarówno w układach niemięśniowych, jak i w niektórych typach mięśni, które nie zawierają troponiny — białka regulującego wiążącego  $\text{Ca}^{2+}$  — miozyna bierze ponadto bezpośredni udział w regulacji skurczu, t.j. regulacji reagowania ze sobą filamentów miozynowych i aktynowych w zależności od stężenia wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$ .

W 1967 r. Barany (1) zaobserwował, że ATPazowa aktywność akto-miozyny, utworzonej z miozyny i aktyny osobno wyizolowanej z różnych mięśni szkieletowych kręgowców, zależy od typu mięśnia z którego otrzymano miozynę oraz wykazał ścisłą korelację między szybkością izometrycznego skurczu różnych mięśni a aktywnością ATPazową wyizolowanej z nich miozyny. Badania zmierzające do wyjaśnienia molekularnego podłoża różnic w aktywności ATPazowej miozyny z różnych typów mięśni i homologicznych mięśni różnych zwierząt — w ostatnich latach rozszerzone na miozynę z komórek niemięśniowych — ujawniły ogromną różnorodność form tego białka.



## II. Wspólne cechy budowy cząsteczkowej i właściwości miozyny z różnego materiału komórkowego

Poza nielicznymi wyjątkami (patrz rozdz. VIII), cząsteczka miozyny zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych o masach cząsteczkowych ok. 200 000 — tzw. ciężkich łańcuchów i czterech tzw. lekkich łańcuchów o masach cząsteczkowych w granicach od kilkunastu do dwudziestu kilku tysięcy (2—4). Cząsteczka ma kształt pałeczki zakończonej dwiema główkami (5, 6). Jak pokazano na Ryc. 1, część pałeczkowatą tworzą



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki miozyny z zaznaczeniem fragmentów najbardziej podatnych na działanie enzymów proteolitycznych.

oba ciężkie łańcuchy, na tym odcinku posiadające strukturę  $\alpha$ -heliksu i skręcone wokół siebie w superheliks. Każdy z nich przechodzi w jedną z dwóch główek o mniej uporządkowanej strukturze drugorzędowej (5), gdzie łączy się wiązaniami niekowalencyjnymi z dwoma lekkimi łańcuchami (7, 8). Stosując kontrolowane trawienie trypsyną lub chymotrypsyną można podzielić cząsteczkę miozyny na dwa fragmenty: tzw. lekką meromiozynę (LMM) o masie cząsteczkowej 150 000, będącą fragmentem pałeczkowatej części cząsteczki, oraz ciężką meromiozynę (HMM) o masie 350 000, obejmującą obie główki i krótki odcinek pałeczki (6, 9—12). Dalšie trawienie HMM trypsyną lub papainą prowadzi do podzielenia jej cząsteczki na poszczególne główki, tzw. subfragmenty S-1, o masie cząsteczkowej ok. 120 000, oraz tzw. subfragment S-2, o masie ok. 60 000, będący fragmentem pałeczkowatej części cząsteczki (6, 13). Badania właściwości tych fragmentów cząsteczki po ich rozdzieleniu wykazały, że każda główka miozyny zawiera centrum enzymatyczne hydrolizy ATP (14—17) oraz miejsce wiązania aktyny (17, 18). Ta część cząsteczki, z której w wyniku trawienia powstaje LMM, dzięki tendencji do bocznej agregacji w roz-

tworach o niskiej sile jonowej bierze bezpośredni udział w łączeniu się cząsteczek miozyny w filamenty (19). Budowę i powstawanie filamentów *in vitro* oraz ich reagowanie z filamentami aktywnymi podczas skurczu omówiono we wcześniejszych artykułach w *Postęпах Biochemii* (20, 21).

Silnymi aktywatorami katalizowanej przez miozynę hydrolizy ATP do ADP i nieorganicznego fosforanu są jony  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , których maksimum aktywowującego działania przypada jednak na stężenia znacznie wyższe od fizjologicznych (22—28). Fizjologicznym substratem miozyny jest kompleks  $\text{MgATP}$ , hydrolizowany przez samą miozynę z bardzo niską szybkością. W obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$  ATPaza miozynowa jest jednak aktywowana przez aktynę; w warunkach maksymalnej aktywacji szybkość hydrolizy wzrasta około 200-krotnie (29).

### III. Funkcjonalne i strukturalne zróżnicowanie miozyny z szybkich i wolnych mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego kręgowców

#### III—1. Klasyfikacja włókien mięśniowych

Większość mięśni szkieletowych kręgowców zbudowana jest z komórek, czyli włókien, zróżnicowanych pod względem fizjologicznym, morfologicznym, histochemicznym i funkcjonalnym. Pod względem fizjologicznym rozróżnia się włókna fazowe, z których zbudowana jest większość mięśni szkieletowych kręgowców, oraz toniczne, które u ssaków i ptaków zachowały się tylko w niektórych specyficznych mięśniach, występują natomiast powszechnie w mięśniach szkieletowych niższych kręgowców (30).

Charakterystyczną cechą włókien fazowych jest to, że do każdego z nich dochodzi pojedyncze zakończenie nerwowe i że pojedynczy impuls nerwowy wywołuje potencjał czynnościowy, który rozchodzi się szybko po całym włóknie powodując odpowiedź skurczową. Do włókien tonicznych natomiast dochodzą liczne zakończenia nerwowe, a ich odpowiedź skurczowa jest wynikiem sumowania się lokalnych potencjałów wytworzonych w poszczególnych zakończeniach nerwowych. Włókna toniczne kurczą się lub wytwarzają napięcie znacznie wolniej niż włókna fazowe (31—33).

W zależności od przebiegu pojedynczego skurczu wyróżnia się włókna fazowe szybkie i wolne. Histochemiczny test określający aktywność ATPazową miozyny w pH 9.4 w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  pozwolił wykazać intensywną reakcję włókien szybkich i słabą wolnych (34). Inne testy histochemiczne oraz badania morfologiczne i immunofluorescencyjne ujawniły dalsze zróżnicowanie włókien fazowych (35—40). Przyjmując jako kryterium typ metabolizmu komórkowego, w obrębie włókien fazowych szybkich można wyróżnić co najmniej dwa ich rodzaje:



— włókna o wysokiej aktywności enzymów glikolitycznych, a stosunkowo niskiej zawartości mitochondriów i niskiej aktywności enzymów oksydacyjnych; włókna te, określone wg. Barnarda i współprac. (41) nazwą fazowe-szybkie-białe, przystosowane są do krótkotrwałej intensywnej aktywności skurczowej;

— włókna o niższej aktywności enzymów glikolitycznych, a wysokiej enzymów oksydacyjnych, bogate w mitochondria; włókna te, określane jako fazowe-szybkie-czerwone, są bardziej odporne na zmęczenie niż włókna białe.

W systemie klasyfikacji zaproponowanym przez Barnarda i współprac. włókna fazowe wolne stanowią trzeci rodzaj, określony nazwą fazowe-wolne-pośrednie; charakteryzuje je niska aktywność enzymów glikolitycznych, wysoka zawartość mitochondriów i wysoka aktywność enzymów oksydacyjnych, co jest wyrazem ich przystosowania do długotrwałej pracy w warunkach tlenowych.

### III—2. Właściwości enzymatyczne miozyny izolowanej z mięśni różnego typu

W badaniach biochemicznego różnicowania włókien mięśniowych, wymagających zazwyczaj dużej ilości materiału, stosowane są mięśnie homogenne lub zbudowane w przeważającej mierze z jednego typu włókien — zawierające blisko 100% włókien fazowych szybkich — mięśnie *psoas* (42, 43) i *posterior latissimus dorsi* ssaków (44) oraz *posterior latissimus dorsi* (40) lub *pectoralis major* ptaków (32, 45). Najczęściej stosowanym modelem mięśnia wolnego jest *soleus* ssaków, zbudowany w 80—100% z włókien fazowych wolnych (37, 46—50), lub *anterior latissimus dorsi* ptaków, zbudowany wyłącznie z włókien wolnych-tonicznych (39, 40, 51). Porównując specyficzne aktywności ATPazowe preparatów miozyny z mięśni fazowych szybkich i wolnych oraz z mięśni tonicznych wolnych uzyskiwano wartości wyższe w przypadku miozyny z mięśni szybkich, od 1,5 do 2,5-krotnie w obecności jonów  $K^+$ , a 2 do 5-krotnie w obecności  $Ca^{2+}$  jako aktywatora (Tabela 1). Podobne różnice obserwowano porównując specyficzne aktywności miozyny z mięśni fazowych szybkich i wolnych w obecności jonów  $Mg^{2+}$  i aktyny w niskiej sile jonowej (Tabela 2). Nie stwierdzono różnicy w enzymatycznej aktywności preparatów z mięśni fazowych-szybkich białych i czerwonych (62). Aktywność ATPazowa miozyny z mięśnia sercowego jest zbliżona do aktywności miozyny z mięśni szkieletowych wolnych. Należy jednak zaznaczyć, że prawidłowości te dotyczą jedynie mięśni zwierząt tego samego gatunku. Zarówno bowiem szybkości skurczu homologicznych mięśni zwierząt różnych gatunków (63, 64), jak i aktywności wyizolowanej z nich miozyny różnią się (1, 59, 65—68) wykazując, z pewnymi wyjątkami, odwrotną proporcjonalność do rozmiarów ciała dorosłych osobników danego gatunku. Jest to wyraz adaptacji do różnej aktywności lokomotorycznej

Tabela 1

Aktywność ATPazowa preparatów miozyny z szybkich i wolnych mięśni szkieletowych i z mięśnia sercowego

Zwierzę	Mięsień	Aktywność ATPazowa ( $\mu\text{mole P/mg miozyny/min}$ )										Poz. piśm.
		KCl 0,5 M + EDTA	KCl 1 M + EDTA	Ca <sup>2+</sup> + 0,025M KCl	Ca <sup>2+</sup> + 0,05M KCl	Ca <sup>2+</sup> + 0,1M KCl	Ca <sup>2+</sup> + 0,25M KCl	Ca <sup>2+</sup> + 0,5M KCl				
Królik	Szybkie: EDL <i>Gastrocnemius</i>	1,12										
	Wolne: <i>Soleus</i> <i>Crureus</i>	1,00 0,52 0,44										
Królik	Szybkie: VL + Add M	1,17—2,94*		0,59—1,06*							0,35 0,31 0,15 0,11	52
	Wolne: Sol + St + Cr + Int	0,49—1,48*		0,18—0,24*								
Królik	Szybkie (grzbiet, kończyny)					0,66 0,17 0,14						53
	Wolne: Sol + St + MTD + TB Sercowy											
Królik	Szybkie: PLD + QF		1,85									54
	Wolne: Sol + Itb Sercowy		1,26 0,60									
Królik	Szybkie: PLD	1,91—2,34*										55
	Sercowy	0,51—0,74*			0,82—1,80*						0,36—0,60* 0,26—0,37*	
Kot	Szybkie: FHL										0,36 0,16 0,15	1
	Wolny: <i>Crureus</i> <i>Soleus</i>				0,50—0,73*							
Kot	Szybkie: FHL + BF	1,99										57
	Wolny: <i>Soleus</i>	1,04			0,86 0,22							
Szczur	Szybkie: EDL	1,19										58
	Wolny: <i>Soleus</i>	0,57			1,04 0,46							
Świnia morską	Wolny: <i>Soleus</i>											59
	Sercowy										0,29 0,27	
Królik	Szybkie (grzbiet, kończyny)											59
	Sercowy										0,66 0,09	
Kura	Szybkie: PLD											60
	Wolny: ALD Sercowy										1,05 0,21 0,35	

Aktywności ATPazowe oznaczano w temp. 24°—27°C, przy pH 6,8—7,8, w obecności 0,5—10mM EDTA (K<sup>+</sup>—ATPaza) lub 1—10 mM CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>—ATPaza). Skróty nazw mięśni. Fazowe-szybkie: EDL — *extensor digitorum longus*; VL — *vastus lateralis*; Add M — *adductor magnus*; PLD — *posterior latissimus dorsi*; QF — *quadriceps femoris*; FHL — *flexor hallucis longus*; BF — *biceps femoris*; Fazowe wolne: Sol — *soleus*; St — *semitendinosus*; Cr — *crureus*; Int — *intertransversarius*; MTD — *multifidus dorsi*; TB — *triceps brachii*; Itb — *ischiotibialis*. Toniczny wolny: ALD kury.

\* Zakresy wartości uzyskanych dla preparatów miozyny oczyszczonej różnymi metodami.

Tabela 2

Aktywność ATPazowa preparatów miozyny z mięśni szybkich i wolnych szkieletowych i z mięśnia sercowego w obecności aktyny z mięśni szkieletowych

Zwierzę	Mięsień	Aktywność ATPazowa ( $\mu$ mole P/mg miozyny/min)	Warunki	Poz. piśm.
Królik	Szybki: EDL	0,28	25°C, pH 7,0, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 35 mM KCl, 1 mM ATP, 0,4 mg aktyny/ /mg miozyny	52
	<i>Gastrocnemius</i>	0,22		
	Wolny: <i>Soleus</i>	0,12		
	<i>Crureus</i>	0,09		
Kot	Szybki: FHL	0,56	25°C, pH 7,4, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 30 mM KCl, 1 mM ATP, 0,4 mg aktyny/ /mg miozyny	1
	Wolny: <i>Crureus</i>	0,24		
	<i>Soleus</i>	0,17		
Szczur	Szybki: EDL	1,17	35°C, pH 7,4, 6 mM MgSO <sub>4</sub> , 30 mM KCl, 3 mM ATP, 0,5 mg aktyny/ /mg miozyny	58
	Wolny: <i>Soleus</i>	0,50		
Królik	Szkieletowe mieszane	0,46	25°C, pH 7,0, 1 mM MgSO <sub>4</sub> , 35 mM KCl, 1 mM ATP, 0,4 mg aktyny/ /mg miozyny	61
	Sercowy	0,09		

zwierzęcia, dzięki której zwierzęta o różnych rozmiarach ciała mogą poruszać się z podobną szybkością (35, 64).

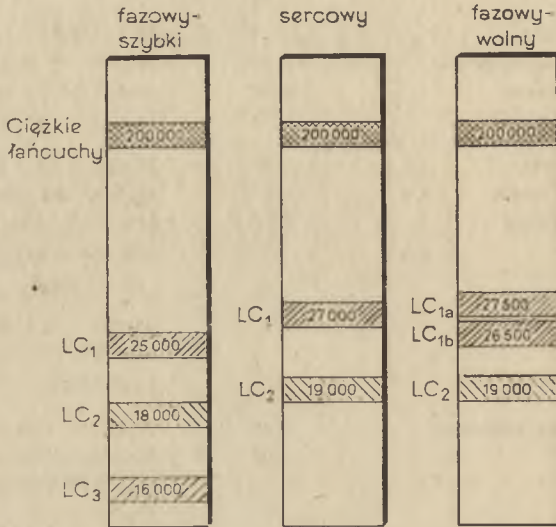
Miozyna izolowana z mięśni szybkich jest stosunkowo stabilna w środowisku alkalicznym (pH 10), podczas gdy w środowisku lekko kwaśnym (pH 4) ulega szybko inaktywacji; preparaty z mięśni fazowych-wolnych i z serca są natomiast bardziej stabilne w środowisku kwaśnym niż w alkalicznym (53, 57, 61, 69). Zaobserwowano przy tym ciekawą korelację między stopniem stabilności miozyny sercowej w środowisku alkalicznym a rozmiarami ciała dorosłych osobników badanych gatunków (66, 68), podobnie jak to ma miejsce w odniesieniu do specyficznej aktywności ATPazowej oznaczanej w środowisku o pH bliskim obojętnego. Wynika stąd ogólna prawidłowość, sprawdzająca się również przy porównaniu miozyny z mięśni szybkich i wolnych: im wyższa specyficzna aktywność rodzimej miozyny tym mniejsza jej wrażliwość na działanie jonów OH<sup>-</sup> (66).

### III—3. Podjednostkowy skład miozyny izolowanej z mięśni różnego typu

Badania zmierzające do wyjaśnienia strukturalnego podłoża różnic właściwości enzymatycznych miozyny z różnych typów mięśni rozwinęły się na szerszą skalę po wprowadzeniu metody elektroforezy w żelu polia-



kryloamidowym w obecności SDS (70). Dopiero przy użyciu tej techniki udało się dokładniej określić czwartorzędową strukturę cząsteczki miozyny, a przede wszystkim charakter i stechiometrię jej lekkich łańcuchów oraz wykazać zróżnicowanie tych łańcuchów w zależności od typu mięśnia (Ryc. 2). W preparatach miozyny otrzymanych z mięśni szybkich znale-



Ryc. 2. Schemat rozdziału podjednostek miozyny z różnych mięśni królika w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS.

ziono trzy rodzaje lekkich łańcuchów, które nazwano LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub> i LC<sub>3</sub> (skrót od angielskiego terminu „light chain”), a których ciężary cząsteczkowe obliczone na podstawie ruchliwości elektroforetycznej (70) w przypadku miozyny z mięśni kury (71) i królika (72, 73) wynoszą odpowiednio 25 000, 18 000 i 16 000. Jakkolwiek w wyniku obliczeń na podstawie analizy aminokwasowej wartości określone z ruchliwości elektroforetycznej uległy pewnej korekcji [w przypadku miozyny z różnych mięśni szybkich królika uzyskano wartości 20 700, 19 000 i 16 500 (8, 74), a w przypadku miozyny z mięśnia *pectoralis* kury — 20 000, 18 500 i 16 500 (75)] przytoczenie wyników uzyskanych tą metodą uzasadnione jest tym, że w omawianych dalej badaniach porównawczych ograniczono się przeważnie do stosowania właśnie metody elektroforetycznej. Stechiometria lekkich łańcuchów, oznaczona metodą densytometrii wybarwionych prążków białkowych w żelu poliakryloamidowym (71, 76) i metodą rozcieńczenia izotopowego (8) wynosi 2 mole LC<sub>2</sub> i w sumie 2 mole LC<sub>1</sub> + LC<sub>3</sub> na mol miozyny. Natomiast w preparatach miozyny z tonicznego-wolnego *anterior latissimus dorsi* kury (71), fazowych-wolnych *soleus*, *semitendinosus*, *cru-reus* i *intertransversarius* królika (72, 73, 76, 77) oraz z mięśnia sercowego różnych zwierząt (71—73, 78) znaleziono tylko dwa rodzaje lekkich łańcu-

chów, o ciężarach cząsteczkowych 27 000 ( $LC_1$ ) i 19 000 ( $LC_2$ ), oba w proporcji 2 mole na mol miozyny. Również w tym przypadku wartość ciężaru cząsteczkowego  $LC_1$  obliczonego z ruchliwości elektroforetycznej okazała się znacznie zawyżona [np. w przypadku  $LC_1$  miozyny sercowej na podstawie składu aminokwasowego uzyskano wartość 21 000 (79, 80)], prawdopodobnie z powodu dużej zawartości aminokwasów zasadowych i proliny na pewnym odcinku tego łańcucha polipeptydowego (74). W przypadku miozyny z mięśni fazowych-wolnych królika zwrócono uwagę na to, że jej łańcuchy  $LC_1$  migrują w żelu poliakryloamidowym często w postaci podwójnego prążka. Analiza chemiczna łańcuchów  $LC_1$  wyizolowanych z miozyny z mięśnia *soleus* królika i kota potwierdziła obecność dwóch form,  $LC_{1a}$  i  $LC_{1b}$ , o bardzo podobnej, ale nie identycznej sekwencji aminokwasowej (77). Doniesienia o heterogenności  $LC_1$  miozyny z serca psa, ujawnionej metodą dwukierunkowej elektroforezy w obecności mocznika (81, 82), nie znalazły natomiast potwierdzenia w analizie chemicznej  $LC_1$  miozyny z serca wołu (80).

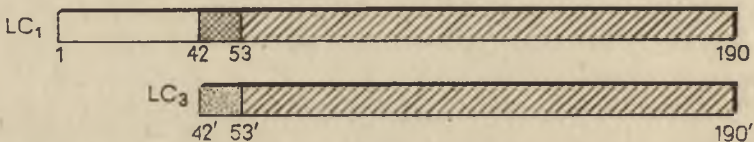
### III—4. Funkcjonalne i strukturalne różnicowanie lekkich łańcuchów miozyny

Jednym ze sposobów badania funkcjonalnej roli lekkich łańcuchów, na jaką wskazywało ich różnicowanie w zależności od typu mięśnia, było śledzenie wpływu krzyżowej reinnerwacji mięśni fazowych szybkich i wolnych na syntezę lekkich łańcuchów. Zmiana typu unerwienia powoduje przekształcenie fizjologicznych właściwości mięśnia (83) oraz odpowiednią zmianę aktywności ATPazowej (58, 84, 85) i charakteru lekkich łańcuchów miozyny (86, 87); zauważono jednak również pewne zmiany w strukturze ciężkich łańcuchów (88, 89). Podobnie długotrwała elektryczna stymulacja mięśni szybkich z niską częstotliwością, naśladująca unerwienie mięśni wolnych, powoduje po pewnym czasie całkowite przekształcenie tak fizjologicznych parametrów skurczu, jak i enzymatycznej aktywności oraz obrazu elektroforetycznego lekkich łańcuchów miozyny na charakterystyczne dla mięśnia wolnego (90, 91). Również i w tym wypadku stwierdzono także zmiany w strukturze ciężkich łańcuchów (88, 90—92), tak więc ten typ doświadczeń nie przyniósł odpowiedzi na pytanie, które z łańcuchów kontrolują poziom aktywności miozyny.

Innym podejściem do tego zagadnienia było badanie zmian właściwości miozyny po oddzieleniu jej lekkich łańcuchów. Badając miozynę z mięśni fazowych-szybkich królika stwierdzono, że DTNB — odczynnik reagujący z grupami tiolowymi — w obecności EDTA selektywnie usuwa łańcuchy  $LC_2$  nie powodując utraty aktywności ATPazowej miozyny (8, 93, 94). Pozbawienie miozyny jej łańcuchów  $LC_1$  i  $LC_3$  prowadzi natomiast do utraty aktywności ATPazowej (95—98). Ponieważ po raz pierwszy łańcuchy  $LC_1$  i  $LC_3$  oddzielono od reszty cząsteczki w środowisku o pH 11



(99—102), otrzymały one wspólną nazwę „łańcuchów alkalicznych” (8). Ciężkie i lekkie łańcuchy można również rozdzielić w podwyższonej temperaturze (98) lub stężonych roztworach niektórych soli (103); w celach preparatywnych stosuje się 5 M chlorowodorek guanidyny (95). Oznaczenie sekwencji aminokwasowej obu alkalicznych łańcuchów miozyny z mięśni szkieletowych szybkich królika (74) wykazało wyjątkowo wysoki stopień ich strukturalnej homologii (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Schemat budowy łańcuchów LC<sub>1</sub> i LC<sub>3</sub> miozyny z mięśni fazowych-szybkich królika (wg 74). Białym kolorem zaznaczono 41-aminokwasowy N-końcowy fragment LC<sub>1</sub>, którego brak w LC<sub>3</sub>. Regiony zakreskowane symbolizują C-końcowy fragment obejmujący 141 aminokwasów o identycznej sekwencji w obu łańcuchach. Jedyne na odcinku obejmującym 8 aminokwasów, który w LC<sub>3</sub> jest N-końcowym fragmentem, a w LC<sub>1</sub> znajduje się pomiędzy 42 a 53 resztą aminokwasową, znaleziono w sumie 5 zastąpień aminokwasowych.

Jakkolwiek DTNB nie powoduje oddzielenia żadnego z lekkich łańcuchów miozyny z mięśni wolnych (104) lub z serca (78), ostatnio udało się częściowo (105) lub całkowicie (106) pozbawić miozynę sercową jej łańcucha LC<sub>2</sub> innymi metodami i stwierdzić, że nie powoduje to spadku ATPazowej aktywności. Również subfragment S1 miozyny sercowej, pozbawiony łańcucha LC<sub>2</sub> wskutek strawienia podczas preparatyki (107), posiada specyficzną aktywność porównywalną z aktywnością rodzimej miozyny. Porównanie sekwencji aminokwasowej wybranych peptydów otrzymanych przez fragmentację lekkich łańcuchów bromocyjanem, a następnie trawienie uzyskanych fragmentów trypsyną dostarczyło dowodów strukturalnej homologii łańcuchów LC<sub>2</sub> miozyny z wszystkich omawianych w tym rozdziale typów mięśni oraz homologii łańcuchów LC<sub>1</sub> miozyny z mięśni wolnych oraz sercowego i łańcuchów alkalicznych miozyny z mięśni szybkich. Przeprowadzanie tego rodzaju porównań ułatwia pełna już znajomość sekwencji aminokwasowej zarówno łańcuchów alkalicznych (74), jak i łańcucha LC<sub>2</sub> (108, 109) miozyny z mięśni szybkich królika. M.in. zwrócono uwagę na identyczność sekwencji aminokwasowej wokół pojedynczej reszty cysteinowej w łańcuchach alkalicznych miozyny z mięśni szybkich królika, jednej z dwóch reszt cysteinowych w łańcuchu LC<sub>1b</sub> z fazowego-wolnego mięśnia *soleus* królika (77) i jednej z trzech występujących w LC<sub>1b</sub> z mięśnia *soleus* kota (77) oraz w LC<sub>1</sub> z mięśnia sercowego wołu i owcy (78). Oznaczenie sekwencji aminokwasowej peptydów obejmujących większą część cząsteczki LC<sub>1</sub> z mięśnia sercowego wołu ujawniło identyczne rozmieszczenie apolarnych reszt



aminokwasowych jak w LC<sub>1</sub> miozyny z mięśni szybkich królika, jakkolwiek oprócz różnej liczby reszt cysteiny stwierdzono szereg innych zastąpień reszt aminokwasowych (80). Z kolei częściowe oznaczenie sekwencji aminokwasowej LC<sub>2</sub> miozyny z serca wołu (110) wykazało daleko idące jej podobieństwo do sekwencji LC<sub>2</sub> z mięśni szybkich królika. Wspólną właściwością łańcuchów LC<sub>2</sub> miozyny szybkich i wolnych mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego jest enzymatyczna fosforylacja jednej z ich reszt serynowych, obserwowana zarówno *in vitro* w obecności mięśniowych kinaz białkowych, katalizujących przeniesienie  $\gamma$ -fosforanowej grupy z ATP na miozynę (111—116), jak i *in vivo* (82, 117—119). Na tej podstawie dla łańcuchów tych zaproponowano nazwę „łańcuchy ulegające fosforylacji”, w skrócie P-LC (114). Inną charakterystyczną właściwością łańcuchów P-LC jest wiązanie jonów Ca<sup>2+</sup> (105, 120—124) oraz zdolność zastępowania jednego z lekkich łańcuchów miozyny mięczaków w jego funkcji regulatora reagowania miozyny z aktyną w zależności od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> (patrz rozdz. VII) (125—127). Przytoczone obserwacje upoważniają do wniosku, że w miozynie ze wszystkich omawianych w tym rozdziale typów mięśni można wyróżnić dwie klasy lekkich łańcuchów: „łańcuchy alkaliczne” i „łańcuchy ulegające fosforylacji”, spełniające w cząsteczce odrębne funkcje.

### III—4.1. Rola „alkalicznych lekkich łańcuchów”

W badaniach nad ewentualnym udziałem „łańcuchów alkalicznych” w katalitycznej aktywności miozyny wiele uwagi poświęcono odwracalności zmian towarzyszących ich oddzieleniu od reszty cząsteczki. Badając miozynę z mięśni szybkich, po rekombinacji rozdzielonych łańcuchów udało się jednak tylko częściowo odzyskać aktywność ATPazową: w ok. 30 (96), 50 (96a) i 70% (97). Analogiczne doświadczenia z hybrydyzacją rozdzielonych ciężkich i lekkich łańcuchów miozyny z mięśni fazowych szybkich i wolnych (98, 128) wykazały, że są one wymienne. Jednakże ze względu na częściową denaturację oraz możliwość niekompletnej dysocjacji i rekombinacji łańcuchów, doświadczenia te nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, które z łańcuchów, lekkie czy ciężkie, określają poziom aktywności ATPazowej miozyny. Istotny postęp w rozwiązywaniu tego kontrowersyjnego zagadnienia osiągnęli W a g n e r i W e e d s (129), którzy zastosowali nowy sposób hybrydyzacji łańcuchów miozyny. Preparat subfragmentu S1 miozyny z mięśnia fazowego szybkiego inkubowali oni w warunkach dysocjujących (4,7 M NH<sub>4</sub>Cl) z dodanymi w nadmiarze łańcuchami LC<sub>1</sub> wyizolowanymi z miozyny z mięśni fazowych-wolnych lub sercowego, a po usunięciu NH<sub>4</sub>Cl oddzielali powstały hybryd od domieszki rodzimego subfragmentu S1 i nadmiaru lekkich łańcuchów metodą chromatografii jonowymiennej. W analogiczny sposób otrzymali hybrydy ciężkich łańcuchów subfragmentu S1 miozyny sercowej z alka-

licznymi lekkimi łańcuchami miozyny z mięśni szkieletowych. Porównanie specyficznych aktywności tego rodzaju preparatów wydaje się wskazywać, że jakkolwiek alkaliczne lekkie łańcuchy są niezbędne dla aktywności ATPazowej, nie uczestniczą one bezpośrednio w hydrolizie ATP przez samą miozynę, bowiem szybkość hydrolizy zależy wyłącznie od pochodzenia ciężkich łańcuchów. Natomiast ATPaza aktywowana przez aktynę okazała się w pewnym stopniu zależna również od źródła lekkich łańcuchów, co wskazuje na ich udział w reagowaniu główek miozynowych z aktyną i kontrolowaniu maksymalnej szybkości skurczu mięśnia (129). W tym miejscu wypada odnotować, że na podstawie wcześniejszych badań immunologicznych (130) kwestionowano bezpośredni udział lekkich łańcuchów zarówno w hydrolizie ATP przez samą miozynę jak i w wiązaniu aktyny. Wniosek ten oparto wówczas na obserwacji, że przeciwciała wobec alkalicznych lekkich łańcuchów, podobnie jak i przeciwciała wobec LC<sub>2</sub> miozyny z mięśni szybkich, nie hamowały ATPazowej aktywności miozyny; aktywność Mg<sup>2+</sup>-ATPazowa aktywowana przez aktynę uległa wprawdzie obniżeniu, ale efekt ten był znacznie mniejszy gdy użyto jednowartościowy fragment przeciwciała — Fab, co wskazywało na przestrzenne tylko blokowanie miejsca wiązania aktyny przez większą cząsteczkę przeciwciała (130). Nie wydaje się jednak by te wyniki wykluczały regulującą rolę lekkich łańcuchów, ponieważ efekt przeciwciała zależy od miejsca jego reagowania z cząsteczką antygeny.

### III—4.2. Rola „lekkich łańcuchów ulegających fosforylacji”

Równie liczne badania poświęcone funkcji łańcuchów zaliczanych do klasy P-LC nie doprowadziły jeszcze do jednoznacznych wniosków. Ostatnio wykazano, że miozyna z mięśni szkieletowych szybkich pozbawiona całkowicie (131) lub częściowo (132) łańcuchów LC<sub>2</sub> traci zdolność tworzenia regularnych filamentów, co wskazywałoby na rolę tych łańcuchów w stabilizacji takiej struktury cząsteczki, jaka jest konieczna dla prawidłowego upakowania cząsteczek w filamencie. Wspomniane już krótko inne specyficzne właściwości łańcuchów LC<sub>2</sub> pozwalają przypuszczać, że ten strukturalny efekt nie wyczerpuje jednak funkcji łańcuchów LC<sub>2</sub>. Obserwacja, że łańcuchy LC<sub>2</sub> miozyny mięśni szkieletowych i sercowego kręgowców mogą zastąpić „łańcuchy regulujące” miozyny mięczaków w ich funkcji uzależniania reagowania miozyny z aktyną od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> była pierwszym sygnałem możliwości udziału łańcuchów LC<sub>2</sub> w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni kręgowców. System regulacji skurczu mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego przez białka cienkiego filamentu — tropomiozynę i troponinę (133, 134) nie wyklucza dodatkowego mechanizmu regulacji za pośrednictwem miozyny. Jakkolwiek rodzima miozyna z mięśni szkieletowych kręgowców reaguje z czystą aktyną w sposób niezależny od stężenia wolnych jonów Ca<sup>2+</sup>



(133—135), badając reagowanie miozyny z mięśni szybkich królika z aktywną połączoną z tropomiozyną i troponiną wykazano, że częściowe pozabawienie miozyny jej łańcucha LC<sub>2</sub> obniża ATPazową aktywność tego systemu w obecności jonów Ca<sup>2+</sup>, a jednocześnie zwiększa stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> wymagane do uzyskania połowy maksymalnej aktywacji (136). Zmiany te były odwracalne po ponownym włączeniu do miozyny usuniętego LC<sub>2</sub>. Inni autorzy (137, 137a) po częściowym usunięciu łańcucha LC<sub>2</sub> obserwowali obniżenie aktywności aktomiozyny w nieobecności białek regulujących; badając akto-H-meromiozynę wykazano obniżenie stałej wiązania miozyny z aktyną w obecności ATP. Wobec częściowej tylko odwracalności tych zmian, przypisywanie ich pojawienia się różnicom w zawartości łańcucha LC<sub>2</sub> w miozynie nie jest jednak w pełni przekonujące. Z drugiej strony, badając miozynę sercową (106) stwierdzono, że pozabawienie jej łańcuchów LC<sub>2</sub> nie wpływa na zależność aktywacji przez aktynę od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w obecności tropomiozyny i troponiny, powoduje natomiast znaczny wzrost specyficznej aktywności ATPazowej aktomiozyny zarówno w obecności jak i nieobecności tropomiozyny i troponiny. Sugerowano zatem różną funkcjonalną rolę łańcuchów LC<sub>2</sub> w miozynie sercowej i szkieletowej (106). Wniosek ten wymaga jednak sprawdzenia w bezpośrednich badaniach porównawczych obu form miozyny.

Warunkiem udziału jakiegoś białka w mechanizmie kontroli skurczu jest odwracalne wiązanie przez nie jonów Ca<sup>2+</sup> w odpowiedzi na zmiany stężenia tych jonów w sarkoplazmie (w zakresie od 10<sup>-6</sup>M w stanie rozkurczu do ok. 10<sup>-5</sup>M w momencie aktywacji skurczu). Zdolność wiązania Ca<sup>2+</sup> z wysoką stałą powinowactwa została udokumentowana zarówno w przypadku łańcuchów LC<sub>2</sub> miozyny z mięśni szkieletowych (120—122, 135, 138), jak i z serca (105, 123, 124, 139). Dowody wpływu Ca<sup>2+</sup> na strukturę filamentów miozynowych uzyskano w badaniach fizycznych *in vitro* (122) i strukturalnych na żywym mięśniu (140, 141). Stwierdzono też zależne od Ca<sup>2+</sup> zmiany konformacji łańcuchów LC<sub>2</sub> zarówno na drodze bezpośrednich pomiarów fizycznych (120, 142, 143), jak też pośrednio, na podstawie ochronnego wpływu Ca<sup>2+</sup> (lub Mg<sup>2+</sup>) na proteolityczną degradację tych łańcuchów (144—146). Z kolei obserwacja, że wysycenie łańcuchów LC<sub>2</sub> kationem zapobiega również trawieniu fragmentu ciężkiego łańcucha łączącego w rodzimej cząsteczce subfragment S1 (głównka) z subfragmentem S2 (część pałeczkowata) może świadczyć o oddziaływaniu LC<sub>2</sub> na konformację tego regionu ciężkiego łańcucha, któremu przypisuje się rolę „zawiasu” umożliwiającego ruch główki podczas skurczu (144, 146). Wiązanie kationu przez LC<sub>2</sub> nie jest jednak specyficzne dla Ca<sup>2+</sup>, stąd przy fizjologicznym stężeniu jonów Mg<sup>2+</sup> (1mM) efektywna stała wiązania Ca<sup>2+</sup> jest stosunkowo niska, rzędu 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, zaś szybkość częściowego zastępowania związanego Mg<sup>2+</sup> przez Ca<sup>2+</sup>, jakie mogłoby zachodzić w momencie aktywacji skurczu, okazała się znacznie niższa od szybkości skurczu (146a). Dane te skłaniają do traktowania z re-



zerwą atrakcyjnej hipotezy udziału łańcuchów  $LC_2$  w zależnej od  $Ca^{2+}$  kontroli orientacji przestrzennej główek miozynowych (120, 122, 142, 144). Nie jest wykluczone, że rola związanego kationu (zarówno  $Ca^{2+}$  jak  $Mg^{2+}$ ) sprowadza się wyłącznie do stabilizacji struktury łańcuchów  $LC_2$  i, być może, bezpośredniego udziału w wiązaniu  $LC_2$  z łańcuchem ciężkim, zgodnie ze stwierdzoną ostatnio możliwością oddzielenia łańcucha  $LC_2$  bez użycia DTNB, a wyłącznie działaniem EDTA — chelatora jonów dwuwartościowych (105, 147). Zapewne do rozstrzygnięcia nasuwających się obecnie wątpliwości przyczynią się przyszłe badania wzajemnej zależności między wiązaniem  $Ca^{2+}$  a fosforylacją łańcuchów  $LC_2$  — zjawiska, które również nie doczekało się jeszcze jednoznacznej interpretacji. Obecność w mięśniach szkieletowych i sercowym specyficznego enzymu: kinazy lekkich łańcuchów, której aktywność wymaga jonów  $Ca^{2+}$  w stężeniu powodującym aktywację skurczu (113, 148, 149), oraz niezależnej od  $Ca^{2+}$  fosfatazy wysoce specyficznej w stosunku do ufosforylowanych lekkich łańcuchów (114, 148, 150, 151) wskazuje na możliwość udziału fosforylacji łańcuchów  $LC_2$  w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego. Chociaż nie stwierdzono znaczącej różnicy enzymatycznych właściwości miozyny i aktomiozyny z mięśni szkieletowych (150) i mięśnia sercowego (152) w zależności od stanu ufosforylowania, na uwagę zasługuje zaobserwowany ostatnio wzrost stanu ufosforylowania miozyny podczas skurczu mięśnia szkieletowego (119, 153—155), a defosforylacja w fazie rozkurczu (153, 155). Na tej podstawie sugerowano, że to właśnie fosforylacja łańcuchów  $LC_2$ , zwiększając ujemny ładunek główek miozyny, może inicjować ruch główek w kierunku filamentów aktynowych wskutek odpychania od ujemnie naładowanego trzonu filamentu miozynowego (153). Opóźnienie defosforylacji w stosunku do rozkurczu (153, 155) wskazywałoby jednak raczej na ewentualny udział fosforylacji w tonicznym mechanizmie kontrolnym, tzn. działającym w trakcie serii skurczów, niż podczas pojedynczego skurczu (139, 155). Dotychczasowe doniesienia na temat wpływu fosforylacji na wiązanie  $Ca^{2+}$  przez łańcuchy  $LC_2$  miozyny z mięśni szkieletowych szybkich (139, 142, 143) i z mięśnia sercowego (139) są sprzeczne, zaś zbadanie odwrotnej zależności napotyka na trudności w związku z zależnością aktywności kinazy lekkich łańcuchów od stężenia  $Ca^{2+}$ .

### III—5. Strukturalne różnicowanie ciężkich łańcuchów miozyny izolowanej z mięśni różnego typu

Oprócz dobrze udokumentowanych różnic w strukturze lekkich łańcuchów, zebrano sporo dowodów różnicowania ciężkich łańcuchów miozyny z mięśni różnego typu. O specyficzności tkankowej tych łańcuchów świadczą ich właściwości immunologiczne (156, 157). W miozynie

z mięśni fazowych-wolnych (158) i z serca (158, 159) brak jest pojedynczej reszty 3-metylohistydy, występującej w ciężkim łańcuchu miozyny z mięśni szybkich (160—162). O różnicach w sekwencji aminokwasowej świadczy większa podatność na trawienie enzymami proteolitycznymi ciężkich łańcuchów miozyny z mięśni szybkich w porównaniu z preparatami z mięśni fazowych-wolnych i sercowego, jak również pewne różnice ruchliwości elektroforetycznej otrzymanych fragmentów w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (163—166). Szczególnie przekonujące wyniki uzyskano poddając ciężkie łańcuchy proteolizie w skrawkach żelu poliakryloamidowego, w którym zostały one uprzednio elektroforetycznie oddzielone od łańcuchów lekkich, a następnie rozdzielając produkty degradacji przez ponowną elektroforezę w obecności SDS [metoda *Clevelanda* i współprac. (167)]. Otrzymane w ten sposób jednokierunkowe mapy peptydowe ciężkich łańcuchów miozyny z fazowego-szybkiego *pectoralis* lub *posterior latissimus dorsi* i tonicznego-wolnego *anterior latissimus dorsi* kury oraz z serca szczura znacznie się różniły (168, 169). Co więcej, porównując miozynę z mięśni *pectoralis* i *anterior latissimus dorsi* kury stwierdzono nawet nieco inną ruchliwość ciężkich łańcuchów w żelu poliakryloamidowym w SDS (168) gdy zastosowano zmodyfikowany system elektroforetyczny *Laemmli'ego* (170) o wysokiej zdolności rozdzielczej. Rozdzielenie ciężkich łańcuchów miozyny z *posterior latissimus dorsi* i *anterior latissimus dorsi* kury i z serca wołu uzyskano też w wyniku elektroforezy w systemie fenol/kwas octowy/mocznik (171). Bardzo przydatna w określaniu podobieństw i różnic struktury ciężkich łańcuchów miozyny z różnych źródeł okazała się wprowadzona przez *O'Farella* (172) metoda dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, w której peptydy rozdzielone w wyniku izoelektrycznego ogniskowania poddawane są następnie rozdziałowi w SDS. Porównując otrzymane w ten sposób mapy peptydowe produktów trawienia trypsyną miozyny z szybkich i wolnych fazowych mięśni królika (173) lub z fazowego-szybkiego *pectoralis* i tonicznego-wolnego *anterior latissimus dorsi* kury (174) zauważono tylko jeden wspólny peptyd, natomiast w hydrolizatach miozyny z mięśni wolnych i z serca zidentyfikowano liczne peptydy o jednakowej ruchliwości.

Jak widać z badań omówionych w tym rozdziale, miozyna z mięśni szkieletowych wolnych, zarówno fazowych jak i tonicznych, wykazuje większe podobieństwo do miozyny sercowej niż do miozyny z mięśni szkieletowych szybkich tak w specyficznej aktywności ATPazowej, jak i w strukturze zarówno lekkich jak i ciężkich łańcuchów. Z miozyny z mięśni szybkich królika wyizolowano ostatnio i oznaczono sekwencję 92-amino-kwasowego fragmentu ciężkiego łańcucha (175) pochodzącego z regionu subfragmentu S1 sąsiadującego z subfragmentem S2 w sekwencji rodzimej cząsteczki (176). Na podstawie szeregu przesłanek wysunięto sugestię, że właśnie ten polipeptyd zawiera główny element aktywnego cen-



trum miozyny (177). Można zatem oczekiwać, że przyszłe porównawcze badania sekwencji analogicznego fragmentu cząsteczki miozyny z innych źródeł przyczynią się do poznania strukturalnego podłoża funkcjonalnej specyficzności izoenzymów miozyny.

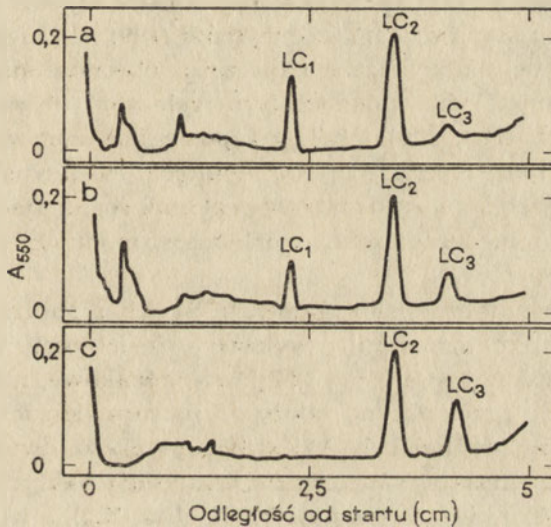
#### IV. Izoenzymy miozyny występujące w pojedynczych mięśniach o jednorodnej budowie

Heterogenność alkalicznych lekkich łańcuchów w preparatach miozyny z mięśni szkieletowych szybkich była pierwszą wskazówką możliwości występowania izoenzymów miozyny w tym typie mięśnia. O ile w preparatach miozyny z mięśnia *pectoralis* kury oba łańcuchy alkaliczne występują w stosunku równomolowym (71), preparaty z mięśni szybkich królika zawierają około dwukrotnie więcej alkalicznego łańcucha LC<sub>1</sub>, zwanego inaczej A1 (łańcuch alkaliczny 1), w stosunku do LC<sub>2</sub>, czyli A2 (łańcuch alkaliczny 2). Wynikało stąd, że przynajmniej w preparatach z mięśni królika występują co najmniej dwie populacje cząsteczek miozyny, z których jedna zawiera wyłącznie łańcuchy A1 (74, 76).

Metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnach z DEAE-celulozą (178—180) oraz chromatografii powinowactwa na kolumnach z *Sepharose 4B* sprzężonej z ATP (181) lub z aktyną (182) rozdzielono preparaty subfragmentu S1 (czyli główki) miozyny z mięśni szybkich królika i kury na frakcje, z których jedna pozbawiona była łańcucha A1, druga zaś nie zawierała łańcucha A2. Umożliwiło to porównanie własności tych dwóch populacji główek miozynowych, ale nie wyjaśniło podjednostkowego składu rodzimych cząsteczek miozyny. Częściową odpowiedź na to pytanie uzyskano poddając chromatografii kolumnowej na *Sepharose 4B* sprzężonej z ADP (183), pyrofosforanem (184) lub aktyną (185) dwugłówkowy fragment miozyny — HMM z mięśni szybkich królika i kury. Otrzymano frakcję wzbogaconą w łańcuch A2, drugą — zawierającą oba alkaliczne łańcuchy i trzecią — wzbogaconą w A1. Rozdział HMM i rodzimej miozyny z mięśnia *pectoralis* kury na frakcje o różnych alkalicznych łańcuchach przeprowadzono również metodą immunoadsorpcji na *Sepharose 4B* sprzężonej z przeciwciałami specyficznymi wobec tego odcinka łańcucha A1, który jest nieobecny w łańcuchu A2 (por. Ryc. 3). Frakcja niezatrzymywana na kolumnie wypełnionej tym immunoadsorbentem wzbogacona była w łańcuch A2; druga, wiązana na kolumnie, zawierała głównie łańcuch A1 (186). Doświadczenia te wykazały obecność homodimerów miozyny, tj. cząsteczek zawierających dwa jednakowe łańcuchy alkaliczne, nie tylko w preparatach z mięśni królika, ale również w preparatach z mięśni kury, zawierających równomolową ilość A1 i A2. Zagadnieniem otwartym pozostało istnienie heterodimerów. Niekompletny rozdział łańcuchów A1 i A2 mógł bowiem wynikać z niedoskonałości zastosowanych metod.



Wątpliwość tę rozstrzygnęły badania, w których do rozdzielenia izoenzymów miozyny zastosowano metodę elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach nie powodujących dysocjacji cząsteczki na podjednostki (187, 188). Preparaty z fazowego-szybkiego mięśnia *posterior latissimus dorsi* kury i królika oraz *pectoralis* kury rozdzieliły się na trzy komponenty (171, 189, 190), których skład podjednostkowy zanalizowano wycinając odpowiednie kawałki żelu i poddając zawarte w nich białka wtórnej elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (171, 190, 191). W ten sposób trzy komponenty rozdzielone w warunkach niedysocjujących zidentyfikowano jako homodimery A1,A1 i A2,A2 i heterodimer A1,A2 (Ryc. 4). Z pomiarów densytometrycznych wynika, że w preparatach z mięśni różnych zwierząt te trzy izoenzymatyczne formy występują w różnych proporcjach; w dotychczas analizowanych preparatach zawartość heterodimeru wynosiła 35—38% (171, 189).



Ryc. 4. Skład lekkich łańcuchów izoenzymów miozyny z mięśni fazowych-szybkich królika rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedysocjujących (wg 190). Densytogramy a, b i c odpowiadają kolejno izoenzymom o najniższej, pośredniej i najwyższej ruchliwości elektroforetycznej.

Nasuwało się kolejne pytanie, czy różnicom w składzie lekkich łańcuchów tych trzech izoenzymów miozyny odpowiadają różnice w budowie ich ciężkich łańcuchów. Analizy chemiczne preparatów miozyny z mięśni szybkich królika wykazały heterogenność ciężkich łańcuchów (192, 193). Między innymi wyizolowano z nich dwa N-końcowe 9-cio aminokwasowe peptydy, występujące w proporcji 1,8 : 1, z których jeden w pozycji 8 zawiera izoleucynę, drugi zaś walinę (192). Okazało się, że w preparatach subfragmentu S1 zawierających bądź łańcuch A1, bądź A2, oba te pepty-

dy występują w podobnej proporcji (194). Również porównanie otrzymanych metodą Clevelanda i współprac. (167) map peptydowych ciężkich łańcuchów trzech elektroforetycznie rozdzielonych izoenzymów miozyny z mięśni *posterior latissimus dorsi* i *pectoralis* kury nie wykazało różnic między nimi (169).

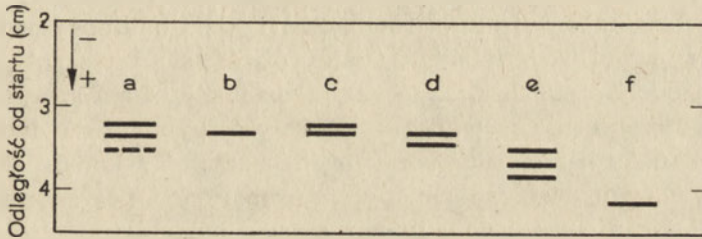
Elektroforetyczna analiza w obecności SDS białek miofibrylarnych pojedynczych szybkich włókien mięśnia *psaos* królika wykazała obecność obu alkalicznych lekkich łańcuchów w takiej samej proporcji, w jakiej występują one w preparatach miozyny z mięśni szybkich (195—197). Świadczy to o występowaniu różnych izoenzymów miozyny w tej samej komórce. Stwierdzono ponadto, że histochemicznie zidentyfikowane włókna fazowe-szybkie-białe i fazowe-szybkie-czerwone nie różnią się charakterem i proporcją lekkich łańcuchów (196, 198). Zastosowanie bardziej precyzyjnej metody immunofluorescencyjnej z przeciwciałami rozróżniającymi łańcuchy A1 i A2 miozyny wykazało jednak słabszą reakcję przeciwciała wobec A2 z włóknami szybkimi-czerwonymi niż z szybkimi-białymi, czyli nierównomierne rozmieszczenie izoenzymów (199). Co ciekawsze, metoda immunofluorescencyjna wykazała jednoczesną obecność miozyny „wolnej” i „szybkiej” w niektórych włóknach fazowych-wolnych zarówno w mięśniach mieszanych (199, 200) jak i w typowo fazowym-wolnym mięśniu *soleus* szczura (199). Obecność poszczególnych izoenzymów miozyny w różnych proporcjach stanowi dodatkowy czynnik różnicujący włókna mięśniowe i stwarza nieograniczone możliwości modulacji fizjologicznych właściwości włókien.

Badania enzymatyczne subfragmentu S1-A1 i subfragmentu S1-A2 rozdzielonych chromatograficznie wykazały, że ich aktywności ATPazowe w obecności zarówno  $\text{Ca}^{2+}$  jak i  $\text{Mg}^{2+}$  są jednakowe, natomiast aktywność stymulowana przez aktynę zależy od rodzaju łańcucha alkalicznego. Izoenzym zawierający łańcuch A2 wykazuje około dwukrotnie wyższą maksymalną aktywność w warunkach „wysycenia” aktyną ( $V_{\text{max}}$ ) i zarazem około czterokrotnie wyższą stałą Michaelisa ( $K_m$ ), a więc niższe powinowactwo wobec aktyny (179). Doświadczenia z hybrydyzacją lekkich i ciężkich łańcuchów (analogiczne do opisanych w rozdziale III tego artykułu w odniesieniu do subfragmentów miozyny z mięśni szybkich i wolnych) potwierdziły zależność stałych kinetycznych od rodzaju alkalicznego lekkiego łańcucha (129). Dowodem niższego powinowactwa wobec aktyny zarówno subfragmentu S1-A1 jak i homodimeru HMM-A1 jest również wcześniejsze ich wymywanie z kolumny wypełnionej *Sepharose 4B* sprzężoną z aktyną podczas elucji roztworami ATP, ADP, lub nawet KCl (182, 185). Jakkolwiek obserwacje te wskazują na rolę łańcuchów alkalicznych w reagowaniu miozyny z aktyną, należy zachować ostrożność w wyciąganiu z nich wniosków na temat sytuacji *in vivo*. Omówione badania ze względów technicznych przeprowadzone były na roztworach o bardzo niskiej sile jonowej, dalekiej od warunków fizjologicznych, ostatnio zaś wyka-



ziano, że przy podwyższeniu stężenia KCl z 6 mM do 46 mM zarówno  $V_{max}$  jak i  $K_m$  dla aktywowanego przez aktywny subfragmentu S1-A1 i A1-A2 zrównują się (201).

Metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedysocjujących wykazano także heterogenność miozyny z mięśni wolnych. Preparaty z tonicznego-wolnego *anterior latissimus dorsi* kury rozdzielono na dwie komponenty (171, 189) nie różniące się składem ich lekkich łańcuchów (171, 191); miozyna z fazowego-wolnego *soleus* królika (190) lub świnki morskiej (171) migruje w postaci pojedynczego prążka, podczas gdy miozyna z *soleus* szczura rozdziela się na dwa prążki (171). Wyniki te wskazują na specyficzność gatunkową izoenzymatycznego składu miozyny. Ryc. 5 ilustruje różnice ruchliwości elektroforetycznej różnych izoenzymów miozyny w warunkach niedysocjujących.



Ryc. 5. Schemat elektroforetycznego rozdzielania izoenzymów miozyny w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedysocjujących (wg 171).

Miozyna z mięśnia:

- a. tonicznego-wolnego (kura)
- b, c. fazowego-wolnego (świnka morska, szczur)
- d. komory serca (wół, królik, świnka)
- e. fazowego-szybkiego (kura)
- f. gładkiego (macica szczura)

W ostatnich latach zaczęto podważać powszechne dotąd przekonanie o jednorodności mięśnia sercowego. Doniesienie o różnicach aktywności ATPazowej i proporcji dwóch lekkich łańcuchów w miozynie z lewej i prawej komory serca psa (202) nie znalazło potwierdzenia w pracach innych autorów na preparatach z serc tego i kilku innych gatunków zwierząt (203, 204). Zgodne są natomiast doniesienia o znacznie wyższej aktywności ATPazowej miozyny i aktomiozyny z przedsionków serca w porównaniu z preparatami z komór (174, 204—207). W odróżnieniu od miozyny z komór, preparat z przedsionków przypomina raczej miozynę z mięśni szkieletowych szybkich niż wolnych także stabilnością w środowisku lekko alkalicznym (174). Wyraźne różnice dwukierunkowych map peptydowych produktów fragmentacji bromocyjanem (207) lub trawienia trypsyną (174) ciężkich łańcuchów tych dwóch form miozyny sercowej zostały zgodnie przyjęte jako nowy dowód, że o aktywności ATPazowej miozyny decyduje struktura jej ciężkich łańcuchów (174, 207, 208), jakkolwiek w większości dotychczasowych doniesień przedsta-



wiono również dowody strukturalnej nieidentyczności obu klas lekkich łańcuchów miozyny z przedsionków i komór (204, 206, 208, 209).

Metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedysocjujących rozdzielono miozynę z komór serca królika, świni lub wołu na dwie komponenty (171), a z komór serca szczura — na trzy komponenty o jednakowym składzie lekkich łańcuchów (209). W przeciwieństwie do izoenzymów z mięśni szkieletowych szybkich, elektroforetyczny rozdział izoenzymów miozyny sercowej musi więc zachodzić na zasadzie różnic w strukturze ciężkich łańcuchów; potwierdzają to różnice dwukierunkowych map peptydowych produktów fragmentacji bromocyjanem ciężkich łańcuchów dwóch dominujących izoenzymów z komór serca szczura (210). Na podstawie analizy map peptydowych sugerowano, że trzy izoenzymy z tej tkanki odpowiadają homodimerom i heterodimerowi dwóch różnych strukturalnych form ciężkiego łańcucha. Dwa izoenzymy z komór serca królika rozdzielono również metodą immunoadsorpcji; także w tym przypadku rozdzielone frakcje różniły się wyłącznie strukturą ciężkich łańcuchów (211). Miozynę z przedsionków serca szczura rozdzielono elektroforetycznie w warunkach niedysocjujących na dwie komponenty, wykazujące inną ruchliwość niż izoenzymy z komór (209).

Zaobserwowano ciekawe zmiany w proporcjach poszczególnych izoenzymów miozyny w mięśni komórek serca i ich zbieżność ze zmianami aktywności skurczowej serca i aktywności ATPazowej preparatów miozyny po wycięciu tarczycy lub podawaniu szczurom tyroksyny (209, 212—214) oraz w stanach hipertrofii wywołanej mechanicznym przeciążeniem pracy serca (215, 216). Badania w tej dziedzinie przybliżają poznanie mechanizmów hormonalnej regulacji syntezy izoenzymów oraz molekularnych podstaw adaptacji mięśnia do nowych wymogów funkcjonalnych.

Wszystkie informacje podane w tym i innych rozdziałach dotyczą miozyny z mięśni zwierząt dorosłych. Pominięcie obszernego działu badań nad zmianami ekspresji genów syntetyzujących różne formy miozyny w trakcie rozwoju osobniczego usprawiedliwione jest tym, że stosunkowo niedawno ukazał się artykuł poświęcony specjalnie temu zagadnieniu (217).

## V. Miozyna mięśni gładkich kręgowców

Szczególne zainteresowanie miozyną mięśni gładkich datuje się od czasu, gdy badając białka kurczliwe mięśnia żołądka kurzego zauważono, że w odróżnieniu od preparatów z mięśni szkieletowych nie zawierają one troponiny, a mimo to aktywność ATPazowa aktomiozyny jest zależna od stężenia jonów  $Ca^{2+}$  (218—220). Wyływający stąd wniosek, że regulacja skurczu w mięśni gładkim nie ma związku z białkami cienkich filamentów, lecz z miozyną, został potwierdzony wynikami badań innych mięśni gładkich (221—225).

Przy ogólnym podobieństwie właściwości fizykochemicznych i budowy cząsteczkowej miozyny z mięśni gładkich i szkieletowych, odnotowano różnice w składzie aminokwasowym (226, 227), długości cząsteczki (228), odporności na trawienie enzymami proteolitycznymi (227, 229, 230), strukturze antygenowej (156, 231—233) i charakterze lekkich łańcuchów. Miozyna gładkich mięśni kręgowców zawiera tylko dwa rodzaje lekkich łańcuchów, o masach cząsteczkowych ok. 20 000 ( $LC_{20}$ ) i 17 000 ( $LC_{17}$ ) (225, 227, 234—237), obecne w proporcji 2 mole każdego z nich na mol miozyny (220, 235). Żaden z nich nie jest usuwalny ani przez DTNB, ani przez EDTA (234, 237) i oba różnią się nieco składem aminokwasowym od lekkich łańcuchów z mięśni innych typów (234, 235, 237). Podczas otrzymywania subfragmentu S1 łańcuch  $LC_{20}$  ulega proteolitycznej degradacji (234, 238—241). Ponieważ nie powoduje to utraty ani aktywności ATPazowej, ani zdolności reagowania reszty cząsteczki z aktywną można sądzić, że nie bierze on udziału w spełnianiu żadnej z tych funkcji. Ta i inne cechy łańcucha  $LC_{20}$ , jak zdolność funkcjonalnego zastępowania regulującego łańcucha mięczaków (127) oraz jego fosforylacja działaniem endogennej kinazy (148, 242—244), pozwalają zaliczyć go wraz z łańcuchami  $LC_2$  miozyny z mięśni szkieletowych i sercowego do wspólnej klasy „łańcuchów ulegających fosforylacji”, czyli P-LC.

O ile znaczenie fosforylacji miozyny w mięśniach innego typu nie zostało jednoznacznie określone, wyniki uzyskane niezależnie przez kilka grup badawczych upoważniają do wniosku, że w mięśniu gładkim proces ten ma decydujące znaczenie w regulacji skurczu. Stwierdzono bowiem, że aktywacja miozyny z mięśni gładkich przez aktywną *in vitro* jest proporcjonalna do stanu ufosforylowania jej łańcucha P-LC (225, 238, 242, 244—252). Jednakową zależność obu procesów od stężenia jonów  $Ca^{2+}$  przypisywano aktywuującemu działaniu  $Ca^{2+}$  na kinazę lekkich łańcuchów, co zostało potwierdzone po otrzymaniu tego enzymu w czystej formie z mięśnia żołądka kurzego i zbadaniu jego budowy i właściwości (253, 254). Ze względu na fakt, że miozyna z mięśni gładkich wiąże  $Ca^{2+}$  w proporcji około 2 mole na mol białka w tym samym zakresie stężeń tego kationu jakie wymagane są do aktywacji skurczu (238, 244, 255), niektórzy z autorów sugerowali, że  $Ca^{2+}$  jest konieczny również do reagowania ufosforylowanej miozyny z aktywną (239, 246). Wyniki, które były podstawą do wysunięcia tego wniosku można jednak tłumaczyć niekompletnym oczyszczeniem miozyny od niezależnej od  $Ca^{2+}$  endogennej fosfatazy katalizującej defosforylację miozyny. W większości prac stwierdzono, że usunięcie  $Ca^{2+}$  po ufosforylowaniu miozyny nie hamuje aktywowanej przez aktywną hydrolizy ATP, a więc jedyną funkcją jonów  $Ca^{2+}$  jest regulacja aktywności kinazy lekkich łańcuchów (225, 238, 247, 250, 256, 257).

Odrębny pogląd reprezentuje E b a s h i i współprac., według których funkcję regulatora skurczu w mięśniu gładkim spełnia białko o masie czas-



teczkowej 80 000 (leiotonina A), nie będące kinazą lekkich łańcuchów, lecz powodujące w nieokreślony bliżej sposób aktywację aktomiozyny w obecności  $\text{Ca}^{2+}$  (i tropomiozyny) niezależnie od stanu ufosforylowania miozyny (258—260). W późniejszym doniesieniu z tego laboratorium opisano drugie białko (leiotonina C), o masie ok. 18 000, którego obecność jest konieczna dla aktywności leiotoniny A (261). Dyskusja ewentualnych przyczyn tej kontrowersji wykracza poza ramy tego artykułu. W większości laboratoriów jednak uzyskano wyniki przemawiające za tym, że zależna od  $\text{Ca}^{2+}$  fosforylacja P-LC miozyny powoduje aktywację skurczu mięśnia gładkiego, zaś rozkurcz jest wynikiem defosforylacji, katalizowanej przez niezależną od  $\text{Ca}^{2+}$  fosfatazę. Wspomniana już obserwacja, że preparaty subfragmentu S1, pozbawione łańcucha P-LC, reagują z aktyną w sposób niezależny od stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (221, 238—241) może sugerować, że nieufosforylowany P-LC blokuje w jakiś sposób (przezstrzennie lub poprzez wpływ na konformację ciężkiego łańcucha) miejsce reagowania miozyny z aktyną, zaś fosforylacja znosi ten efekt.

Ostatnio opisano dodatkowy mechanizm regulacji reagowania miozyny z aktyną w mięśniu aorty, poprzez inhibicję aktywności kinazy lekkich łańcuchów miozyny w wyniku fosforylacji katalitycznej podjednostki tego enzymu przez zależną od cAMP kinazę białkową (261a, 261b). Nie wiadomo jeszcze, czy mechanizm ten działa także w innych typach mięśni gładkich.

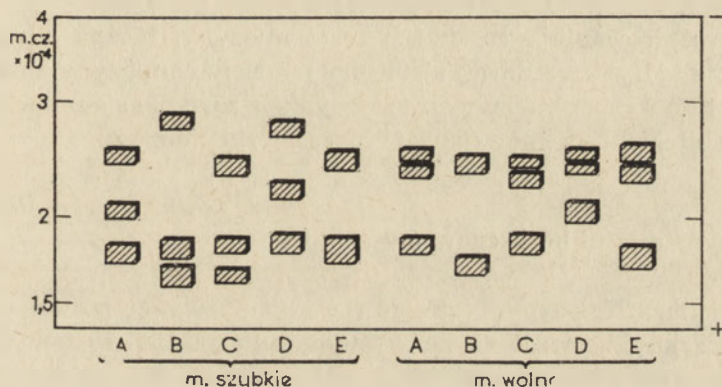
## VI. Polimorficzne formy miozyny w homologicznych mięśniach różnych gatunków kręgowców

Jak wynika z informacji przedstawionych w poprzednich rozdziałach, miozyna wykazuje znacznie większą specyficzność tkankową niż gatunkową. O występowaniu jednak pewnych różnic gatunkowych w enzymatycznej aktywności i strukturze zarówno lekkich jak i ciężkich łańcuchów miozyny wspomniano już krótko powyżej. Szersze badania porównawcze miozyny prowadzono stosując głównie metody immunologiczne. Preparaty miozyny z mięśni szkieletowych ssaków, ptaków i płazów nie dają krzyżowej reakcji antygenowej (262—264), podobnie jak preparaty z mięśni szkieletowych, gładkich i sercowego zwierząt tego samego gatunku (157, 202, 233, 265, 266). Powszechne do niedawna przekonanie o braku immunologicznej specyficzności miozyny z mięśni tego samego typu w obrębie gromady ssaków (233, 262, 267, 268) podważono wykazując — przy użyciu nowej, ilościowej techniki mikrokomplementarnego wiązania — różnice właściwości immunologicznych miozyny z *posterior latissimus dorsi* psa, królika i świni (264). Stosując tę technikę, przy użyciu przeciwciał wobec HMM stwierdzono też różnice antygenowej struktury miozyny z serc kilkunastu gatunków ssaków (269). Co więcej, zastąpienie przeciwciał wobec rodzimej cząsteczki przeciwciałami wobec HMM pozwoliło wykazać,



że antygenowa struktura miozyny z mięśni szkieletowych i serca tego samego gatunku jest bardziej zbliżona niż struktura miozyny z serc różnych gatunków (270).

Jakkolwiek w miozynie wszystkich badanych dotąd kręgowców zachowany jest specyficzny dla danego typu mięśnia charakter lekkich łańcuchów, szereg obserwacji wskazuje na możliwość strukturalnego zróżnicowania tych łańcuchów w homologicznych mięśniach różnych gatunków. Pewne różnice mas cząsteczkowych i punktów izoelektrycznych lekkich łańcuchów zauważono porównując miozynę z mięśni szkieletowych szybkich karpia i królika (271, 272) oraz żaby i królika (273). Znaczne zróżnicowanie mas cząsteczkowych lekkich łańcuchów występuje w miozynie różnych gatunków w obrębie samej gromady ryb (274—276) (Ryc. 6); odnotowano też różnice w składzie aminokwasowym tych łańcuchów



**Ryc. 6.** Schemat elektroforetycznego rozdzielenia lekkich łańcuchów miozyny z mięśni szkieletowych szybkich i wolnych różnych gatunków ryb w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS (wg 275). A — karp, B — szczupak, C — rekinek psi, D — makrela, E — anioł morski.

(274, 276). Różnice elektroforetycznej ruchliwości łańcuchów LC<sub>1</sub>, lub obu klas lekkich łańcuchów, w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS zauważono też porównując miozynę z serc ssaków różnych gatunków (68, 277). Inni autorzy stwierdzili jednakową ruchliwość elektroforetyczną lekkich łańcuchów miozyny z komór lub przedsionków serca szczura, królika, kota, psa, świni i wołu (204). Chociaż nie oznacza to jeszcze chemicznej identyczności, obserwacja ta potwierdza raczej niż przeczy brakowi korelacji między strukturą lekkich łańcuchów a poziomem aktywności ATPazowej miozyny, znacznie zróżnicowanej w obrębie porównywanych gatunków. Jednokierunkowe mapy peptydowe produktów fragmentacji bromocyjanem i proteolitycznego trawienia wg Clevelanda i współprac. (167) subfragmentu A1 miozyny z komór serca człowieka, świni i wołu wskazują na różnice w sekwencji aminokwasowej, a zarazem strukturalną homologię N-końcowej części ciężkich łańcuchów miozyny z tych

trzech źródeł (278). Można przypuszczać, że przyszłe badania porównawcze skoncentrują się na dokładniejszej charakterystyce struktury ciężkich łańcuchów miozyny.

W porównawczych badaniach enzymatycznych właściwości miozyny zwrócono uwagę na wyjątkowo dużą labilność miozyny z mięśni szkieletowych ryb (271, 279—281) i płazów (żaby) (273, 282, 283) nawet w środowisku obojętnym. W obu przypadkach nieodwracalnej inaktywacji towarzyszy agregacja cząsteczek do oligomerów (271, 273, 279, 284). Inną wspólną cechą miozyny z mięśni fazowych-szybkich przedstawicieli tych dwóch gromad jest słabsze wiązanie łańcuchów LC<sub>2</sub> z resztą cząsteczki w porównaniu z miozyną z mięśni wyższych kręgowców (273, 285). Różnice w szybkości trawienia trypsyną ciężkich łańcuchów miozyny z mięśni szybkich żaby i królika oraz w elektroforetycznej ruchliwości polipeptydów nagromadzających się w trakcie trawienia (273) wskazują na strukturalne różnicowanie tych dwóch form miozyny. Można oczekiwać, że porównanie pierwszorzędowej struktury łańcuchów miozyny z mięśni ryb, płazów i królika pozwoli wykazać od jakich zastąpień aminokwasowych zależy stabilność rodzimej struktury cząsteczki miozyny.

## VII. Miozyna mięśni bezkręgowców

W badaniach miozyny bezkręgowców wiele uwagi poświęcono mięśniom mięczaków ze względu na występowanie w nich systemu regulacji skurczu poprzez reagowanie Ca<sup>2+</sup> z miozyną (286, 287). Uderzającą różnicą w budowie cząsteczkowej miozyny z mięśni mięczaków i kręgowców jest charakter lekkich łańcuchów (127, 288). Wszystkie cztery lekkie łańcuchy miozyny mięczaków mają jednakową lub bardzo podobną (zależnie od gatunku) masę cząsteczkową — ok. 18 000. Jeden z nich można oddzielić od reszty cząsteczki działaniem EDTA. Miozyna pozbawiona tego łańcucha traci jedno z dwóch miejsc silnego wiązania Ca<sup>2+</sup> i reaguje z aktyną niezależnie od stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w środowisku, podczas gdy rodzima miozyna wymaga obecności Ca<sup>2+</sup> do jej aktywacji przez aktynę. Drugi lekki łańcuch oddysocjowuje pod wpływem DTNB po uprzednim potraktowaniu miozyny EDTA. Oba te łańcuchy mają identyczny skład amionkwasowy i którykolwiek z nich dodany do miozyny pozbawionej łańcucha usuwalnego przez EDTA odtwarza rodzimą cząsteczkę. W związku z tym oba łańcuchy otrzymały nazwę „regulujące”. Ponieważ po oddzieleniu od reszty cząsteczki łańcuch regulujący traci zdolność wiązania Ca<sup>2+</sup>, postulowano wpływ ciężkich łańcuchów na jego rodzimą konformację (288, 289). Funkcja pozostałych dwóch łańcuchów, które można usunąć z cząsteczki dopiero działaniem chlorowodorku guanidyny lub SDS i które różnią się od łańcuchów regulujących ładunkiem elektrycznym, jest nieznana. Można jednak przypuszczać, że są one



konieczne do zachowania aktywności ATPazowej podobnie jak łańcuchy alkaliczne w mięśniach szkieletowych kręgowców.

Regulujące łańcuchy miozyny mięczaków nie są fosforylowane ani przez kinazę lekkich łańcuchów otrzymaną z mięśni szkieletowych królika, ani przez otrzymane w podobny sposób ekstrakty z mięśni mięczaków (148, 290), chociaż posiadają resztę serynową w podobnej pozycji, w jakiej zidentyfikowano serynę ulegającą fosforylacji w łańcuchach P-LC miozyny kręgowców (290). Łańcuchy te wykazują również strukturalne podobieństwo do łańcuchów P-LC w rozmieszczeniu apolarnych reszt aminokwasowych (290). Konsekwencją strukturalnej homologii jest wspomniana w rozdziale III i V zdolność funkcjonalnego zastępowania łańcuchów regulujących w cząsteczce miozyny mięczaków przez P-LC miozyny z mięśni kręgowców. Zauważono jednak, że tylko P-LC miozyny z mięśni gładkich przywraca miozynie mięczaków, pozbawionej jej własnego łańcucha regulującego, zarówno zależność reagowania z aktyną od obecności  $\text{Ca}^{2+}$  jak i pełną zdolność specyficznego wiązania  $\text{Ca}^{2+}$ , podczas gdy P-LC miozyny z mięśni szkieletowych nie przywraca zdolności wybiórczego wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  (127). Porównanie sekwencji aminokwasowej łańcuchów P-LC z fazowych-szybkich mięśni kręgowców (291) i łańcuchów regulujących miozyny mięczaków (290, 292) z sekwencją parwalbuminy — białka wiążącego  $\text{Ca}^{2+}$ , o znanej strukturze trzeciorzędowej (293), pozwoliło zidentyfikować potencjalne miejsce wiązania  $\text{Ca}^{2+}$  w tych łańcuchach. Dokładniejsze badania (289) wykazały, że łańcuch regulujący miozyny mięczaków, oprócz pojedynczego miejsca specyficznego dla  $\text{Ca}^{2+}$ , zawiera drugie miejsce wiązania z wysoką stałą powinowactwa, dostępne tak dla  $\text{Ca}^{2+}$  jak i innych dwuwartościowych kationów; uzyskano jednocześnie dowody wskazujące, że pojedyncze miejsce wiązania kationu w P-LC miozyny z mięśni szkieletowych kręgowców jest homologiczne w stosunku do tego drugiego, niespecyficznego dla  $\text{Ca}^{2+}$  miejsca w łańcuchu regulującym miozyny mięczaków (289, 294). Bardziej ogólnym wnioskiem, jaki wypływa z dokładnego porównania sekwencji aminokwasowej lekkich łańcuchów różnych form miozyny, parwalbuminy, a także troponiny C — białka regulującego skurcz mięśni szkieletowych wszystkich kręgowców, jest pochodzenie tych białek od wspólnego prekursora.

Przypuszczalny mechanizm kontroli skurczu przez działanie  $\text{Ca}^{2+}$  na lekkie łańcuchy miozyny mięczaków oraz jego występowanie w mięśniach wielu innych bezkręgowców omówiono w jednym z wcześniejszych artykułów w *Postęпах Biochemii* (295). Miozynowy system kontroli, występujący równocześnie z systemem kontroli skurczu przez białka cienkich filamentów m.in. w mięśniach owadów, tłumaczy zjawisko ruchu główek miozynowych pod wpływem  $\text{Ca}^{2+}$ , wykryte metodą rentgenograficzną w mięśni mechanicznie rozciągniętym, przez co kontakt filamentów miozynowych z cienkimi filamentami jest przerywany (296). Podobne obserwacje dokonane w badaniach mięśni szkieletowych kręgowców



(143, 297) nie doczekały się jednoznacznej interpretacji. Badania porównawcze wykazały brak korelacji między aktywnością ATPazową miozyny a typem regulacji skurczu w danym mięśniu (298).

Wśród badań innego typu na uwagę zasługują prace, w których wykazano znaczne zróżnicowanie ciężkich łańcuchów miozyny z mięśni ściały ciała nicieni. Zróżnicowanie to dotyczy zarówno sekwencji aminokwasowej, co widać przy porównaniu produktów fragmentacji łańcuchów bromocyjanem, jak i masy cząsteczkowej (210 000 i 203 000) (299). Wykazano, że cząsteczki są homodimerami i że oba izoenzymy występują w tych samych komórkach (300, 301).

### VIII. Miozyna w systemach niemięśniowych

Mimo trudności spowodowanych niską zawartością miozyny w komórkach niemięśniowych, udało się już otrzymać w stosunkowo czystej formie i scharakteryzować to białko z wielu tkanek lub komórek kręgowców, a mianowicie z mózgu (165, 302, 303), wątroby (304), rdzenia nadnerczy (305—309), tarczycy (310), trzustki, gruczołu ślinowego i przysadki mózgowej (311), siatkówki oka (309, 312), makrofagów (313—315), leukocytów (316—319), płytek krwi (320—330), fibroblastów (331—333) i wielu innych typów hodowanych komórek (333—337). Materiałem do izolacji miozyny z niemięśniowych komórek bezkręgowców był mózg mątwy (338), jaja (339) i sperma (340) rozgwiazdy, ameboidalna i plazmoidalna forma śluzowca *Physarum polycephalum* (341—346), ameby *Dictyostelium discoideum* (347, 348), *Acanthamoeba castellanii* (349—353), *Chaos carolinensis* i *Amoeba proteus* (354). W tabeli 3 zestawiono reprezentatywne wyniki charakteryzujące preparaty miozyny z różnych źródeł. W przeważającej większości podjednostkowa budowa miozyny jest bardzo podobna do budowy miozyny mięśniowej. Oznaczenia ciężaru cząsteczkowego metodą chromatografii kolumnowej dały wartości w granicach 450 000—500 000 (165, 303, 313, 317, 321, 336). Bezpośrednie porównanie ruchliwości elektroforetycznych w żelu poliakrylamidowym w SDS w wielu przypadkach wykazało nieco wyższy ciężar ciężkich łańcuchów miozyny niemięśniowej (Tabela 3, 303, 329, 340, 342, 343, 347, 351). Inną budowę niż miozyna mięśniowa ma jedynie jedna z form miozyny u *Acanthamoeba castellanii*, której całkowita masa cząsteczkowa wynosi 180 000, co wskazuje na obecność tylko jednego ciężkiego łańcucha w cząsteczce (349, 350). Składem lekkich łańcuchów preparaty niemięśniowe przypominają miozynę z mięśni gładkich. Pewne wahania wartości ciężarów cząsteczkowych tych łańcuchów mogą wynikać z niedokładności metody elektroforetycznej; przy bezpośrednim porównaniu elektroforetycznej ruchliwości lekkich łańcuchów miozyny z fibroblastów, płytek krwi, komórek wątroby, nerek, mózgu i mięśnia gładkiego żołądka kury otrzymano identyczne wartości 20 000 i 17 000 (165). Jedynie w miozynie z mózgu znaleziono trzy rodzaje lek-

kich łańcuchów (165, 303), nie jest jednak wykluczone, że jeden z tych łańcuchów polipeptydowych stanowi zanieczyszczenie. Jak widać z danych przedstawionych w Tabeli 3, obserwowano znaczne różnice w aktywnościach ATPazowych, z reguły znacznie niższych od aktywności miozyny mięśniowej; na razie jeszcze trudno ocenić, czy odzwierciedlają one rzeczywiste różnice właściwości badanych form miozyny, ponieważ mogą być spowodowane różnymi warunkami oznaczeń, częściową denaturacją białka podczas izolacji lub niejednokrotnie niekompletnym oczyszczeniem. Ostatnie badania ujawniły jedną z przyczyn braku lub bardzo niskiej stymulacji aktywności ATPazowej przez aktyne we wcześniejszych pracach. Stwierdzono, że lekki łańcuch o masie cząsteczkowej około 20 000 w miozynie z płytek krwi (322, 356, 357), siatkówki oka (358), linii komórek BHK-21 z nerki chomika (333, 359), astrocytów mysich (337) i makrofagów (315) jest fosforylowany przez endogenną kinazę lub kinazę otrzymaną z mięśni gładkich, oraz że dopiero fosforylacja umożliwia aktywację miozynowej ATPazy przez aktyne. Można przypuszczać, że przyszłe badania miozyny z innych typów komórek potwierdzą to zjawisko. Pojawiły się też doniesienia o fosforylacji ciężkiego łańcucha miozyny z fibroblastów (360), ameby *Dictyostelium* (361) i *Acanthamoeba* (352). Jakkolwiek według pierwszych doniesień (322, 356) aktywność endogennej kinazy z płytek krwi nie wymagała obecności  $Ca^{2+}$ , w późniejszych pracach (362, 363) wykazano jej zależność od  $Ca^{2+}$ , co stwierdzono również w przypadku fosforylacji miozyny z innych niemięśniowych źródeł. Tak więc, w toku badań nad miozyną wyjaśniono jednocześnie niektóre aspekty regulacji jej reagowania z aktyną, podobnie jak to miało miejsce w przypadku mięśni gładkich.

*Acanthamoeba castellanii* jest dotąd jedynym przykładem komórek niemięśniowych, w których znaleziono więcej niż jedną formę miozyny (Tablica 3). Ostatnio zidentyfikowano w tym organizmie aż trzy izoenzymy (Miozyna IA, IB, IC) zbudowane z pojedynczego ciężkiego łańcucha o nieco różnych masach i różniące się składem lekkich łańcuchów (364, 365). Występują one obok formy dimerycznej (miozyny II), bardziej przypominającej miozynę mięśniową (351, 353). Oprócz izoenzymów miozyny I z *Acanthamoeba*, wszystkie inne badane formy miozyny niemięśniowej tworzą *in vitro* bipolarne filamenty, chociaż znacznie mniejsze od filamentów miozyny mięśniowej (304, 306—308, 312, 318, 329, 337, 338, 343, 346, 353, 354). Zwrócono przy tym uwagę na nieco inny wpływ warunków jonowych na formowanie się filamentów miozyny niemięśniowej i mięśniowej. Określenie stanu agregacji niemięśniowych białek kurczliwych *in vivo* wymaga dalszych badań i stanowi kolejny etap na drodze prowadzącej do poznania mechanizmów różnorodnych form lokomocji komórek i ruchów wewnątrzkomórkowych, w których białka te najprawdopodobniej czynnie uczestniczą.



Tabela 3

Porównanie podjednostkowej budowy i aktywności różnych miozyn niemięśniowych

Źródło miozyny	Podejdnostki*	Aktywność ATPazowa ( $\mu$ mole P/mg miozyny/min)				Uwagi
		K <sup>+</sup> , EDTA	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	aktywna Mg <sup>2+</sup>	
Płytki krwi ludzkie (322, 355)	200 000 (2)	0,9	0,38	0,002	0,029	miozyna niefosforylowana
	19 000 (2)	1,0	0,41	0,006	0,170	
	16 000 (2)					
Mózg kureczęcia (165)	200 000	0,49	0,49	0,015	0,04	
	23 000 (1)					
	20 000 (2,8)					
<i>Physarum polycephalum</i> (344, 345)	17 000 (1,2)					
	225 000 (2)	0	2,0	0	0,44	
	21 000 (2)					
<i>Dictyostelium discoideum</i> (347, 348)	17 000 (2)					
	210 000	0,02	0,08	0,005	0,2	
	18 000					
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (349—351)	16 000					niefosforylowana
	14 000					
	11 170 000 (2)	3,2	0,38	0,04	0,08	
	17 500 (1 lub 2)	0,12	0,83	0,08	1,23	
	17 000 (2)			0,036	0,060	

Ślinianka przyuszną świni (311)	200 000	0,396	0,203	0,032	
	19 000				
	14 000				
Przedni płat przysadki mózgowej świni (311)	200 000	0,269	0,188	0,026	0,020
	19 000				
	14 000				
Jaja rozgwiazdy (339)	210 000	0,30	0,45	0,008	0,060
	20 000 (2)				
	17 000 (2)				
Astrocyty (337)	200 000	0,126	0,105		
	20 000				
	15 000				
Rdzeń nadnerczy wołu (307)	200 000	0,16	0,25	0,04	
	19 000				
	16 000				

\* podano masy cząsteczkowe podjednostek oraz w nawiasach ich stechiometrię



## PIŚMIENNICTWO

1. Bárány M., (1967), *J. Gen. Physiol.*, **50**, 197—218.
2. Lowey S., (1972), w *Protein-Protein Interactions*, red. Jaenicke R., Helmreich E., str. 317—342, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
3. Adelstein R. S., (1978), *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 27—30.
4. Korn E. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 588—599.
5. Slayter H. S., Lowey S., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 1611—1618.
6. Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H. J., (1969), *J. Mol. Biol.*, **42**, 1—29.
7. Trotta P. P., Dreizen P., Stracher A., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **61**, 659—666.
8. Weeds A. G., Lowey S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 701—725.
9. Mihalyi E., Szent-Györgyi A. G., (1953), *J. Biol. Chem.*, **201**, 189—196.
10. Szent-Györgyi A. G., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 305—320.
11. Lowey S., Cohen C. J., (1962), *J. Mol. Biol.*, **4**, 293—308.
12. Young M., Himmelfarb S., Harrington W. F., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2822—2829.
13. Mueller H., Perry S. V., (1962), *Biochem. J.*, **85**, 431—439.
14. Schliselfeld L. H., Barany M., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3206—3213.
15. Lowey S., Luck S. M., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3195—3199.
16. Murphy A. J., Morales M. F., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1528—1532.
17. Margossian S. S., Lowey S., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 313—330.
18. Young M., (1967), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 2393—2400.
19. Huxley H. E., (1963), *J. Mol. Biol.*, **7**, 281—308.
20. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
21. Kasman K., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 77—91.
22. Bailey K., (1942), *Biochem. J.*, **36**, 121—139.
23. Mommaerts W. F. H. M., Seraydarian K., (1947), *J. Gen. Physiol.*, **30**, 401—422.
24. Bowen W. J., Kerwin T. D., (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 237—247.
25. Kielley W. W., Bradley L. B., (1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 653—659.
26. Kielley W. W., Kalckar H. M., Bradley L. B., (1956), *J. Biol. Chem.*, **219**, 95—101.
27. Seidel J. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 162—170.
28. Seidel J. C., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1142—1148.
29. Eisenberg E., Moos C., (1968), *Biochemistry*, **7**, 1486—1489.
30. Hess A., Pillar G., (1963), *J. Physiol. (London)*, **169**, 780—798.
31. Hess A., (1961), *J. Physiol. (London)*, **157**, 221—231.
32. Hess A., (1970), *Physiol. Rev.*, **50**, 40—62.
33. Kuffler S. W., Vaughan-Williams E. M., (1953), *J. Physiol.*, **121**, 289—317.
34. Burke R. E., Levine D. N., Tsairis P., Zajac F. E. III., (1973), *J. Physiol. (London)*, **234**, 723—748.
35. Close R. I., (1972), *Physiol. Rev.*, **52**, 129—197.
36. Gauthier G. F., Lowey S., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 760—779.
37. Kaczmarski F., (1977), *Post. Biol. Kom.*, **4**, 65—85.
38. Spamer C., Pette D., (1977), *Histochemistry*, **52**, 201—216.
39. Gauthier G. F., Lowey S., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 10—25.
40. Nemeth P., Hofer H. W., Pette D., (1979), *Histochemistry*, **63**, 191—201.

41. Barnard R. J., Edgerton V. R., Furukawa T., Peter J. B., (1971), *Am. J. Physiol.*, **220**, 410—414.
42. Arangio G. A., Hagstrom J. W. C., (1969), *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 127—128.
43. Gröschel-Stewart U., Meschede D., Lehr I., (1973), *Histochemie*, **33**, 79—85.
44. Lutz H., Ermini M., Jenny E., Bruggmann S., Joris F., Weber E., (1978), *Histochemistry*, **57**, 223—235.
45. Kiessling K. H., (1977), *Comp. Biochem. Physiol.*, **57B**, 287—292.
46. Stein J. M., Padykula H. A., (1962), *Am. J. Anat.*, **110**, 103—124.
47. Bocek R. M., Beatty C. H., (1966), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 549—559.
48. Karpati G., Engel W. K., (1967), *Arch. Neurol.*, **17**, 542—545.
49. Guth L., Samaha F. J., (1969), *Exp. Neurol.*, **25**, 138—152.
50. Peter J. B., Barnard R. J., Edgerton V. R., Gillispie C. A., Stempel K. E., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2627—2633.
51. Ginsberg B. L., Machay B., (1961), *Biol. Anat.*, **2**, 174—181.
52. Bárány M., Bárány K., Reckard T., Volpe A., (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 185—191.
53. Sréter F. A., Seidel J. C., Gergely J., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 5772—5776.
54. Locker R. H., Hagyard C. J., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 370—375.
55. Pfister M., Schaub M. C., Watterson J. G., Knecht M., Wasser P. G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **410**, 193—209.
56. Graceffa P., Seidel J. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 223—231.
57. Samaha F. J., Guth L., Albers R. W., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 219—224.
58. Bárány M., Close R. I., (1971), *J. Physiol.*, **213**, 455—474.
59. Delcayre C., Swynghedauw B., (1975), *Pflug. Arch.*, **355**, 39—47.
60. Syrový I., (1973), *Int. J. Biochem.*, **4**, 36—41.
61. Bárány M., Gaetjens E., Bárány K., Karp E., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 280—293.
62. Furukawa T., Peter J. B., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1354—1361.
63. Hill A. V., (1950), *Sci. Progr.*, **38**, 209—230.
64. Hill A. V., (1956), *Brit. Med. Bull.*, **12**, 165—166.
65. Yazaki Y., Raben M. S., (1974), *Circ. Res.*, **35**, 15—23.
66. Syrový I., (1975), *Pflug. Arch.*, **356**, 87—92.
67. Syrový I., Gutmann E., (1975), *Physiol. Bohemoslov.*, **24**, 325—334.
68. Higuchi M., Stewart D., Mason D. T., Ikeda R., Wikman-Coffelt J., (1978), *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 495—499.
69. Seidel J. C., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5623—5629.
70. Weber K., Osborne M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
71. Lowey S., Risby D., (1971), *Nature (London)*, **234**, 81—85.
72. Sarkar S., Sréter F. A., Gergely J., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 946—950.
73. Sréter F. A., Sarkar S., Gergely J., (1972), *Nature New Biol., (London)*, **239**, 124—125.
74. Frank G., Weeds A. G., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **44**, 317—334.
75. Holt J. C., Lowey S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4600—4609.



76. Sarkar S., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 14—17.
77. Weeds A. G., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **66**, 157—173.
78. Weeds A. G., Pope B., (1971), *Nature (London)*, **234**, 85—88.
79. Weeds A. G., Frank G., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 9—14.
80. Weeds A. G., (1975), *FEBS Letters*, **59**, 203—208.
81. McPherson J., Traut R. R., Mason D. T., Zelis R., Wikman-Coffelt J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 994—996.
82. McPerson J., Fenner C., Smith A., Mason D. T., Wikman-Coffelt J., (1974), *FEBS Letters*, **47**, 149—154.
83. Close R. I., (1969), *J. Physiol. (London)*, **204**, 331—346.
84. Bullar A. J., Mommaerts W. F. H. M., Seraydarian K., (1969), *J. Physiol.*, **205**, 581—598.
85. Close R. I., (1969), *J. Physiol.*, **204**, 331—346.
86. Sréter F. A., Gergely J., Luff A. L., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 84—89.
87. Weeds A. G., Trentham D. R., Kean C. J. C., Buller A. J., (1974), *Nature*, **247**, 135—139.
88. Sréter F. A., Elzinga M., Mabuchi K., Salmons S., Luff A. L., (1975), *FEBS Letters*, **57**, 107—111.
89. Weeds A. G., Burridge K., (1975), *FEBS Letters*, **57**, 203—208.
90. Salmons S., Sréter F. A., (1976), *Nature*, **263**, 30—34.
91. Sréter F. A., Romanul F. C. A., Salmons S., Gergely J., (1974), w *Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy*, 2 red. Milhorat A. T., Int. Cong. Series Nr 333, str. 338—343, Excerpta Medica, Amsterdam.
92. Jean D. H., Guth L., Albers R. W., (1973), *Exp. Neurol.*, **38**, 458—471.
93. Weeds A. G., (1969), *Nature*, **223**, 1362—1364.
94. Gazith J., Himmelfarb S., Harrington W. F., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 15—22.
95. Dreizen P., Gershman L. C., Trotta P. P., Stracher A., (1967), *J. Gen. Physiol.*, **50**, Suppl., 85—118.
96. Stracher A., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 519—525.
- 96a. Frederiksen D. W., Holtzer A., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3935—3950.
97. Dreizen P., Gershman L. C., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1688—1693.
98. Dreizen P., Richards D. H., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 29—45.
99. Kominz D. R., Carroll W. R., Smith E. N., Mitchell E. R., (1959), *Arch. Biochem. Biophys.*, **79**, 191—199.
100. Gershman L. C., Dreizen P., Stracher A., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 966—973.
101. Gaetjens E., Bárány K., Bailin G., Oppenheimer H., Bárány M., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 82—96.
102. Gershman L. C., Stracher A., Dreizen P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2726—2736.
103. Gershman L. C., Dreizen P., (1970), *Biochemistry*, **9**, 1677—1687.
104. Katoh N., Kubo S., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)*, **77**, 949—955.
105. Higuchi M., Fábíán F., Wandzilak T., Jr., Mason D. T., Wikman-Coffelt J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 317—323.
106. Malhotra A., Huang S., Bhan A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 461—467.

107. Taylor R. S., Weeds A. G., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 301—315.
108. Collins J. H., (1976), *Nature*, **259**, 699—700.
109. Matsuda G., Maita T., Suzuyama Y., Setoguchi M., Ume-gane T., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 809—811.
110. Léger J. J., Elzinga M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1390—1396.
111. Perrie W. T., Thomas M. A. W., Perry S. V., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 860—861.
112. Perrie W. T., Smillie L. B., Perry S. V., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 151—164.
113. Pires E., Perry S. V., Thomas M. A. W., (1974), *FEBS Letters*, **41**, 292—296.
114. Frearson N., Perry S. V., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 99—107.
115. Reddy Y. S., Pitts B. J. R., Schwartz A., (1977), *J. Mol. Cell Cardiol.*, **9**, 501—513.
116. Scordilis S. P., Adelstein R. S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 9041—9048.
117. Perrie W. T., Smillie L. B., Perry S. V., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 17—18.
118. Frearson N., Solaro R. J., Perry S. V., (1976), *Nature*, **264**, 801—802.
119. Bárány K., Bárány M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4752—4754.
120. Werber M. M., Gaffin S. L., Oplatka A., (1972), *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **1**, 91—96.
121. Werber M. M., Szent-Györgyi A. G., Fasman G. D., (1973), *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **2**, 35—43.
122. Morimoto K., Harrington W. F., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 693—709.
123. Fábán F., Mason D. T., Wikman-Coffelt J., (1977), *FEBS Letters*, **81**, 381—385.
124. Kuwayama H., Yagi K., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 25—33.
125. Kendrick-Jones J., (1974), *Nature*, **249**, 631—634.
126. Kendrick-Jones J., (1976), w 26<sup>th</sup> Mosbach Symposium on Molecular Basis of Motility, str. 122—135, Springer Verlag, Berlin.
127. Kendrick-Jones J., Szentkirályi E. M., Szent-Györgyi A. G., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 747—775.
128. Kim H. D., Mommaerts W. F. H. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **245**, 230—234.
129. Wagner P. D., Weeds A. G., (1977), *J. Mol. Biol.*, **109**, 455—473.
130. Holt J. C., Lowey S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4609—4620.
131. Guba F., Mészáros-Guba M., Kasman K., Michnicka M., Kąkol I., (1980), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* (w druku).
132. Pinset-Härström I., Whalen R. G., (1979), *J. Mol. Biol.*, **134**, 189—197.
133. Ebashi S., Endo M., Ohtsuki I., (1969), *Q. Rev. Biophys.*, **2**, 351—384.
134. Bremel R. D., Weber A., (1972), *Nature*, **238**, 97—101.
135. Bremel R. D., Weber A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 366—374.
136. Pemrick S. M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4047—4054.
137. Werber M. M., Oplatka A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 823—830.



- 137a. Hozumi T., Hotta K., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**, 671—676.
138. Beinfeld M. G., Bryce D. A., Kochavy D., Martonosi A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6282—6287.
139. Holroyde M. J., Potter J. D., Solaro R. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6478—6482.
140. Huxley H. E., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361—376.
141. Haselgrove J. C., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 113—143.
142. Alexis M. N., Gratzner W. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2319—2325.
143. Okamoto Y., Yagi K., (1976), *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 111—120.
144. Bagshaw C. R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 59—67.
145. Margossian S. S., Lowey S., Barshop B., (1975), *Nature*, **258**, 163—166.
146. Weeds A. G., Pope B., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 129—157.
- 146a. Bagshaw C. R., Reed G. H., (1977), *FEBS Letters*, **81**, 386—390.
147. Kasman K., Kałol I., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 509—514.
148. Frearson N., Focant B. W. W., Perry S. V., (1976), *FEBS Letters*, **63**, 27—32.
149. Pires E., Perry S. V., (1977), *Biochem. J.*, **167**, 137—146.
150. Morgan M., Perry S. V., Ottaway J., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 687—697.
151. Perry S. V., Cole H. A., Frearson N., Moir A. J. G., Morgan M., Pires E., (1976), w 26<sup>th</sup> Mosbach Colloquium, Molecular Basis of Motility, red. Heilmeyer L., Rüegg J. C., Wieland Th. str. 107—121, Springer-Verlag, Berlin.
152. Perry S. V., Cole H. A., Frearson N., Moir A. J. G., Nairn A. C., Solaro R. F., (1978), Proc. 12<sup>th</sup> FEBS Meeting, Dresden 1978, **54**, 147—159.
153. Bárány K., Bárány M., Gillis J. M., Kushmerick M. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3617—3623.
154. Stull J. T., High C. W., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1078—1083.
155. Manning D. R., Stull J. T., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 164—170.
156. Masaki T., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 441—449.
157. Arndt I., Pepe F. A., (1975), *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 159—168.
158. Kuehl W. M., Adelstein R. S., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 956—962.
159. Huszar G., Elzinga M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 745—753.
160. Trayer I. P., Harris C. I., Perry S. V., (1968), *Nature (London)*, **217**, 452—453.
161. Kuehl W. M., Adelstein R. S., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 59—65.
162. Huszar G., Elzinga M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 229—236.
163. Perry S. V., (1967), *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **17**, 327—381.
164. Bálint M., Sréter F. A., Gergely J., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 557—566.
165. Burridge K., Bray D., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 1—14.
166. Jean D. H., Albers R. W., Guth L., Aron H. J., (1975), *Exp. Neurol.*, **49**, 750—757.
167. Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W., Laemmli U. K., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102—1106.

168. Rushbrook J. J., Stracher A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4331—4334.
169. d'Albis A., Pantaloni C., Bechet J.-J., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 81—84.
170. King J., Laemmli U. K., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 465—477.
171. d'Albis A., Pantaloni C., Bechet J.-J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 261—272.
172. O'Farrell P. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007—4021.
173. Brevet A., Whalen R. G., (1978), *Biochimie*, **60**, 459—466.
174. Dalla Libera L., Sartore S., Schiaffino S., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **581**, 283—294.
175. Elzinga M., Collins J. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4281—4284.
176. Lu R., Sosiński J., Bálint M., Sréter F., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1695.
177. Ramirez F., Shukla K. K., Levy H. M., (1979), *J. Theor. Biol.*, **76**, 351—357.
178. Yagi K., Otani F., (1974), *J. Biochem.*, (Tokyo), **76**, 365—373.
179. Weeds A. G., Taylor R. S., (1975), *Nature*, **257**, 54—56.
180. Cardinaud R., Guillain F., Bluzat A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 867—874.
181. Yoshida M., Morita F., (1976), *J. Biochem.* (Tokyo), **79**, 1049—1052.
182. Winstanley M. A., Trayer H. R., Trayer I. P., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 239—242.
183. Wagner P. D., (1977), *FEBS Letters*, **81**, 81—85.
184. Yagi K., Matsuda S., Kuwayama H., (1977), *J. Biochem.* (Tokyo), **82**, 1463—1467.
185. Trayer H. R., Winstanley M. A., Trayer I. P., (1977), *FEBS Letters*, **83**, 141—144.
186. Holt J. C., Lowey S., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4398—4402.
187. d'Albis A., Gratzer W. B., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 292—296.
188. Hoh J. F. Y., (1975), *Biochemistry*, **14**, 742—747.
189. Hoh J. F. Y., McGrath P. A., White R. J., (1976), *Biochem. J.*, **157**, 87—95.
190. Hoh J. F. Y., Yeoh G. P. S., (1979), *Nature*, **280**, 321—323.
191. Hoh J. F. Y., (1978), *FEBS Letters*, **90**, 297—300.
192. Starr R., Offer G., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 17—31.
193. Weeds A. G., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 44P.
194. Pope B., Wagner P. D., Weeds A. G., (1977), *J. Mol. Biol.*, **109**, 455—473.
195. Weeds A. G., Hall R., Spurway N. C., (1975), *FEBS Letters*, **49**, 320—324.
196. Pette D., Schnez U., (1977), *Histochemistry*, **54**, 97—107.
197. Pette D., Schnez U., (1977), *FEBS Letters*, **83**, 128—130.
198. Furukawa T., Sugita H., Toyokura Y., (1972), *Exp. Neurol.*, **37**, 515—521.
199. Gauthier G. F., Lowey S., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 10—25.
200. Lutz H., Weber H., Billeter R., Jenny E., (1979), *Nature*, **281**, 142—144.
201. Wagner P. D., Slater C. S., Pope B., Weeds A. G., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 385—394.



202. Wikman-Coffelt J., Fenner C., Smith A., Mason D. T., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1257—1262.
203. Kleid J. J., Tada M., Repke D. I., Katz A. M., (1972), *J. Mol. Cell Cardiol.*, **4**, 625—632.
204. Syrový I., Delcayre C., Swynghedauw B., (1979), *J. Mol. Cell Cardiol.*, **11**, 1129—1135.
205. Oganessyan S., Zaminian T., Bay N., Petrosian V., Koschkarian A., Martirosian I., Eloyan M., (1973), *J. Mol. Cell Cardiol.*, **5**, 1—24.
206. Long L., Fábíán F., Mason D. T., Wikman-Coffelt J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 626—635.
207. Flink I. L., Rader J. H., Banerjee S. K., Morkin E., (1978), *FEBS Letters*, **94**, 125—130.
208. Wikman-Coffelt J., Srivastava S., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 207—212.
209. Hoh J. F. Y., McGrath P. A., Hale P. T., (1978), *J. Mol. Cell Cardiol.*, **10**, 1053—1076.
210. Hoh J. F. Y., Yeoh G. P. S., Thomas M. A. W., Higginbottom L., (1979), *FEBS Letters*, **97**, 330—334.
211. Sartore S., Dalla Libera L., Schiaffino S., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 197—201.
212. Flink I. L., Morkin E., (1977), *FEBS Letters*, **81**, 391—394.
213. Flink I. L., Rader J. H., Morkin E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3105—3110.
214. Hoh J. F. Y., Egerton L. J., (1979), *FEBS Letters*, **101**, 143—148.
215. Siemiankowski R. F., Dreizen P., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8659—8665.
216. Lompre A-M., Schwartz K., d'Albis A., Lacombe G., Van Thiem N., Swynghedauw B., (1979), *Nature*, **282**, 105—107.
217. Dąbrowska R., Sosiński J., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 565—587.
218. Bremel R. D., (1974), *Nature*, **252**, 405—407.
219. Driska S., Hartshorne D. J., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 203—212.
220. Sobieszek A., Bremel R. D., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 49—60.
221. Mrwa U., Rüegg J. C., (1975), *FEBS Letters*, **60**, 81—84.
222. Borejdo J., Oplatka A., (1976), *Pflüg. Arch.* **366**, 177—184.
223. Frederiksen D. W., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2706—2710.
224. Litten R. Z. III, Solaro R. J., Ford G. D., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 24—32.
225. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 521—530.
226. Hamoir G., (1973), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **265**, 169—181.
227. Kato N., Kubo S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 1497—1503.
228. Szent-Györgyi A. G., Cohen C., Kendrick-Jones J., (1971), *J. Mol. Biol.*, **56**, 239—258.
229. Huriaux F., (1965), *Angiologica*, **2**, 153—181.
230. Bailin G., Bárány M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 292—302.
231. Aida M., Conti G., Laszt L., Mandi B., (1968), *Angiologica*, **5**, 322—332.
232. Becker C. G., Murphy G. E., (1969), *Am. J. Pathol.*, **55**, 1—38.
233. Gröschel-Stewart U., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 322—334.
234. Kendrick-Jones J., (1973), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **265**, 183—189.

235. Léger J. J., Focant B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 166—172.
236. Wachsberger P. R., Pepe F. A., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 385—391.
237. Tataert D., Moreau O., Han K-K., Hildebrand H. F., Biserter G., (1977), *Biochimie*, **59**, 337—339.
238. Sobieszek A., Small J. V., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 75—92.
239. Mrwa U., Rüegg J. C., (1977), w *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle*, red. Casteels R., Godfraind T., Rüegg J. C., str. 353—357, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
240. Marston S. B., Taylor E. W., (1978), *FEBS Letters*, **86**, 167—170.
241. Seidel J. C., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 107—113.
242. Górecka A., Aksoy M. O., Hartshorne D. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 325—331.
243. Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **73**, 477—483.
244. Sobieszek A., (1977) w *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. Stephens N. L., str. 413—443, University Park Press, Baltimore.
245. Aksoy M. O., Williams D., Sharkey E. M., Hartshorne D. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 35—41.
246. Chacko S., Conti M. A., Adelstein R. S., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 129—133.
247. Ikebe M., Onishi H., Watanabe S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 299—302.
248. Sobieszek A., Small J. V., (1977), *J. Mol. Biol.*, **112**, 559—576.
249. DiSalvo J., Gruenstein E., Silver P., (1978), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **158**, 410—414.
250. Ikebe M., Aiba T., Onishi H., Watanabe S., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)*, **83**, 1643—1655.
251. Lebowitz E. A., Cooke R., (1979), *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**, 1489—1494.
252. Hidaka H., Naka M., Yamaki T., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 694—699.
253. Dąbrowska R., Aromatorio D. K., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1263—1272.
254. Dąbrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D. K., Hartshorne D. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 253—258.
255. Hartshorne D. J., Abrams L., Aksoy M. O., Dąbrowska R., Driska S., Sharkey E., (1977) w *The Biochemistry of Smooth Muscle*, red. Stephens N. L., str. 513—532, University Park Press, Baltimore.
256. Sherry J. M., Górecka A., Aksoy M. O., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4411—4418.
257. Onishi H., Watanabe S., (1979), *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**, 457—472.
258. Mikawa T., Toyooka T., Nonomura Y., Ebashi S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 273—275.
259. Mikawa T., Nonomura Y., Ebashi S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 1789—1791.
260. Hirata M., Mikawa T., Nonomura Y., Ebashi S., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 1793—1796.
261. Mikawa T., Nonomura Y., Hirata M., Ebashi S., Kakiuchi S., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 1633—1636.
- 261a. Mrwa U., Troschka M., Rüegg J. C., (1979), *FEBS Letters*, **107**, 371—374.
- 261b. Silver P. J., DiSalvo J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9951—9954.
262. Varga E., Köver A., Kovacs L., Jokay J., Szilágyi L., (1960), *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 179—180.



263. Finck H., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 239—246.
264. Bruggmann S., Jenny E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **412**, 39—50.
265. Finck H., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 231—238.
266. Fox A. C., Klein M. B., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **127**, 232—235.
267. Klatzo I., Horvath B., Emmart E. W., (1958), *Proc. Soc. Biol. Med.*, **97**, 135—140.
268. Gröschel-Stewart U., Schreiber J., Mahlmeister C., Weber K., (1976), *Histochemistry*, **46**, 229—236.
269. Schwartz K., Bouveret P., Sebag C., Léger J., Swynghedauw B., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **425**, 24—36.
270. Schwartz K., Bouveret P., Sebag C., (1978), *FEBS Letters*, **87**, 99—102.
271. Dąbrowska R., Szpacenko A., (1976), *Comp. Biochem. Physiol.* **5313**, 1—4.
272. Huriaux F., Focant B., (1978), *Comp. Biochem. Physiol.*, **61B**, 195—198.
273. Pliszka B., Szpacenko A., Strzelecka-Gólaszewska H., (1979), *Int. J. Biochem.*, **10**, 343—359.
274. Focant B., Huriaux F., (1976), *FEBS Letters*, **65**, 16—19.
275. Focant B., Huriaux F., Johnston J. A., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 129—133.
276. Perzanowska A., Gerday Ch., Focant B., (1978), *Comp. Biochem. Physiol.*, **60B**, 295—301.
277. Klotz C., Aumont M. C., Léger J., Swynghedauw B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **386**, 461—469.
278. Leger J., Klotz C., Cavaille F., Morotte F., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 157—161.
279. Connell J. J., (1961), *Biochem. J.*, **80**, 503—509.
280. Connell J. J., (1960), *Biochem. J.*, **75**, 530—538.
281. Hamoir G., McKenzie H. A., Smith M. B., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **40**, 141—149.
282. Ferenczi M. A., Homsker E., Trentham D. R., Weeds A. G., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 155—163.
283. Giambalvo A., Dreizen P., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **537**, 466—473.
284. Syrový I., Gaspar-Godfroid A., Hamoir G., (1970), *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **78**, 919—934.
285. Wikman-Coffelt J., Srivastava S., (1979), *J. Biochem. (Tokyo)*, **86**, 829—832.
286. Kendrick-Jones J., Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **54**, 313—326.
287. Lehman W., Kendrick-Jones J., Szent-Györgyi A. G., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 319—330.
288. Szent-Györgyi A. G., Szentkirályi E. M., Kendrick-Jones J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 179—203.
289. Bagshaw C. R., Kendrick-Jones J., (1979), *J. Mol. Biol.*, **130**, 317—336.
290. Kendrick-Jones J., Jakes R., (1976) w *International Symposium on Myocardial Failure*, red. Riecker G., Weber A., Goodwin J., str. 28—40, Ter-gensee, Munich.
291. Collins J. H., (1976), *Nature*, (London), **259**, 699—700.

292. Jakes R., Northrop F., Kendrick-Jones J., (1976), *FEBS Letters*, **70**, 229—234.
293. Krestinger R. H., Nockolds C. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313—3326.
294. Weeds A. G., Wagner P. D., Jakes R., Kendrick-Jones J., (1977) w *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*, red. Wasserman R. H., Corradino R. A., Carafoli E., Kretsinger R. H., MacLennan D. H., Siegel F. L., str. 222—231, Elsevier North-Holland Inc.
295. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 467—481.
296. Miller A., Tregear R. T., (1971) w *Contractility of Muscle Cells and Related Processes*, red. Podolsky R. J., str. 205—228, Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, New York.
297. Huxley H. E., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 361—376.
298. Lehman W., Szent-Györgyi A. G., (1975), *J. Gen. Physiol.*, **66**, 1—30.
299. Schachat F., Harris H. E., Epstein H. F., (1977), *Cell*, **10**, 721—728.
300. Schachat F., Garcea R. L., Epstein H. F., (1978), *Cell*, **15**, 405—411.
301. MacKenzie J. M., Jr., Schachat F., Epstein H. F., (1978), *Cell*, **15**, 413—419.
302. Burridge K., (1976) w *Cell Motility Conf. Cell Proliferation t. 3*, red. Goldman R., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 739—747, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
303. Kuczmarski E. R., Rosenbaum J. L., (1979), *J. Cell Biol.*, **80**, 541—555.
304. Brandon D. L., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **65**, 139—146.
305. Trifaro J. M., Ulpian C., (1976), *Neurosci.*, **1**, 483—488.
306. Creutz C. E., (1977), *Cell Tiss. Res.*, **178**, 17—38.
307. Johnson D. H., McCubbin W. D., Kay C. M., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 69—74.
308. Hesketh J. E., Aunis D., Mandel P., Devilliers G., (1978), *Biol. Cellulaire*, **33**, 199—208.
309. Hesketh J. E., Virmaux N., Aunis D., (1979), *Experientia*, **35**, 31—32.
310. Kobayashi R., Goldman R. D., Hartshorne D. J., Field J. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8285—8291.
311. Ostlund R. E., Leung J-T., Kipnis D. M., (1978), *J. Cell Biol.*, **77**, 827—836.
312. Hesketh J. E., Virmaux N., Mandel P., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **542**, 39—46.
313. Hartwig J. H., Stossel T. P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5696—5705.
314. Stossel T. P., Hartwig J. H., (1976) w *Cell Motility, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, t. 3*, red. Goldman R. D., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 529—544, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
315. Trotter J. A., Adelstein R. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781—8785.
316. Stossel T. P., Pollard T. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8288—8294.
317. Shibata N., Tatsumi N., Tanaka K., Okamura Y., Senda N., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **400**, 222—243.



318. Takeuchi K., Shibata N., Senda N., (1975), *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 93—103.
319. Boxer L. A., Stossel T. P., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 964—976.
320. Adelstein R. S., Conti M. A., Anderson W., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3115—3119.
321. Pollard T. D., Thomas S. M., Niederman R., (1974), *Anal. Biochem.*, **60**, 258—266.
322. Adelstein R. S., Conti M. A., (1975), *Nature*, **256**, 597—598.
323. Cove D. H., Crawford N., (1975), *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **3**, 123—133.
324. Niederman R., Pollard T. D., (1975), *J. Cell Biol.*, **67**, 72—92.
325. Pollard T. D., (1975) w *Molecules and Cell Movement*, red. Inoue S., Stephens R. E., str. 259—286, Raven Press, New York.
326. Pollard T. D., Fujiwara K., Niederman R., Maupin-Szamer P., (1976) w *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, t. 3, red. Goldman R. D., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 639—724, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
327. Adelstein R. S., Conti M. A., (1976) w *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, t. 3, red. Goldman R. D., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 725—738, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
328. Harris G. L. A., Crawford N., (1976), *J. Mechanochem. Cell Motil.*, **3**, 135—145.
329. Shimizu T., Mabuchi I., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 1879—1888.
330. Shimizu T., (1978), *J. Biochem. (Tokyo)*, **84**, 607—616.
331. Ash J. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 3560—3566.
332. Ostlund R. E., Pastan I., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **453**, 37—47.
333. Yerna M.-J., Aksoy M. O., Hartshorne D. J., Goldman R. D., (1978), *J. Cell Sci.*, **31**, 411—429.
334. Burridge K., (1974), *FEBS Letters*, **45**, 14—17.
335. Ostlund R. E., Pastan I., Adelstein R. S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3903—3907.
336. Miller C., Kuehl W. M., (1976), *Brain Res.*, **108**, 115—124.
337. Scordilis S. P., Anderson J. L., Pollack R., Adelstein R. S., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 940—949.
338. See Y. P., Metuzals J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7682—7689.
339. Mabuchi I., (1976), *J. Mol. Biol.*, **100**, 569—582.
340. Mabuchi I., (1976), *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 413—415.
341. Adelman M. R., Taylor E. W., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4976—4988.
342. Nachmias V. T., (1974), *J. Cell Biol.*, **62**, 54—65.
343. LeStourgeon W. M., Forer A., Yang Y.-Z., Bertram J. S., Rusch H. P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 529—552.
344. Hatano S., Owaribe K., (1976) w *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, t. 3, red. Goldman R. D., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 449—511, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
345. Jacobsen D. N., Johnke R. M., Adelman M. R., (1976) w *Cell Motility*, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, t. 3, red. Goldman R. D., Pollard T. D., Rosenbaum J. L., str. 749—770, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
346. Hatano S., Matsumura F., Hasegawa T., Takahashi S.,

- Sato H., Ishikawa H., (1979) w *Cell Motility: Molecules and Organization*, red. Hatana S., Ishikawa H., Sato H., str. 87—104, University of Tokyo Press, Tokyo.
347. Clarke M., Spudich J. A., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 209—222.
348. Mockrin S. C., Spudich J. A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2321—2325.
349. Pollard T. D., Korn E. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4682—4690.
350. Pollard T. D., Korn E. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4691—4697.
351. Maruta H., Korn E. D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6501—6509.
352. Maruta H., Korn E. D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8329—8332.
353. Pollard T. D., Stafford W. F. III., Porter M. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4798—4808.
354. Condeelis J. S., (1977), *J. Cell Sci.*, **25**, 387—402.
355. Adelstein R. S., Pollard T. D., Kuehl W. M., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2703—2707.
356. Daniel J. C., Adelstein R. S., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2370—2377.
357. Lebowitz E. A., Cooke R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5443—5447.
358. Hesketh J. E., Virmaux N., Mandel P., (1978), *FEBS Letters*, **94**, 357—360.
359. Yerna M-J., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., Goldman R. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 184—188.
360. Mulhard A., Oplatka A., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 37—40.
361. Rahmsdorf H. J., Malchow D., Gerisch G., (1978), *FEBS Letters*, **88**, 322—326.
362. Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1352—1359.
363. Hathaway D. R., Adelstein R. S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1653—1657.
364. Maruta H., Gadasi H., Collins J. H., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3624—3630.
365. Gadasi H., Maruta H., Collins J. H., Korn E. D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3631—3636.





KRZYSZTOF PAWEŁCZAK \*, BARBARA RZESZOTARSKA \*\*

## Struktura tyreoglobuliny i jej funkcja w tarczycy

### Structure of Thyroglobulin and Its Function in Thyroid Gland

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Budowa tyreoglobuliny
- III. Rola struktury tyreoglobuliny w biosyntezie hormonów tarczycy
- IV. Mechanizm biosyntezy hormonów tarczycy
- IV—1. Rola peroksydazy tarczycowej w biosyntezie hormonów tarczycy
- IV—2. Mechanizm molekularny aktu katalitycznego biosyntezy hormonów tarczycy
- IV—3. Mechanizm reakcji sprzęgania reszt jodotyrozylowych
- V. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Structure of thyroglobulin
- III. Role of the structure of thyroglobulin in thyroid hormone biosynthesis
- IV. Mechanism of the thyroid hormone biosynthesis
- IV—1. Role of thyroid peroxidase in the thyroid hormone biosynthesis
- IV—2. Molecular mechanism of catalysis of the thyroid hormone biosynthesis
- IV—3. Mechanism of coupling of iodotyrosine residues
- V. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów: MIT — 3 monoiodotyrozyna, DIT — 3,5-dijodotyrozyna, T<sub>3</sub> — 3',3,5-trijodotyronina, T<sub>4</sub> — 3',5',3,5-tetrajodotyronina (tyroksyna), Tgb — tyreoglobulina, TPO — peroksydaza tarczycowa, DIHPPA — kwas 3,5-dijodo-4-hydroksyfenylopirogronowy, ΔAla — dehydroalanina.

## I. Wprowadzenie

W połowie lat sześćdziesiątych w badaniach *in vivo* używając jodu radioaktywnego udowodniono hipotezę głoszącą, że tyreoglobulina (Tgb) jest molekularnym podłożem biosyntezy hormonów tarczycy (1, 2). Od

\* dr, Instytut Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Oleska 48, 45—052 Opole

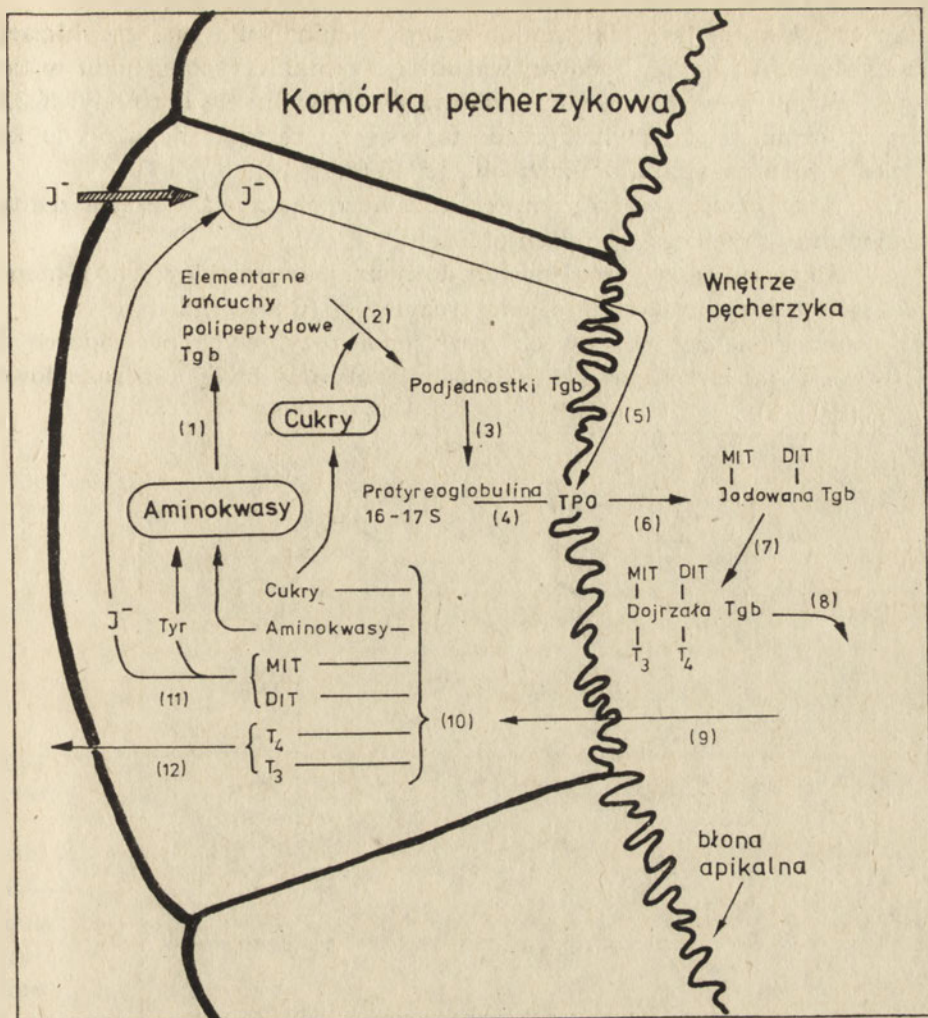
\*\* prof. dr hab., Instytut Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Oleska 48, 45—052 Opole



tego czasu datuje się żywe zainteresowanie strukturą tyreoglobuliny i jej rolą w biosyntezie hormonów (3—9). Na początku lat siedemdziesiątych zaczęto także gromadzić dowody o udziale w tym procesie peroksydazy tarczycowej (TPO) (10). Jednakże ze względu na trudność wyizolowania w stanie czystym tak tyreoglobuliny, jak i peroksydazy tarczycowej dopiero wyniki z ostatnich pięciu lat pozwalają na konstruowanie hipotez o roli struktury obydwu białek w biosyntezie hormonów tarczycy, a także na formułowanie hipotez o mechanizmach tego procesu, bardziej szczegółowych niż dotychczasowe (8, 9).

Synteza elementarnych łańcuchów polipeptydowych tyreoglobuliny ma miejsce w komórkach pęcherzykowych tarczycy, i przebiega zgodnie ze znanymi etapami biosyntezy białka (6). Następnie tyreoglobulina przemieszcza się do pęcherzyka tarczycy, gdzie ulega posttranslacyjnym modyfikacjom, podczas których, między innymi, zachodzi synteza reszt hormonów tarczycy (9, 11—13). Schemat biosyntezy i sekrecji hormonów, oparty głównie na badaniach autoradiograficznych i mikroskopii elektro-nowej, przedstawia rycina 1.

Synteza łańcuchów polipeptydowych tyreoglobuliny przebiega na polisomach szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (14) (etap 1), gdzie zaczyna się także sukcesywnie przyłączanie reszt cukrowych. Jest ono kontynuowane podczas wędrówki łańcuchów polipeptydowych przez cy-sterny retikulum i kończy się w kompleksie Golgiego (15—21) (etap 2). Agregacja podjednostek i utworzenie tzw. 16-17S-protyreoglobuliny następuje prawdopodobnie w pęcherzykach wydzielniczych (etap 3), które mechanizmem egzocytozy silnie stymulowanym przez TSH (22, 23) transportują tyreoglobulinę na zewnątrz apikalnej ściany komórki (22, 24) (etap 4). Równolegle z surowicy krwi w drodze aktywnego transportu do komórki pęcherzykowej przenoszone są jodki (25), które dzięki korzystnej różnicy potencjałów między komórką a wnętrzem pęcherzyka bardzo łatwo przenikają przez apikalną ścianę komórki (26) (etap 5). Jodowanie tyreoglobuliny przebiega w świetle pęcherzyka w pobliżu błony apikalnej komórek pęcherzykowych (22). Stwierdzono, że z apikalną ścianą komórek pęcherzykowych związany jest enzym peroksydaza tarczycowa (TPO) (24), katalizująca w obecności wody utlenionej jodowanie reszt tyrozylowych tyreoglobuliny do reszt jodotyrozylowych: 3-monojodotyrozylowej (MIT) i 3,5-dijodotyrozylowej (DIT) (etap 6) oraz sprzęganie ze sobą dwóch reszt jodotyrozylowych z utworzeniem hormonalnych reszt jodotyronylowych: 3',3,5-trijodotyronylowej ( $T_3$ ) i tyroksylowej (3',5',3,5-tetraiodotyronylowej,  $T_4$ ) (10, 27—37) (etap 7). Reakcji jodowania towarzyszy także utlenianie grup —SH do wiązań dwusiarczkowych, co prowadzi do powstania stabilnej 19S—tyreoglobuliny (6, 38). Dojrzała tyreoglobulina magazynowana jest w koloidzie pęcherzyka (39) (etap 8). Wydzielanie hormonów do krwioobiegu odbywa się poprzez endocytozę tyreoglobuliny (40, 41) (etap 9) oraz wytworzenie z lizosomami fagolizosomów, redukcję



Ryc. 1. Schemat biosyntezy i sekrecji hormonów tarczycy

(1) — synteza elementarnych łańcuchów polipeptydowych protyreglobuliny; (2) — dołączanie jednostek oligosacharydowych do elementarnych łańcuchów polipeptydowych protyreglobuliny; (3) — agregacja podjednostek i utworzenie 16-17S-protyreglobuliny; (4) — egzocytoza protyreglobuliny; (5) — transport aktywny jodków do miejsca jodowania protyreglobuliny; (6) — jodowanie reszt tyrozylowych protyreglobuliny do reszt 3-monojodotyrozylowych i 3,5-dyjodotyrozylowych; (7) — sprzężanie ze sobą dwóch reszt jodotyrozylowych z utworzeniem hormonalnych reszt jodotyronylowych: 3',3,5-trijodotyronylowych i tyroksylowych; (8) — magazynowanie dojrzałej tyreoglobuliny; (9) — endocytoza tyreoglobuliny; (10) — redukcja wiązań dwusiarczkowych tyreoglobuliny i hydroliza białka; (11) — odjodowanie jodotyrozyn; (12) — przenikanie hormonów tarczycy do płynu komórkowego.

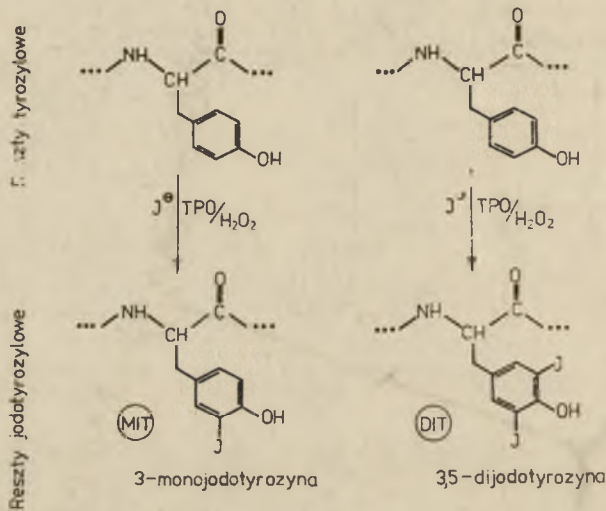
wiązań dwusiarczkowych i hydrolizę tyreoglobuliny (42) (etap 10). Produktami hydrolizy są: aminokwasy białkowe, cukry, 3,5—diiodotyrozyna, 3-jodotyrozyna, tyroksyna, 3',3,5-trijodotyronina. Jodotyrozyny ulegają odjodowaniu pod wpływem mikrosomalnej dehalogenazy jodowej (43)



(etap 11). Uwolnione jodki, aminokwasy i cukry ulegają recykliczacji. Obecność dehalogenazy jodowej warunkuje zamknięty obieg jodu w tarczycy, zwany wewnętrzną pulą jodową (44). Uwolnione hormony: 3',3,5-trijodotyronina i tyroksyna, przedostają się do zewnętrznego płynu komórkowego, a następnie do krwiobiegu (9) (etap 12).

Jak z powyższego widać, synteza reszt hormonalnych w cząsteczce tyreoglobuliny przebiega w dwóch etapach:

- jodowanie reszt tyrozylowych do reszt jodotyrozylowych: 3-monojodotyrozylowej i 3,5-dijodotyrozylowej (Ryc. 2),
- sprzężanie ze sobą dwóch reszt jodotyrozylowych prowadzące do reszt jodotyronylowych: 3',3,5-trijodotyronylowej i tyroksylowej (Ryc. 3).



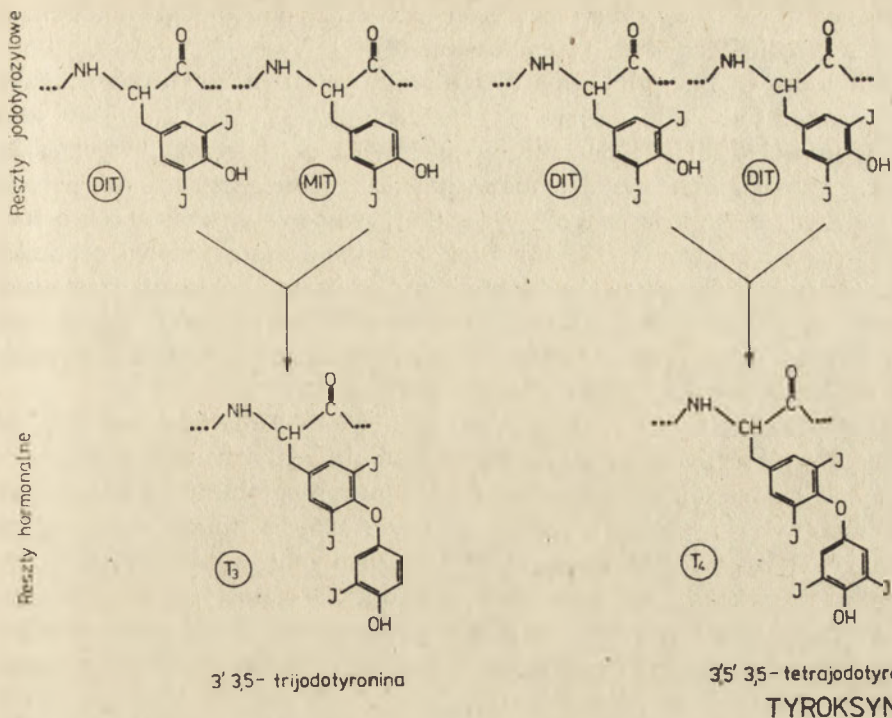
**Ryc. 2.** Jodowanie reszt tyrozylowych protyreglobuliny

Te dwa zasadnicze etapy biosyntezy reszt hormonalnych określa się dalej w artykule mianem biosyntezy hormonów tarczycy.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie stanu wiedzy o budowie tyreoglobuliny oraz danych o domniemanej roli regulatorowej tego białka w biosyntezie hormonów tarczycy i hipotez o mechanizmach biosyntezy hormonów.

## II. Budowa tyreoglobuliny

Tyreoglobulina jest głównym białkiem syntezowanym w komórkach pęcherzyków tarczycy, i w normalnym gruczole występuje w ilości 60—70 mg/g tkanki (9). Jest ona glikoproteina o masie cząsteczkowej około



**Ryc. 3.** Sprzężanie ze sobą reszt jodotyrozylowych tyreoglobuliny prowadzące do reszt hormonalnych

660 000 daltonów i o stałych sedymentacji: tyreoglobulina niezjodowana 16—17S, a zjodowana — 19S (3, 45). Przy pomocy mikroskopii elektrobowej wykazano, że niezjodowana tyreoglobulina ma kształt cylindryczny i luźną strukturę, a zjodowana — kształt elipsoidalny i strukturę upakowaną (46). Z tarczycy izoluje się także jodoproteiny o stałych sedymentacji wyższych niż 19S, w ilości 5—15% wszystkich rozpuszczalnych białek produkowanych przez komórki pęcherzyków. Przypuszcza się, że ich zawartość zależy od stanu zdrowia i diety jodowej osobnika. Są to 27S—jodoproteina o masie cząsteczkowej 1 220 000 daltonów (47) i 37S—jodoproteina o masie cząsteczkowej 1 983 000 daltonów (48). O 27S—jodoproteinie wiadomo, że jest dimerem 19S—tyreoglobuliny (49), o kształcie dwóch przylegających elipsoid (50).

Składy aminokwasowe tyreoglobulin pochodzących z tarczyc zwierząt różnych gatunków są podobne (51). Tyreoglobuliny średnio zawierają 5500 reszt aminokwasowych, w tym około 140 reszt tyrozylowych (3.4% wszystkich reszt aminokwasowych). Reszty typu kwasowego stanowią 10—15%, amidowe — 10%, hydrofobowe około 45%. Liczba reszt zasadowych jest mniejsza niż kwasowych (punkt izoelektryczny tyreoglobuliny wynosi 4.5). Na 230—250 reszt cysteinyłowych prawie wszystkie tworzą wiązania dwusiarczkowe (6, 9, 51). Podobna zawartość aminokwasów hy-



drofobowych i kształt cząsteczek sugeruje duże podobieństwo struktur drugo- i trzeciorzędowych tyreoglobulin (9).

Ilość jodu w tyreoglobulinach pochodzących z normalnych tarczyc ssaków najczęściej zamyka się w granicach 0.2—1.0%, tj. 10—50 atomów jodu/mol Tgb, a jodowaniu ulega 6—33 reszt tyrozylowych (52). Preparaty tyreoglobuliny otrzymane nawet z jednego gruczołu cechuje duża heterogenność jodowa, polegająca na występowaniu cząsteczek o różnym stopniu zjodowania (27, 53). Stan zdrowia i dieta jodowa osobnika mają decydujący wpływ na średni stopień zjodowania populacji cząsteczek tyreoglobuliny izolowanej z danego gruczołu. Z kolei stopień zjodowania jest jednym z czynników, od których zależą proporcje czterech głównych reszt jodoaminokwasowych (52, 54) (Tab. 1).

Część cukrowa w tyreoglobulinach stanowi 8—10% ich masy (9). W przebadanych, różnych gatunkowo tyreoglobulinach stwierdzono odmienne typy jednostek oligosacharydowych. Np. w tyreoglobulinie cielęcej wykryto dwa typy jednostek: krótszą o masie 1050 daltonów zawierającą mannozę i N-acetyloglukozoaminę, i dłuższą o masie 3200 daltonów zawierającą dodatkowo galaktozę i fukozę lub kwas sialowy. Cząsteczka tyreoglobuliny cielęcej ma około 9 jednostek krótszych i 14 jednostek dłuższych. Jednostki obu typów łączą się wiązaniem N-glikozydowym z resztą kwasu asparaginowego łańcucha polipeptydowego (55). W tyreoglobulinie człowieka wykryto trzeci typ jednostki oligosacharydowej, w której 10% reszt heksozoaminowych stanowi N-acetylogalaktozoamina. Jednostka ta łączy się wiązaniem O-glikozydowym z resztą serylową lub treonylową łańcucha polipeptydowego (56, 57). Ponadto w tyreoglobulinach, tak jak w większości glikoprotein (58), stwierdzono heterogenność jednostek cukrowych (57), polegającą na występowaniu obok kompletnych łańcuchów oligosacharydowych — łańcuchów niekompletnych.

Tyreoglobulina składa się z dwóch podjednostek o masach cząsteczkowych 330 000 daltonów i o stałych sedymentacji 12S. Łączą się one zarówno wiązaniami kowalentnymi, jak i niekowalentnymi (59). Niezjodowana 17S-tyreoglobulina dysocjuje całkowicie na podjednostki pod wpływem różnych czynników denaturujących, podczas gdy jodowana dysocjuje tylko częściowo (6, 54). Wiąże się to ściśle z towarzyszącym jodowaniu utlenianiem grup —SH między podjednostkami (6, 38, 60).

Do chwili obecnej o strukturze 12S-podjednostki wiadomo niewiele, ponieważ trudno jest otrzymać czyste preparaty tyreoglobuliny. Początkowo białko izolowano z gruczołów tarczycy mrożonych do  $-60^{\circ}\text{C}$ , uzyskując preparaty zanieczyszczone frakcjami polipeptydowymi o masach cząsteczkowych niższych od masy 12S-podjednostki (61—67). Po redukcji wiązań dwusiarczkowych i alkilacji grup —SH otrzymywano preparaty składające się prawie całkowicie z frakcji o masach cząsteczkowych niższych niż masa cząsteczkowa 12S-podjednostki (62, 63). Badania hydrodynamiczne frakcji głównych dawały sprzeczne wyniki sugerujące, że w

skład 12S-podjednostki wchodzi dwa, trzy lub cztery łańcuchy polipeptydowe o masach cząsteczkowych odpowiednio 160 000 (66), 110 000 (61) lub 80 000 daltonów (67). Powyższe rozbieżności, w chwili obecnej, przypisuje się degradacji białka w trakcie izolowania lub oczyszczania. Degradacja taka może zachodzić pod wpływem enzymów proteolitycznych zanieczyszczających preparaty tyreoglobuliny (65), a ułatwi ją obecność w cząsteczce miejsc szczególnie podatnych na hydrolityczne rozszczepienie enzymatyczne. Ponadto zakłada się obecność w tyreoglobulinie miejsc szczególnie podatnych na hydrolityczne rozszczepienie nieenzymatyczne (68).

W r. 1975 Vassart i wsp. (69) posługując się 33S-mRNA, wyizolowanym z tarczycy wołowej, przeprowadzili syntezę protyreglobuliny w komórkach jajowych *Xenopus laevis*. Produkt translacji był chemicznie i immunologicznie identyczny z tyreoglobuliną wołową, a po redukcji i alkilacji grup —SH okazał się elektroforetycznie jednorodny i miał ruchliwość podobną do ruchliwości 12S-podjednostki. Jego masa cząsteczkowa oznaczona przy pomocy filtracji żelowej mieściła się w granicach 270 000—340 000 daltonów. Elementarna podjednostka niezjodowanej protyreglobuliny jest więc pojedynczym łańcuchem polipeptydowym. W tym samym roku Lissitzky i wsp. (70) po raz pierwszy otrzymali z tarczyc świńskich i owczych tyreoglobulinę, w której nie wykryto frakcji niskocząsteczkowych. Białko izolowano ze świeżych gruczołów w łagodnych warunkach (temperatura 0°C, pH 7.2) i oczyszczano przy pomocy filtracji żelowej. Po redukcji wiązań dwusiarczkowych i alkilacji grup —SH uzyskano tylko jedną frakcję o ruchliwości elektroforetycznej podobnej do ruchliwości 12S-podjednostki i o masie cząsteczkowej około 310 000 daltonów. Wyniki Lissitzky'ego (70) potwierdzono dla tyreoglobuliny zwierząt innych gatunków (49, 71). 12S-podjednostka tyreoglobuliny zjodowanej jest więc także, jak elementarna podjednostka tyreoglobuliny niezjodowanej — pojedynczym łańcuchem polipeptydowym.

Enzymatyczne trawienie tyreoglobuliny z tarczyc zwierząt czterech gatunków wykazało obecność 2 moli C-końcowego dipeptydu Ser—Leu/mol Tgb i nie ujawniło, także przy użyciu metod chemicznych, żadnego N-końcowego aminokwasu. Z powyższego wyciągnięto wniosek, że łańcuchy polipeptydowe obydwu podjednostek tyreoglobuliny są jednakowe (49). Należy jednak odnotować i inne poglądy na temat tej sprawy. Badanie składu tyreoglobuliny wołowej przy pomocy równowagowej sedymentacji w gradiencie gęstości RbCl wskazuje, zdaniem autorów (72), na nieidentyczność łańcuchów polipeptydowych białka. Badanie składu tyreoglobuliny świnki morskiej przy pomocy elektroforezy w żelu poliakryloamidowym prowadzi do wniosku, że gruczoł zwierzęcia produkuje przede wszystkim jednołańcuchową podjednostkę o masie cząsteczkowej 295 000 daltonów, ale nie wyklucza, zdaniem autorów (73—75), hipotezy,



że produkuje też, chociaż w małych ilościach, jednołańcuchową podjednostkę o masie cząsteczkowej 210 000 daltonów.

Wobec faktu, że 12S-podjednostka tyreoglobuliny składa się tylko z jednego łańcucha polipeptydowego, obserwowana we wcześniejszych badaniach fragmentacja na duże polipeptydy o w przybliżeniu  $1/n$  krotnych masach cząsteczkowych sugeruje n-globularną budowę łańcucha. Badania najczystszych, z dotychczas otrzymanych preparatów tyreoglobuliny wydają się potwierdzać to przypuszczenie. Łagodne krótkotrwałe trawienie subtylopeptydazą tych preparatów, uprzednio zredukowanych i alkilowanych, daje z jednego moła 12S-podjednostki dwa mole polipeptydu o masie cząsteczkowej 140 000 daltonów i dwa mole polipeptydu o masie cząsteczkowej 20 000 daltonów. Wynik ten nasuwa wniosek, że 12S-podjednostka składa się z dwóch globularnych domen o masie cząsteczkowej 140 000 daltonów połączonych fragmentami polipeptydowymi o masie cząsteczkowej 20 000 daltonów (76). Długotrwała dializa wodą preparatów tyreoglobuliny, najprawdopodobniej zanieczyszczonych enzymami proteolitycznymi, daje frakcje polipeptydowe o masach cząsteczkowych 17 500, 37 400 i 70 800 daltonów. Frakcje te mają składy aminokwasowe i cukrowe podobne do siebie i do tyreoglobuliny oraz jednakową kolejność pierwszych siedmiu od N-końca aminokwasów. Wydaje się więc, że 12S-podjednostka ma więcej niż dwa globularne obszary — być może aż dwadzieścia — i to nawet identyczne (77). Brak reaktywności około 40% reszt tyrozylowych z N-acetyloimidazolem i tetranitrometanem w szerokim zakresie temperatury od 0° do 70°C wskazuje na trwałość konformacyjną globularnych domen białka (78).

### III. Rola struktury tyreoglobuliny w biosyntezie hormonów tarczycy

Pe reakcji jodowania kazeiny, fibrynogenu i tyreoglobuliny, prowadzonej w obecności peroksydazy tarczycowej, stwierdzono, że najwyższą wydajność hormonów tarczycy daje tyreoglobulina, zwłaszcza przy niskich stopniach jodowania odpowiadających fizjologicznym (29, 31). Po jodowaniu tyreoglobuliny o przypuszczalnie niezmienionej lub mało zmienionej strukturze natywnej wydajność ta wynosi 1.4—2.5 reszt jodotyronylowych/mol Tgb (34, 79). Natomiast po jodowaniu tyreoglobuliny o strukturze zmienionej pod działaniem czynników denaturujących takich jak, mocznik czy guanidyna, lub na skutek niektórych operacji w izolowaniu lub oczyszczaniu białka otrzymuje się znacznie mniej hormonów (29, 31, 79). Np. tyreoglobulina izolowana z gruczołów przechowywanych w stanie zamrożonym, w którym następuje ograniczona proteoliza, nie wpływająca na właściwości fizykochemiczne białka, daje po jodowaniu trzykrotnie mniej hormonów niż tyreoglobulina z gruczołów świeżych (79).

Przy poliglobularnej budowie tyreoglobuliny szczególnie istotny w biosyntezie hormonów tarczycy jest udział jej warstwy powierzchniowej. Dlatego charakterystyka reszt tyrozylowych i jodoaminokwasowych tego obszaru struktury białka była przedmiotem licznych badań (6, 27, 29, 30, 34, 78, 80—88). Przy pomocy chemicznej modyfikacji i spektrofotometrycznego miareczkowania tyreoglobuliny stwierdzono, że reszty 3,5-dijodotyrozylowe i jodotyronylowe są całkowicie wyeksponowane do roztworu, podczas gdy większość reszt 3-monojodotyrozylowych jest tylko częściowo wyeksponowana i niereaktywna w dalszym jodowaniu (6, 78, 86, 87). Należy więc sądzić, że jodowanie reszt tyrozylowych do 3,5-dijodotyrozylowych i sprzężanie ze sobą dwóch reszt jodotyrozylowych z utworzeniem reszt hormonalnych, przebiega na resztach całkowicie wyeksponowanych, jodowanie natomiast do reszt 3-monojodotyrozylowych — na resztach tylko częściowo wyeksponowanych, tj. na resztach o przesłoniętej jednej pozycji orto pierścienia fenolowego (3, 78).

Tabela 1

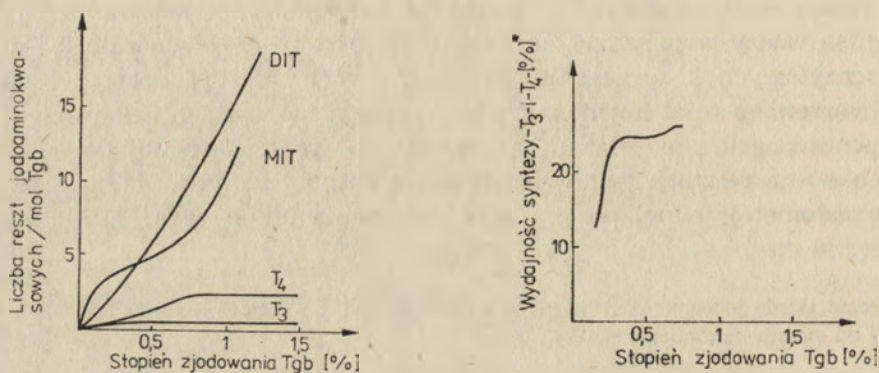
Zależność składu jodoaminokwasowego tyreoglobuliny (52) i wydajności syntezy hormonów tarczycy od stopnia zjodowania białka *in vivo*

Stopień zjodowania % J atomy J/mol Tgb		Liczba reszt jodoaminokwasowych mol/mol Tgb				Wydajność syntezy reszt hormonalnych $\frac{2(T_3 + T_4) \cdot 100\%}{MIT + DIT + 2(T_3 + T_4)}$
		MIT	DIT	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	
0.15	7.6	3.3	1.4	0.1	0.3	14.5
0.31	16.2	4.1	3.6	0.3	1.0	25.2
0.37	19.1	4.6	4.5	0.5	1.0	24.8
0.56	28.2	4.9	6.8	0.5	1.6	24.7
0.59	30.9	6.0	7.6	0.7	1.8	27.9
0.75	39.4	6.7	10.0	0.5	2.8	28.3
0.85	44.0	8.1	11.9	0.7	2.5	—
1.04	54.0	11.0	15.1	0.8	2.6	—
1.10	56.7	8.4	17.8	0.5	2.8	—
1.17	61.1	12.1	19.0	0.6	2.3	—

Jak widać z ryciny 4 (sporządzonej na podstawie danych zawartych w tabeli 1), kształty krzywych zależności liczby poszczególnych reszt jodoaminokwasowych od stopnia zjodowania tyreoglobuliny *in vivo* (52, 54, 89) są bardzo charakterystyczne. Podobne kształty mają także krzywe odpowiednich zależności po enzymatycznym jodowaniu tyreoglobuliny *in vitro* (34). Krzywa reszt 3-monojodotyrozylowych ma w przedziale średnich stopni zjodowania przebieg zbliżony do poziomego oraz punkt przegięcia. Stosunek bardziej aktywnej 3',3,5-trijodotyroniny do tyroksyny staje się tym niższy im wyższy jest stopień zjodowania. Krzywe obu reszt hormonalnych zdążają do plateau, które w przypadku 3',3,5-trijodotyroniny zaczyna się przy stopniu zjodowania 0.35%, a w przypadku



tyroksyny — przy stopniu zjodowania 0.75<sup>0</sup>%. Z kolei, jak widać z ryciny 5 (Tab. 1), kształt krzywej zależności wydajności syntezy reszt hormonalnych od stopnia zjodowania jest również charakterystyczny. W przedziale niskich stopni zjodowania do 0.31<sup>0</sup>% wydajność ta gwałtownie rośnie wraz ze wzrostem liczby atomów jodu. Po dostatecznej akumulacji jodu, w przedziale umiarkowanych stopni zjodowania 0.31—0.75<sup>0</sup>%, synteza hormonów przebiega w przybliżeniu ze stałą wydajnością, około 25<sup>0</sup>%.



**Ryc. 4.** Zależność składu jodoaminokwasowego tyreoglobuliny od stopnia jej zjodowania *in vivo* (52)

**Ryc. 5.** Zależność wydajności syntezy hormonów tarczycy od stopnia zjodowania tyreoglobuliny *in vivo* (\* wydajność syntezy liczona tak jak w tabeli 1)

W przedziale tym obserwuje się lekki spadek wydajności przy stopniu zjodowania, przy którym ma miejsce przegięcie krzywej reszt 3-monojodotyrozylowych (Ryc. 4), a następnie lekki wzrost do poziomu maksymalnego, około 28<sup>0</sup>%, przy stopniu zjodowania 0.75<sup>0</sup>%. Przy tej zawartości jodu tworzy się od trzech do czterech reszt jodotyronylowych/mol Tgb, a dalsze jodowanie tyreoglobuliny nie daje już wzrostu tej liczby (Tab. 1). Synteza reszt hormonalnych ustaje więc (Ryc. 4 i 5), a tyreoglobulina po spełnieniu roli molekularnego podłoża syntezy hormonów, przejmuje funkcję ich magazynu oraz funkcję magazynu nadwyżek jodu pod postacią reszt jodotyrozylowych (52, 54) (Ryc. 4). Powyższe obserwacje sugerują wzajemne zależności między z jednej strony procesami jodowania reszt tyrozylowych i sprzęgania ze sobą reszt jodotyrozylowych, a z drugiej strony — strukturą trzeciorzędową tyreoglobuliny (52). Sugestię tę popierają inne badania, w których stwierdzono zmianę struktury trzeciorzędowej tyreoglobuliny w wyniku reakcji przebiegających na bocznych łańcuchach reszt aminokwasowych białka (46, 90).

Po reakcji jodowania tyreoglobuliny *in vitro* w obecności peroksydazy tarczycowej stwierdzono, przy pomocy metody równowagowej sydemantacji w gradiencie gęstości RbCl, homogenność jodową (z dokładnością do

trzech atomów jodu) otrzymanych preparatów. W celu bliższej charakterystyki tego zjawiska, jodowano określoną ilością  $^{131}\text{J}$ - ekwimolarną mieszaninę tyreoglobuliny niezjodowanej i niskozjodowanej izotopem  $^{125}\text{J}$ -. Po reakcji oba rodzaje cząsteczek miały ten sam poziom zjodowania. Jodowanie mieszaniny cząsteczek o większej heterogenności jodowej prowadziło także do wyrównania końcowego stopnia zjodowania. Drugim izotopem jodowały się w sposób uprzywilejowany reszty tyrozylowe cząsteczek tyreoglobuliny niezjodowanej lub niskozjodowanej. Wobec tego wyciągnięto wniosek (27), że istnieje ściśle określony sekwencyjny porządek jodowania reszt tyrozylowych tyreoglobuliny, co sugeruje subtelne różnice w ich reaktywności, których źródłem powinny być z kolei różnice otoczenia aminokwasowego tych reszt. Jeżeli jednak założy się, że tyreoglobulina zbudowana jest z jednakowych globularnych domen, w których otoczenie aminokwasowe reszt tyrozylowych powinno być też jednakowe, bardziej przekonującym tłumaczeniem obserwowanego wyrównania stopnia zjodowania w jodowaniu *in vitro* populacji cząsteczek tyreoglobuliny heterogennej jodowo wydaje się tłumaczenie następujące. Jak już wspomniano, tyreoglobulina niezjodowana ma luźną strukturę, a tyreoglobulina zjodowana — strukturę upakowaną (46). Być może więc, każdemu aktowi jodowania tyreoglobuliny towarzyszą zmiany konformacyjne wewnątrz cząsteczki prowadzące stopniowo do coraz większego wzrostu upakowania struktury. Zanik heterogenności jodowej tyreoglobuliny w enzymatycznym jodowaniu *in vitro* wynikałby wobec tego z uprzywilejowania jodowania cząsteczek o luźniejszej strukturze. Wniosek ten wydają się popierać najnowsze wyniki badania procesu jodowania tyreoglobuliny w skrawkach tarczycy. Mianowicie: stwierdzono uprzywilejowanie jodowania cząsteczek tyreoglobuliny nowosyntezowanej (91, 92), a więc niezjodowanej protyreglobuliny o luźnej strukturze.

Jeżeli założy się, że zmiany konformacyjne tyreoglobuliny są jednym z czynników sterujących jodowaniem, to ich charakter powinien wpływać na skład jodoaminokwasowy. Porównanie zawartości poszczególnych jodoaminokwasów w frakcjach tyreoglobuliny dysocjujących na 12S-podjednostki wydaje się potwierdzać tę sugestię. Frakcje niedysocjujące, składające się więc z cząsteczek, w których 12S-podjednostki łączą się wiązaniami dwusiarczkowymi, zawierają więcej reszt hormonalnych i 3-monojodotyrozylowych, a mniej reszt 3,5-dijodotyrozylowych niż frakcje dysocjujące o tych samych stopniach zjodowania (54). Większą liczbę reszt hormonalnych i odwrócenie proporcji w liczbach reszt jodotyrozylowych w cząsteczkach niedysocjujących w porównaniu do dysocjujących można tłumaczyć tym, że większy stopień upakowania ich struktury sprzyja reakcji sprzęgania ze sobą reszt jodotyrozylowych, a ogranicza reakcję jodowania.

Na podstawie przedstawionych w niniejszym rozdziale danych sformułowano pogląd, że za specyficzność przebiegu obydwu reakcji składających



się na proces biosyntezy hormonów tarczycy odpowiedzialna jest przede wszystkim struktura tyreoglobuliny, która te procesy reguluje (27, 30, 31, 54). Nie kwestionując strukturalnego dostosowania tyreoglobuliny do pełnienia funkcji molekularnego podłoża biosyntezy hormonów, przy różnych stężeniach jodków w tarczycy, formułuje się ostatnio także i inny pogląd, a mianowicie, że za omawianą specyficzność w dużej mierze odpowiedzialna jest peroksydaza tarczycowa, katalizująca procesy biosyntezy hormonów tarczycy (93).

#### IV. Mechanizm biosyntezy hormonów tarczycy

##### IV—1. Rola peroksydazy tarczycowej w biosyntezie hormonów tarczycy

Jeszcze do r. 1976 udział peroksydazy tarczycowej w poszczególnych etapach procesu biosyntezy hormonów tarczycy wydawał się niejasny (9). Ostatnio jednak wykazano bez wątpliwości, że enzym ten katalizuje zarówno reakcję jodowania niektórych reszt tyrozyłowych tyreoglobuliny do reszt jodotyrozyłowych, jak i reakcję sprzęgania ze sobą niektórych jej reszt jodotyrozyłowych prowadzącą do utworzenia reszt jodotyronylo-  
wych (34, 93).

Badając reakcję syntezy reszt hormonalnych w obecności znanych peroksydaz: peroksydazy tarczycowej, peroksydazy chrzanowej, laktoperoksydazy i chloroperoksydazy, stwierdzono, że wszystkie wymienione enzymy zdolne są do katalizowania reakcji jodowania reszt tyrozyłowych tyreoglobuliny, a trzy pierwsze z nich — do katalizowania reakcji sprzęgania ze sobą jej reszt jodotyrozyłowych (30, 88, 94, 95). Peroksydaza tarczycowa nie wydaje się więc mieć specyficzności absolutnej. Jednakże w stosunku do pozostałych enzymów katalizuje syntezę reszt hormonalnych z najwyższą wydajnością, w najszerszym zakresie pH oraz z maksymalną szybkością tak reakcji jodowania, jak i sprzęgania przy stężeniu jonów wodorowych jednakowym dla obydwu reakcji i najbliższym fizjologicznemu (pH ~ 7.4) (34, 93). Np. stwierdzono, że chociaż peroksydaza chrzanowa daje wysoką wydajność jodowania, joduje tylko pewną frakcję z puli hormonogennych reszt tyrozyłowych oraz że katalizuje wolniej niż peroksydaza tarczycowa sprzęganie ze sobą hormonogennych reszt jodotyrozyłowych otrzymanych w drodze jodowania tyreoglobuliny w obecności peroksydazy tarczycowej (93). Testowanie specyficzności trzech peroksydaz: tarczycowej, chrzanowej i laktoperoksydazy, w reakcji jodowania di— i tripeptydów zawierających tyrozynę, wykazało, że enzymem zdecydowanie najbardziej efektywnym w tej reakcji modelowej jest peroksydaza tarczycowa, a ponadto, że z przebadanych związków najszybciej jodowały się Gly-Glu-Tyr i Glu-Tyr-Glu (96). Opisane dane dowodzą, że spośród przebadanych peroksydaz najwyższą specyficzność względem tyreoglobuliny tak w reakcji jodowania, jak i sprzęgania ze

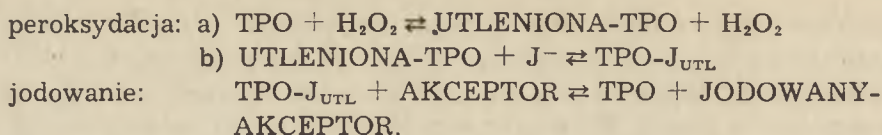
sobą jej reszt jodotyrozylowych, ma peroksydaza tarczycowa, i sugerują, że enzym ten bierze udział w selekcjonowaniu reszt hormonogennych (35, 93, 96), którym przypisuje się specyficzne otoczenie aminokwasowe (97).

P o m m i e r i wsp. (33), badając kinetykę biosyntezy hormonów tarczycy katalizowanej peroksydazą tarczycową stwierdzili opóźnienie reakcji sprzęgania względem jodowania. Wielkość opóźnienia wynosiła kilka minut i zależała od stosunku stężenia wody utlenionej i jodków. Przy stałym stosunku stężeń tych dwóch reagentów wielkość opóźnienia była stała (98). Powodem opóźnienia nie była konieczność akumulacji określonej liczby reszt jodotyrozylowych, gdyż nawet po bardzo szybkim przyłączeniu 55 atomów J/mol Tgb nie od razu obserwowano sprzęganie ze sobą reszt jodotyrozylowych (33). Fakty te sugerują występowanie peroksydazy tarczycowej w dwóch konformacjach: jednej — katalizującej jodowanie reszt tyrozylowych tyreoglobuliny i drugiej — katalizującej sprzęganie ze sobą jej reszt jodotyrozylowych (33, 93). Stwierdzono, że reakcja sprzęgania wymaga obecności jodków, a stymulujący efekt obserwowano przy stężeniach  $10^{-6}$ — $10^{-4}$  M/dcm<sup>3</sup>. W stężeniach powyżej  $10^{-4}$  M/dcm<sup>3</sup> jodki hamowały zarówno reakcją jodowania, jak i reakcją sprzęgania (33). Stwierdzono także wpływ wolnej 3,5-dijodotyrozyny na obydwie procesy, przy czym w stężeniach  $10^{-8}$ — $10^{-7}$  M/dcm<sup>3</sup> nie wpływa ona na reakcję jodowania, a jedynie przyspiesza dwukrotnie szybkość reakcji sprzęgania, natomiast przy stężeniach rzędu  $10^{-4}$  M/dcm<sup>3</sup> — hamuje całkowicie tak reakcję jodowania, jak i sprzęgania (33, 99). Nieco później T a u r o g i wsp. (100) wykazali, że wolna 3,5-dijodotyrozyna w stężeniach  $10^{-7}$ — $10^{-6}$  M/dcm<sup>3</sup> stymuluje nie tylko szybkość sprzęgania, ale także zwiększa wydajność reszt hormonalnych i stosunek 3',3,5-trijodotyroniny do tyroksyny. Efekty te obserwowano przy różnych stopniach zjodowania. Nie stwierdzono, aby wolna 3,5-dijodotyrozyna wbudowywała się w hormony. W tyreoglobulinie pacjentów z chorobą Gravesa—Basedowa, u których zawartość wolnej 3,5-dijodotyrozyny w gruczole tarczycy jest prawdopodobnie większa niż w gruczole normalnym, stwierdzono także wyższy stosunek 3',3,5-trijodotyroniny do tyroksyny niż w tyreoglobulinie o tym samym stopniu zjodowania pochodzącej z normalnej tarczycy (100, 101). Wyżej opisane dane prowadzą do wniosku, że peroksydaza tarczycowa jest enzymem regulatorowym, który, w zależności od stężenia jodków i wolnej 3,5-dijodotyrozyny, może kontrolować reakcje jodowania reszt tyrozylowych tyreoglobuliny i sprzęgania jej reszt jodotyrozylowych.

#### IV—2. Mechanizm molekularny aktu katalizacyjnego biosyntezy hormonów tarczycy

Na podstawie ogólnie przyjętego poglądu o przebiegu etapu peroksydacji w procesach katalizowanych przez peroksydazy (11, 102—108), katalizowanej przez peroksydazę tarczycową reakcji jodowania przypisuje się następujący przebieg:





Po inkubacji peroksydazy tarczycowej z  $^{125}\text{J}^-$  w obecności wody utlenionej Davidson i wsp. (36, 37) otrzymali kompleks  $\text{TPO-}^{125}\text{J}_{\text{UTL}}$ , który oczyszczano przez filtrację żelową na Sephadexie G-25. Kompleks reagował z takimi substratami jak: Glu-Tyr-Glu, 3-monojodotyrozyna i  $\text{J}^-$ . Pierwszy z nich charakteryzował się najwyższą stałą substratową  $K_m 3.10^{-6}\text{M}$ . Kompleks  $\text{TPO-}^{125}\text{J}_{\text{UTL}}$  jodował modelowy peptyd w układzie nie zawierającym wody utlenionej, i w reakcji nie wykryto wolnego jodu. Sugeruje się, że w kompleksie formą aktywną jodu jest jon jodoniowy  $\text{J}^\oplus$ . Podstawą tej sugestii jest fakt, że kompleks peroksydaza chrzanowa— $\text{J}_{\text{UTL}}$  katalizował modelową reakcję testową, której chemiczny przebieg wymagał obecności aktywnej formy jodu pod postacią  $\text{J}^\oplus$  (109). Natura kompleksu  $\text{TPO-J}_{\text{UTL}}$  jest w chwili obecnej przedmiotem badań (36, 37).

Brak znajomości struktury tyreoglobuliny i peroksydazy tarczycowej utrudnia konstrukcję hipotez o mechanizmie molekularnym aktu katalizy jodowania i sprzęgania. Pierwsze, fragmentaryczne informacje próbuje się więc uzyskać w reakcjach syntezy hormonów prowadzonych na modelach peptydowych (110) lub na białkach o znanej konformacji (111). Np. badając steryczne uwarunkowania hormonogenezy stwierdzono, że w reakcjach jodowania i sprzęgania katalizowanych peroksydazą tarczycową najwyższą wydajność hormonów otrzymuje się w cząsteczkach peptydów, w których pierścienie fenolowe dwóch reszt tyrozylowych ułożone są najprawdopodobniej sandwiczowo i antyrównolegle (110).

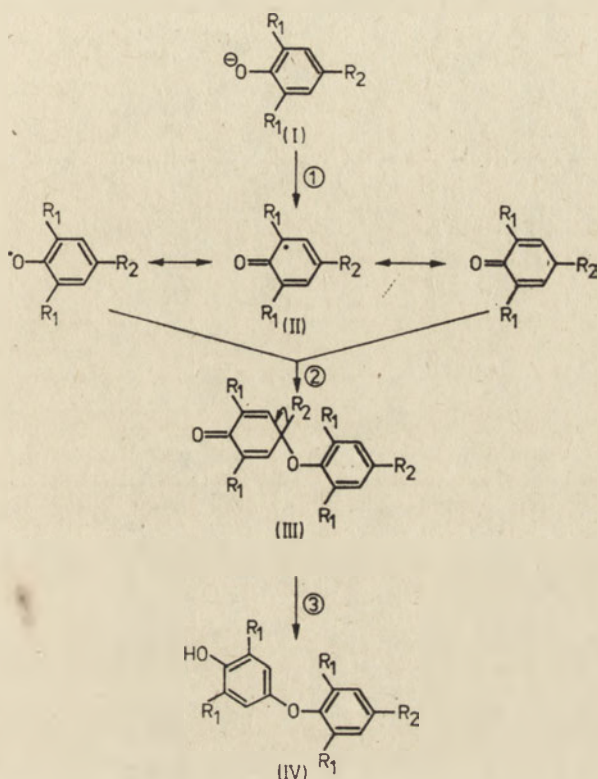
#### IV—3. Mechanizm reakcji sprzęgania reszt jodotyrozylowych

Chemiczna reakcja oksydacyjnego sprzęgania fenoli ma charakter rodnikowy (112, 113), a peroksydazy katalizują reakcje przeniesienia jednoelektronowego (102—104, 114). Wnioskuje się stąd, że i mechanizm elektronowy reakcji hormonogenezy jest także rodnikowy.

Już w r. 1939 von Mutzenbecher (115) otrzymał tyroksynę w reakcji sprzęgania ze sobą dwóch cząsteczek 3,5-dijodotyrozyny. Dla reakcji tej Johnson i Tewkensbury (116) oraz Harington (117) zaproponowali mechanizm rodnikowy (Ryc. 6). Pierwszym etapem reakcji jest utlenianie jonów fenolanowych 3,5-dijodotyrozyny (I) do wolnych rodników (II), które w drugim etapie sprzęgają się do przejściowego nietrwałego eteru semichinoidowego (III). Eter ten w trzecim etapie rozszczepia się na tyroksynę (IV) i aminokwas trójwęglowy. Pośrednim dowodem na poparcie powyższego mechanizmu tworzenia tyroksyny była synteza analogów eteru semichinoidowego jako trwałych związków che-

micznych (IIIA), w reakcji rodników 2,4,6-tri(tert-butylo)fenolowych (IIa) z różnymi analogami i pochodnymi tyrozyny (Ib) oraz ich przemiana w analogi tyroksyny (IVA) (112, 113) (Ryc. 7).

Inny chemiczny model formowania tyroksyny, także o rodnikowym mechanizmie elektronowym, zaproponował w r. 1956 Hilmann (118), otrzymując hormon z wydajnością 30% w reakcji 3,5-dijodotyrozyny z jej



**Ryc. 6.** Hipotetyczny mechanizm sprzęgania ze sobą dwóch cząsteczek 3,5-dijodotyrozyny prowadzącego do cząsteczki tyroksyny (116, 117)

R<sub>1</sub> = J

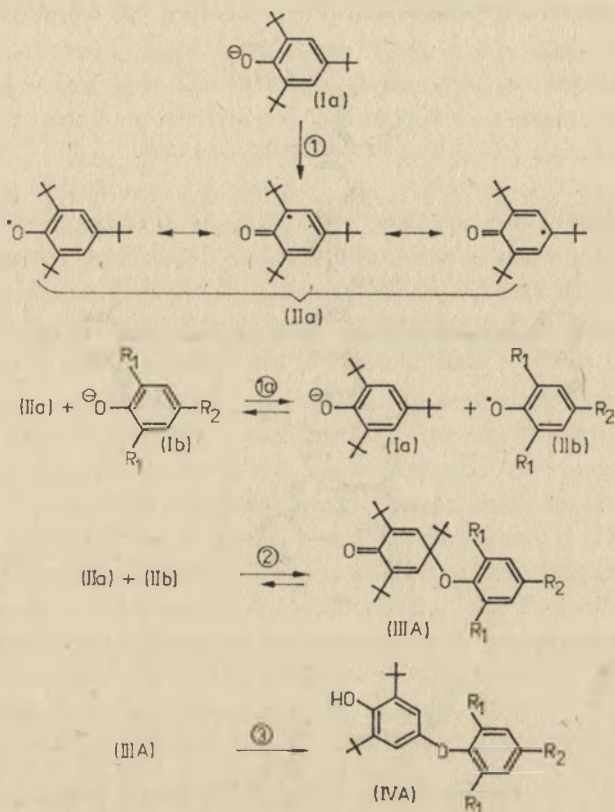
R<sub>2</sub> = CH<sub>2</sub>CH(NH<sub>2</sub>)COOH

ketoanalogiem, tj. kwasem 3,5-dijodo-4-hydroksyfenylopirogronowym (DIHPPA) jako donorem pierścienia jodofenolowego. Obecność tlenu i katalitycznych ilości rodników zwiększała wydajność syntezy do 30% (119). Wykazano następnie, że formą aktywną DIHPPA jest wodoronadtlenek (120), jednak mechanizmu jego sprzęgania z 3,5-dijodotyrozyną nie udało się wyjaśnić (121).

Szybka i wydajna synteza tyroksyny z DIHPPA sugerowała jego udział w biosyntezie hormonów tarczycy (119). DIHPPA w warunkach



*in vitro* reagował z resztami jodotyrozylowymi tyreoglobuliny do reszt jodotyronylowych (122, 123). W wyciągach z tarczycy wykryto w niewielkich ilościach DIHPPA (124) i 3,5-dijodo-4-hydroksybenzaldehyd, najprawdopodobniej produkt jego redukcji (125) oraz enzymy: transaminazę



Ryc. 7. Mechanizm syntezy analogów tyroksyny (IVA) (112, 113)

T +  = tert-butyl

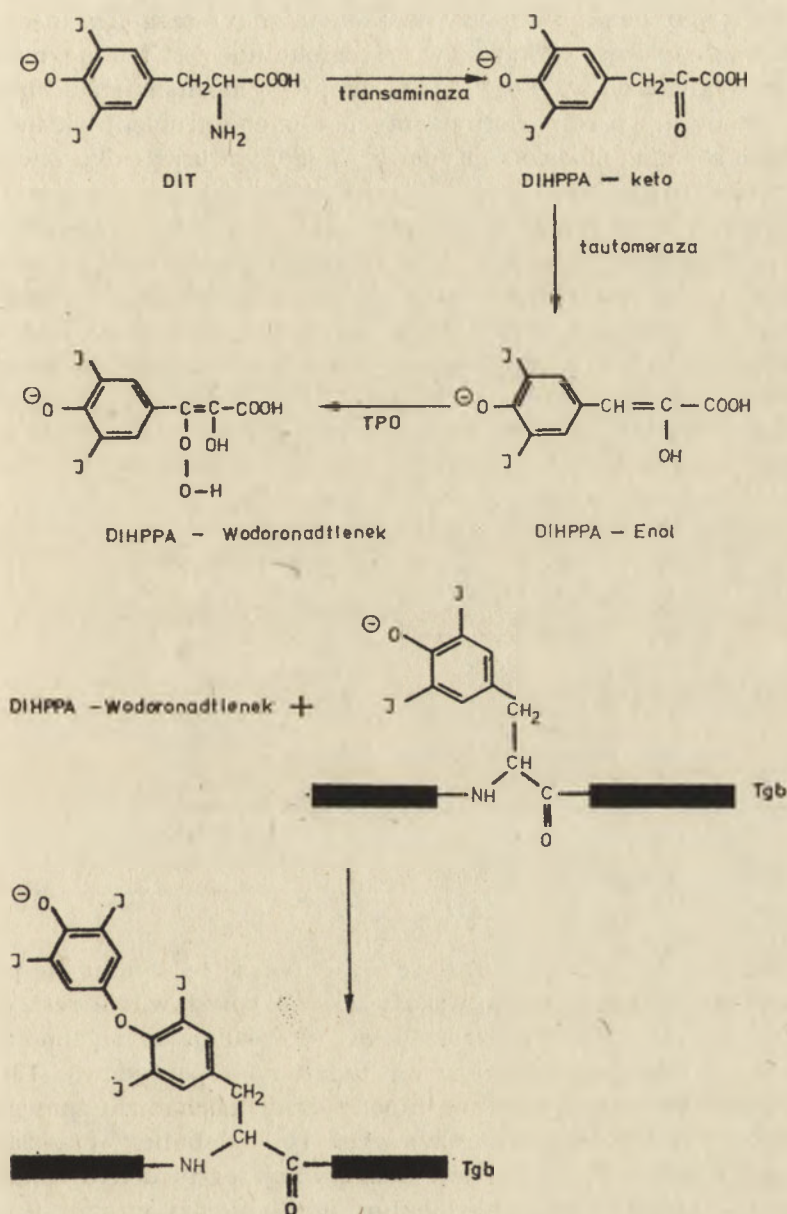
$R_1 = \text{H, Br, J}$

$R_2 = \text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5, (\text{CH}_2)_2\text{COOC}_2\text{H}_5, (\text{CH}_2)_2\text{COOH},$   
 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOC}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOH},$   
 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NHCOCH}_3)\text{COOC}_2\text{H}_5, \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

katalizującą dezaminację 3,5-dijodotyrozyny do DIHPPA i tautomerazę katalizującą przemianę DIHPPA w formę enolową (125). Wobec tego zaproponowano drogę biosyntezy tyroksyny z udziałem DIHPPA, przedstawioną na rycinie 8 (126).

Jednak wobec licznych faktów bezpośredniego — bez udziału DIHPPA — formowania reszt tyroksylowych w reakcjach prowadzonych na modelach peptydowych, białkowych i tyreoglobulinie, przeważa pogląd (8, 9),

że syntezie reszt hormonalnych w warunkach fizjologicznych można przypisać mechanizm zaproponowany przez Johnsona i Tewkensa i Bur'y'ego (116). Przyjmuje się, że proces ten przebiega trój etapowo: — tworzenie rodników katalizowane przez peroksydazę tarczycową,

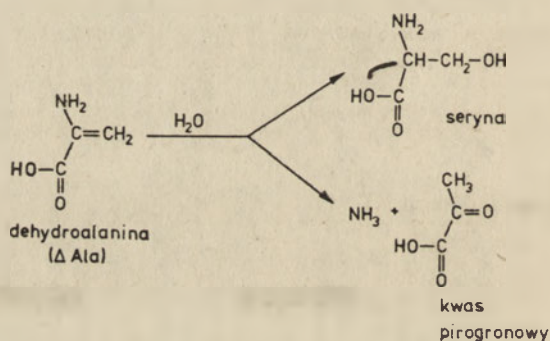


Ryc. 8. Hipotetyczny mechanizm biosyntezy reszty tyroksylowej w cząsteczce tyreoglobuliny z udziałem kwasu 3,5-dijodo-4-hydroksyfenylopirogronowego (126)



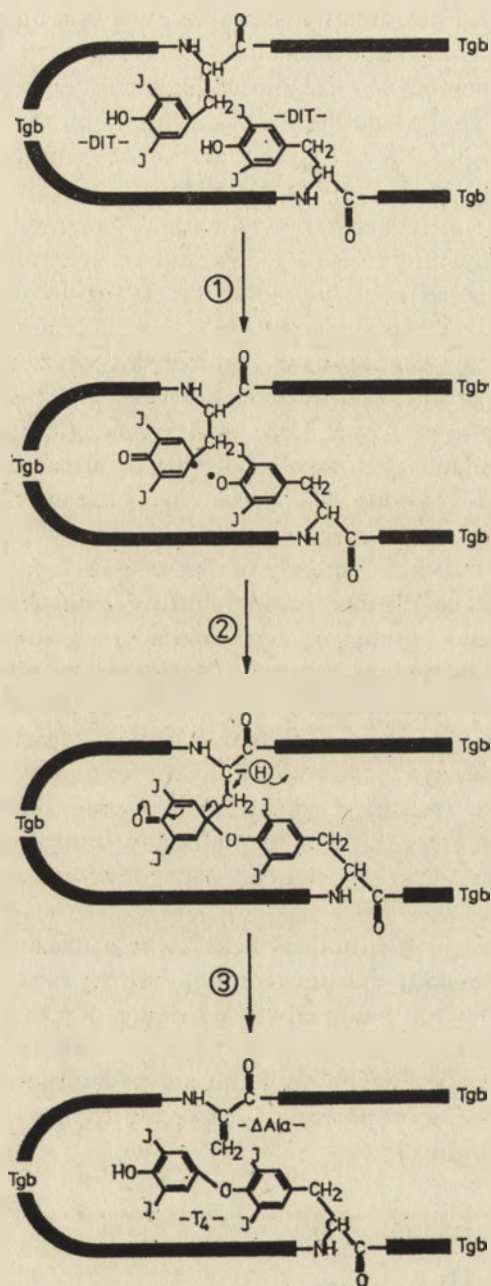
- sprzężenie ze sobą dwóch rodników prowadzące do nietrwałego eteru semichinoidowego,
- rozszczepienie eteru semichinoidowego na resztę jodotyronylową i resztę aminokwasu trójwęglowego (8, 9).

Jednoznaczna identyfikacja reszty aminokwasu trójwęglowego, pozostającej w łańcuchu peptydowym po sprzęgnięciu ze sobą dwóch pierścieni jodofenolowych, pozwoliłaby na podanie dalszych szczegółów mechanizmu tej reakcji. Jednak jej wykrycie w tyreoglobulinie jest trudne, między innymi, ze względu na wielkość tego białka, jego nieznaną strukturę i małą liczbę formowanych reszt hormonalnych. Dlatego problem badano przede wszystkim stosując modele peptydowe. W jednym przypadku stwierdzono powstawanie reszty serylowej (127), a w drugim — rozszczepienie łańcucha peptydowego (128). Ostatnio udało się wykazać rozszczepienie łańcucha peptydowego na amid i resztę kwasu pirogronowego po reakcji sprzężania ze sobą reszt jodotyrozylowych w cząsteczce tyreoglobuliny (129). Opisane powyżej wyniki nie są sprzeczne, jeżeli założy się, że podczas formowania reszty hormonalnej powstaje równolegle nietrwała reszta dehydroalanylowa, która w wyniku hydratacji może przechodzić w resztę serylową lub ulegać rozszczepieniu z utworzeniem amidu i kwasu



Ryc. 9. Reakcje hydratacji dehydroalaniny

pirogronowego (9, 68, 129, 130) (Ryc. 9). Hipotezę tę wydają się potwierdzać uzyskane ostatnio dane, wskazujące na powstawanie reszty dehydroalanylowej obok reszty tyroksylowej w reakcji sprzężania ze sobą dwóch reszt 3,5-dijodotyrozylowych związanych peptydowo (131, 132). Na tej podstawie zaproponowano hipotetyczny mechanizm sprzężania ze sobą dwóch reszt 3,5-dijodotyrozylowych tyreoglobuliny, przedstawiony na rycinie 10 (131, 132). Obecność reaktywnej reszty dehydroalanylowej w łańcuchu peptydowym tyreoglobuliny może, między innymi, tłumaczyć trudności (68) z wyizolowaniem tego białka o niezmienionej strukturze pierwotnej.



**Ryc. 10.** Hipotetyczny mechanizm biosyntezy reszty tyroksylowej w cząsteczce tyreoglobuliny (131, 132).



## V. Uwagi końcowe

Tyreoglobulina jest dużym i skomplikowanym białkiem. Niezadawajająca metodyka izolowania i oczyszczania tego typu makrocząsteczek znacznie hamuje postęp w określaniu ich struktury. W ostatnich latach udało się ustalić, że 12S-podjednostka tyreoglobuliny stanowi pojedynczy łańcuch polipeptydowy. Jest on sfałdowany najprawdopodobniej w globularne jednakowe domeny. Osiągnięciem z ostatnich lat jest także stwierdzenie, że peroksydaza tarczycowa jest enzymem najlepiej dostosowanym do katalizowania reakcji jodowania reszt tyrozylowych tyreoglobuliny i sprzęgania ze sobą jej reszt jodotyrozylowych z utworzeniem reszt hormonalnych. Wydaje się ponadto, że w hormonogenezie enzym ten pełni również funkcję regulatorową, której dotychczas znanymi efektorami są jodki i wolna 3,5-dijodotyrozyna. Drugim regulatorem wydajności reszt hormonalnych jest, być może, sama tyreoglobulina. Jej struktura przy niskich poziomach zjodowania pozwala na utrzymanie wyższego stosunku 3',3,5-trijodotyroniny do tyroksyny, natomiast przy poziomach umiarkowanych zapewnia stałą wydajność syntezy reszt hormonalnych, a przy wyższych — czyni również z białka magazyn jodu.

Brak znajomości struktury tyreoglobuliny i peroksydazy tarczycowej utrudnia konstrukcję hipotez o mechanizmie molekularnym aktu katalizacyjnego syntezy hormonów tarczycy. Natomiast w chwili obecnej dosyć jasny jest pogląd na mechanizm reakcji sprzęgania ze sobą dwóch reszt jodotyrozylowych, gdyż można go badać posługując się modelami peptydowymi. Nagromadzono pośrednie dowody przemawiające za rodnikowym mechanizmem reakcji. Gromadzi się również dane popierające pogląd, że po utworzeniu reszty hormonalnej, w miejscu donorowej reszty jodotyrozylowej pozostaje w łańcuchu peptydowym tyreoglobuliny reszta dehydroalanylowa.

W najbliższej przyszłości należy oczekiwać oznaczenia liczby globularnych domen w 12S-podjednostce tyreoglobuliny i określenia ich struktury. Badania te powinny umożliwić poznanie otoczenia aminokwasowego reszt 3-monojodotyrozylowych, 3,5-dijodotyrozylowych, 3',3,5-trijodotyrozylowych i tyroksylowych. Wydaje się to istotne dla weryfikacji hipotezy o ściśle określonym porządku sekwencyjnym jodowania reszt tyrozylowych tyreoglobuliny.

W czasie pisania pracy autorzy korzystali z pomocy finansowej Instytutu Chemii Organicznej PAN, w ramach problemu MR-1.12.1.6.10.

ZAAKCEPTOWANO DO DRUKU 26.5.1980

## PIŚMIENICTWO

1. Rosenberg L. L., Goldman M., Laroche G., Dimick K. M., (1964), *Endocrinology*, **74**, 212—225.
2. Taurog A., (1964), *Proc. Staff. Meeting Mayo Clin.*, **39**, 569—585.
3. Edelhoeh H., (1965), *Rec. Progr. Horm. Res.*, **21**, 1—31.
4. Tong W., (1971), w *The Thyroid*, 3 wyd., red. Werner S. C., Ingbar S. H., str. 24—40, Harper and Row N. Y.
5. Gagelgans A. J., Gajdina G. A., Golber E. M., Kandor W. L., Mirahmedow A. K., Sałachow N. C., Turakułow Ja. H., (1972), *Tirjeoidnyje gormony*, 1 wyd., red. Turakułow Ja. H., str. 5—130; FAN, Taszkent.
6. Salvatore G., Edelhoeh H., (1973), w *Hormonal Proteins and Peptides*, red. Li Ch. H., t. 1, str. 201—241, Academic Press, Londyn.
7. Turakułow Ja. H., Babaew T. A., Saatow T., (1974), *Jodoproteiny szczytowodnoy żelezy*, 1 wyd., str. 3—117; FAN, Taszkent.
8. Taurog A., (1974) w *Handbook of Physiology*, 1 wyd., red. Greep R. O., Astwood E. B., t. 3, str. 101—133; American Physiological Society, Waszyngton, D. C.
9. Lissitzky S., (1976), w *Pharmac. Ther. B.*, red. Harshman J. M., Bray G. A., t. 2, str. 219—246; Pergamon Press, Londyn.
10. Taurog A., (1970), *Rec. Progr. Horm. Res.*, **26**, 189—247.
11. De Groot L., (1977), *Intern. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **403**, 139—144.
12. Edelhoeh H., Jacob R., (1978), w *Thyroid*, 4 wyd., red. Werner S. C., Ingbar S. H., str. 62—78; Harper and Row Medical Department, Hagerstown.
13. van Herle A. J., Vassart G., Dumont J. E., (1979), *New Engl. J. Med.*, **301**, 239—249.
14. Vassart G., Dumont J. E., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **32**, 322—330.
15. Bouchilloux S., Chabaud O., Michel-Bechet M., Ferrand M., Athouel-Itaon A. M., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 314—320.
16. Haddad A., Smith M. D., Herscovics A., Nadler N. J., Lo-blond C. F., (1971), *J. Cell. Biol.*, **49**, 856—876.
17. Ekholm R., Björkman U., (1972), *Ann. Clin. Res.*, **4**, 64—69.
18. Bouchilloux S., Chabaud O., Ronin C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 401—420.
19. Torresani J., Chabaud O., Ronin C., Bouchilloux S., Lissitzky S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 421—436.
20. Roques M., Torresani J., Bouchilloux S., Lissitzky S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 437—447.
21. Chabaud O., Bouchilloux S., Ronin C., Ferrand M., (1974), *Biochimie*, **56**, 119—130.
22. Ekholm R., Engström C., Ericson L. E., Melander A., (1975), *Endocrinology*, **97**, 337—346.
23. Ekholm R., Ericson L. E., Engström C., Öfverholm T., (1976), *Intern. Congr. Ser.—Excerpta Medica*, **378**, 130—133.
24. Tice L. W., (1974), *Endocrinology*, **95**, 421—433.
25. Baghi N., Fawcett D. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **318**, 235—251.
26. Woodbury D. M., Woodbury J. W., (1963), *J. Physiol. Chem.*, **169**, 553—567.



27. Gavaret J. M., Déme D., Nunez J., Salvatore G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3281—3285.
28. Lamas L., Dorris M. L., Taurog A., (1972), *Endocrinology*, **90**, 1417—1426.
29. Lamas L., Taurog A., Salvatore G., Edelhoeh H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2732—2737.
30. Taurog A., Dorris M. L., Lamas L., (1974), *Endocrinology*, **94**, 1286—1294.
31. Lamas L., Taurog A., (1977), *Endocrinology*, **100**, 1129—1136.
32. Pommier J., Déme D., Nunez J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **37**, 406—414.
33. Pommier J., Déme D., Fimiani F., Gavaret J. M., Nunez J., (1976), *Intern. Cong. Ser. — Excerpta Medica*, **378**, 139—142.
34. Déme D., Gavaret J. M., Pommier J., Nunez J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 7—13.
35. Déme D., Pommier J., Nunez J., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **540**, 73—82.
36. Davidson B., Neary J. T., Strout H. V., Maloof F., Soodak M., (1976), *Intern. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **378**, 143—146.
37. Davidson B., Neary J. T., Strout H. V., Maloof F., Soodak M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **522**, 318—326.
38. Vecchio G., Claar G. M., Salvatore G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4908—4913.
39. Smeds S., (1972), *Endocrinology*, **91**, 1288—1299.
40. Woolman S., Lowenstein J. E., (1973), *Endocrinology*, **93**, 248—252.
41. Simon C., Dang J., Miquelis R., Bastiani P., (1971), *Acta Endocrinol.*, **68**, 367—376.
42. Kawada J., Katota T., Yoschimura Y., Kurata M., (1975), *Endocrinology*, **96**, 1196—1200.
43. Rosenberg I. N., (1970), *Metabolism*, **19**, 785—798.
44. Simon C., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 565—567.
45. Nunez J., Mauchamp J., Macchia V., Roche J., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **107**, 247—256.
46. Berg G., (1975), *J. Ultrastruc. Res.*, **53**, 113—118.
47. Salvatore G., Vecchio G., Salvatore M., Cahnmann H. J. Robbins J., (1965), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2935—2943.
48. van der Walt B., van Jaarsveld P., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 786—791.
49. Marriq C., Rolland M., Lissitzky S., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 143—149.
50. Biörkman U., Berg G., Ekholm R., (1976), *Intern. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **378**, 173—176.
51. Spiro M. J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5820—5826.
52. Tarutani O., Kondo T., Horiguchisho K., (1975), *Endocrinology*, **Japan**, **22**, 389—397.
53. Ui N., Tarutani O., Kondo Y., Tamura H., (1961), *Nature*, **191**, 1199—1201.
54. Sorimachi K., Ui N., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **342**, 30—40.
55. Spiro G. R., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 1603—1610.
56. Rawitch A. B., Liao T. H., Pierce J. G., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **160**, 360—367.

57. Arima T., Spiro M. J., Spiro R. G., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1825—1835.
58. Winzler R. J., (1973), w *Hormonal Proteins and Peptides*, red. Li Ch. H., t. 1, str. 1—15, Academic Press, N. Y., Londyn.
59. Edelhoeh H., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 1326—1334.
60. Edelhoeh H., Carlomango M. S., Salvatore G., (1969), *Arch Biochem. Biophys.*, **134**, 264—265.
61. Pierce J. G., Rawitch A. B., Brown M. D., Stanley P. G., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **111**, 247—257.
62. Rolland M., Lissitzky S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 316—336.
63. Spiro M. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4446—4460.
64. Cramarossa L., Andreoli M., Schneider A., Edelhoeh H., (1971), *Endocrinology*, **89**, 741—748.
65. Rolland M., Lissitzky S., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **427**, 596—707.
66. De Crombrugge B., Pitt-Rivers R., Edelhoeh H., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2766—2773.
67. Lissitzky S., Rolland M., Reynaud J., Savary J., Larsy S., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **4**, 464—471.
68. Rzeszotarska B., Pawełczak K., (1979), *Zeszyty Naukowe WSP w Opolu, Chemia*, **3**, 93—99.
69. Vassart G., Refetoff G., Brocas H., Dinsart C., Dumont J. E., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3839—3843.
70. Lissitzky S., Mauchamp J., Reynaud J., Rolland M., (1975), *FEBS Letters*, **60**, 359—363.
71. Chebath J., Chabaud O., Bečarevič A., Cartouzou G., Lissitzky S., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 243—252.
72. van der Walt B., Kotze B., van Jarsveld P. P., Edelhoeh H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1853—1858.
73. Haerberli A., Bilstad J., Edelhoeh H., Rall J. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7294—7299.
74. Haerberli A., Salvatore G., Edelhoeh H., Rall J. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7836—7841.
75. Burkhardt A. E., Berman M., Haerberli A., Rall J. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1476—1483.
76. Marriq C., Stein A., Rolland M., Lissitzky S., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 275—283.
77. Itagaki E., Arisawa M., Hosoya T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 597—606.
78. Itagaki E., Hosoya T., (1978), *Endocrinol. Japan.*, **25**, 43—53.
79. Maurizis J. C., Marriq C., Michelot J., Rolland M., Lissitzky S., (1979), *FEBS Letters*, **102**, 82—86.
80. Edelhoeh H., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2778—2787.
81. Edelhoeh H., Lippoldt R. E., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2788—2794.
82. Robbins J., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 182—188.
83. Nunez J., Mauchamp J., Pommier J., Cirkovič T., Roche J., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 761—768.
84. Van Zyl A., Edelhoeh H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2423—2427.
85. De Crombrugge D., Edelhoeh H., Beckers C., de Visscher M., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5681—5685.
86. Edelhoeh H., Perlman R. L., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2008—2011.



87. Malan P. G., Edelhoeh H., (1970), *Biochemistry*, **9**, 3205—3214.
88. Pommier J., Sokoloff L., Nunez J., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 497—506.
89. Gavaret J. M., Pommier J., D eme D., Julien M. F., Nunez J., (1975), *Horm. Metab. Res.*, **7**, 166—172.
90. Berg G., Bi rkman U., Ekholm R., (1976), *Intern. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **378**, 169—172.
91. Matsukawa S., Hosoya T., (1979), *J. Biochem. (Tokyo)* **85**, 1009—21.
92. Matsukawa S., Hosoya T., (1979), *J. Biochem. (Tokyo)* **86**, 199—212.
93. Viron A., Pommier J., Nunez J., (1979), *Eur. J. Biochem.* **102**, 549—554.
94. Pommier J., De Prailaune S., Nunez J., (1972), *Biochimie (Paris)* **54**, 483—492.
95. Taurog A., Howells E. M., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1329—1339.
96. Krinsky M. M., Fruton J. S., (1971), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 935—940.
97. Dunn J. T., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5954—5961.
98. D eme D., Pommier J., Nunez J., (1976), *Eur. J. Biochem.* **70**, 435—440.
99. D eme D., Fimiani E., Pommier J., Nunez J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 329—336.
100. Taurog A., Nakashima T., (1978), *Endocrinology*, **103**, 632—640.
101. Izumi M., Larsen P. R., (1977), *J. Clin. Invest.*, **59**, 1105—1112.
102. Morrison M., Schonbaum G. R., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 861—888.
103. Whitaker J. R., (1972), *Principles of Enzymology for the Food Science*, 1 wyd., str. 591—609; Marcel Dekker Inc., N. Y.
104. Saunders B. C., (1973), w *Inorganic Biochemistry*, red. Eichhorn G. L., t. 2, str. 988—1021; Elsevier, Amsterdam.
105. Bj rksten F., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 396—406.
106. Bj rksten F., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 407—416.
107. Chaig R., Rand-Meir T., Makino R., Hager L. P.,; (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6340—6346.
108. Nunez J., Pommier J., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 114—118.
109. Aleksander N. M., (1976), *Intern. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **378**, 134—138.
110. Cahnmann H. J., Pommier J., Nunez J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**, 5333—5335.
111. Taylor S. W., (1975), praca doktorska, Avail Xerox Univ. Microfilms, Nr 76-4947, Ann Arbor, Michigan.
112. Matsuura T., Cahnmann H. J., (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2055—2062.
113. Matsuura T., Nishinaga A., (1962), *J. Org. Chem.*, **27**, 3072—3075.
114. Ingraham L.: L.,; (1966), w *Mechanizmy reakcji biochemicznych*, 1 wyd., str. 82—86; PWN, Warszawa.
115. Von Mutznebecher P., (1939), *Hoppe-Seyler's Zeitschrift f r physiol. Chemie*; **261**, 253—256.
116. Johnson T. B., Tewkensbury L. B., (1942), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **28**, 73—76.
117. Harington C. R., (1944), *J. Chem. Soc.*, 193—201.
118. Hilmann G., (1956), *Z. Naturf.*, **11 B**, 424—430.

119. Meltzer R. I., Stanaback R. J., (1961), *J. Org. Chem.*, **26**, 1977—1979.
120. Nishinaga A., Cahnmann J. H., Kon H., Matsuura T., (1968), *Biochemistry*, **7**, 388—397.
121. Nishinaga A., Cahnmann H. J., (1973), *J. Chem. Soc.*, 757—759.
122. Toi K., Salvatore G., Cahnmann H. J., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 523—531.
123. Ogawara H., Cahnmann H. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 328—338.
124. Surks M. J., Weinbach S., Volpert E. M., (1968), *Endocrinology*, **82**, 1156—1162.
125. Haney J. F. B., Lissitzky S., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 557—559.
126. Blasi F., Fragomele F., Covelli J., (1969), *Endocrinology*, **85**, 542—551.
127. Sela M., Sarid S., (1956), *Nature*, **178**, 540—541.
128. Pitt-Rivers R., James A. T., (1958), *Biochem. J.*, **70**, 173—176.
129. Gavaret J. M., Cahnmann H. J., Nunez J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11218—11222.
130. Thyroid Hormones, (1975), 1 wyd. red. Turakulow Ya. Kh, str. 31; Consultants Bureau, N. Y.
131. Pawełczak K., (1979), praca doktorska.
132. Pawełczak K., Rzeszotarska B., (1981), Proceedings of the 16<sup>th</sup> European Peptide Symposium, Helsingør, Denmark, red. Brunfeldtk, w druku.





TADEUSZ PACUSZKA \*, ROY M. BRADLEY \*\*

## Mechanizm działania toksyny *Vibrio cholerae* — cholerażenu

### Mechanism of Action of Cholera Toxin

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Toksyna *Vibrio cholerae* — cholerażen
  - II—1. Podjednostka A
  - II—2. Podjednostki B
  - II—3. Budowa cholerażenu
- III. Mechanizm działania cholerażenu
  - III—1. Kinetyka aktywacji cykazy adenylowej przez cholerażen
    - III—2.1. Gangliozydy jako receptory cholerażenu
    - III—2.2. Rola reszty oligosacharydowej i lipidowej gangliozydu  $G_{M1}$  w reakcji z cholerażenem
  - III—3. Wiązanie się cholerażenu z błonami i zapasowe receptory
  - III—4. Interakcja cholerażenu z błoną komórkową
  - III—5. Stechiometryczny model działania cholerażenu
  - III—6. Czynniki niezbędne do aktywacji cykazy adenylowej przez cholerażen
  - III—7. Enzymatyczny model działania cholerażenu
  - III—8. Cholerażen jako enzym
  - III—9. ADP-rybozylacja białek G/F układu cykazy adenylowej
  - III—10. Hamowanie aktywności GTP-azowej układu cykazy adenylowej

#### Contents

- I. Introduction
- II. Cholera toxin — cholerażen
  - II—1. A Subunit
  - II—2. B Subunits
  - II—3. The structure of cholerażen
- III. Mechanism of action of cholerażen
  - III—1. Kinetics of adenylate cyclase activation by cholerażen
    - III—2.1. Gangliosides as receptors of cholerażen
    - III—2.2. The role of oligosaccharide and ceramide moieties of  $G_{M1}$  ganglioside in its reaction with cholerażen

\* dr, Zakład Radiobiologii i Ochrony Zdrowia, Instytut Badań Jądrowych, ul. Do-rodna 16, 03-195 Warszawa .

\*\* B. Sc. N.I.N.C.D.S., National Institutes of Health, Bethesda, Md. 20205, U.S.A.



- III—3. Cholera binding to plasma membranes and spare receptors
- III—4. Interactions between cholera toxin and cell membrane
- III—5. Stechiometric model of cholera toxin action
- III—6. Cofactors necessary for the activation of adenylate cyclase by cholera toxin
- III—7. Enzymatic model of cholera toxin action
- III—8. Cholera toxin as an enzyme
- III—9. ADP-ribosylation of G/F proteins of adenylate cyclase system
- III—10. Inhibition of the GTP-ase function of adenylate cyclase system

Wykaz stosowanych skrótów: gangliozyd  $G_{M1}$ - $\beta$ -galaktozylo/1  $\rightarrow$  3/ $\beta$ -N-acetylogalaktozaminilo/1  $\rightarrow$  4/[ $\alpha$ -N-acetylneuraminylo/2  $\rightarrow$  3/] $\beta$ -galaktozylo/1  $\rightarrow$  4/ $\beta$ -glukozylo/1  $\rightarrow$  1/ceramid; GppNHp — guanozyna 5'/ $\beta$ - $\gamma$  imino/trójfosforan.

## I. Wstęp

Cholera, najczęściej wymieniana w języku polskim jednostka chorobowa, manifestuje się ostrą biegunką prowadzącą do odwodnienia i śmierci organizmu. Filippo Pacini w roku 1854 (cyt. za 1) wykrył, że chorobę tę powoduje bakteria *Vibrio cholerae* (Przecinkowiec cholery). Erich Koch w 1887 roku (cyt. za 2) wysunął hipotezę, że bezpośrednią przyczyną choroby jest wydzielana przez bakterie toksyna. Sugestię tę, uznano po wielu latach za słuszną (3, 4).

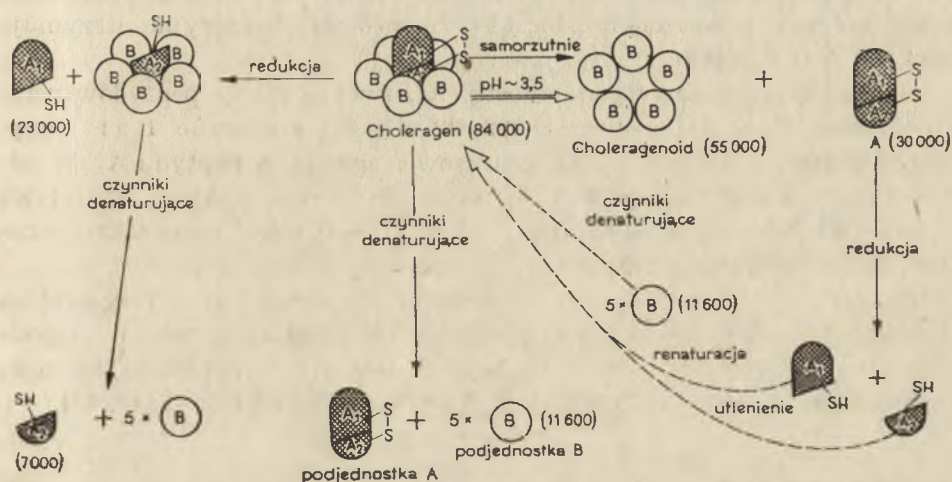
W ciągu ostatnich 10 lat okazało się, że toksyna *Vibrio cholerae*, zwana choleraenem, jest: 1. białkiem o niekonwencjonalnej budowie, które reaguje z błoną komórkową rozpoznając na jej powierzchni receptor — gangliozyd  $G_{M1}$ , 2. lektyną bakteryjną aglutynującą liposomy i komórki, 3. uniwersalnym aktywatorem cyklazy adenylowej zwierzęcych błon komórkowych, 4. enzymem katalizującym ADP-rybozylację białek regulatorowych układu cyklazy a także, 5. odczynnikiem do nabycia z firmy Schwarz-Mann, Orangeburg, N. Y.

Jako odczynnik choleraen bywa stosowany do zwiększania stężenia cAMP w komórkach i wywoływania tą drogą różnych efektów biologicznych, pozwala na ocenę cyklazy adenylowej w preparatach błon a także umożliwia badanie rozmieszczenia, ruchliwości w błonie i metabolizmu swojego receptora — gangliozydu  $G_{M1}$ . Działając poprzez układ cyklazy adenylowej choleraen jest niezwykle efektywny: kilka a być może nawet jedna jego cząsteczka jest w stanie zmienić metabolizm komórki. Podobnie skuteczne są jedynie hormony a także niektóre inne toksyny.

Własności choleraenu oraz mechanizm jego działania przedstawiono w szeregu prac poglądowych (2, 5—14). W *Postęпах Biochemii* zagadnienie to zostało częściowo omówione w artykule Gardasa (15).

## II. Cholerażen

Cholerażen jest białkiem wydzielanym przez bakterie do podłoża (5). W ciągu ostatnich lat opracowano szereg metod izolowania i oczyszczania tego białka (6, 7, 16—25). Cholerażen otrzymano w formie krystalicznej (26,27), co pozwoliło na badanie jego struktury metodą dyfrakcji promieni X (27). Cholerażen ma masę cząsteczkową około 84 000 daltonów (22, 28—30), chociaż niektórzy autorzy stwierdzali nieco niższe (31) lub wyższe (32) wartości. Chemicznie jest to białko proste, zbudowane wyłącznie z aminokwasów (28), które pod wpływem różnych czynników rozpada się na podjednostki (20, 22, 28—30, 32—38) Ryc. 1. Cząsteczkę cholerażego-



Ryc. 1. Budowa cholerażenu wg Gilla (8) i rozpad cholerażenu na podjednostki.

A<sub>1</sub> — peptyd A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> — peptyd A<sub>2</sub>, A — podjednostka A, B — podjednostka B.

Za zgodą autora i wydawnictwa.

Zmodyfikowano na podstawie: 22, 29, 32, 36, 38, 40, 46.

nu tworzy jedna podjednostka A i fragment B, w którego skład wchodzi kilka (20, 29, 30) najprawdopodobniej pięć (29, 32, 40, 41) podjednostek B. Podjednostki A i B połączone są ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi.

Podczas oczyszczania toksyny *Vibrio cholerae*, poza jej natywną formą — cholerażenem, otrzymano także mniejsze, podobne antygenowo białko — cholerażenoid (17, 28). Cholerażenoid powstaje w wyniku oddysocjowania od cząsteczki cholerażenu podjednostki A (28, 29, 40, 42) i ma masę cząsteczkową około 55 000. Wzór cholerażenu można zapisać jako A(B)<sub>5</sub>, a cholerażenoidu (B)<sub>5</sub>. Cholerażenoid nie wykazuje aktywności biologicznej właściwej natywnej toksynie (28) a efekty jego działania są jedynie wynikiem wiązania z receptorami błon komórkowych (43). Przyjmuje się, że aktywność biologiczną cholerażenu warunkuje podjednostka A, a wią-



zanie do błon komórek — fragment B (2, 7—14). Ostatnio Honda i Finkelstein (44) otrzymali zmutowany szczep bakterii *Vibrio cholerae* syntetyzujący wyłącznie nieaktywną formę (cholragenoid) toksyny.

### II—1. Podjednostka A

Podjednostka A o masie cząsteczkowej około 30 000 daltonów składa się z dwu peptydów:  $A_1$  o masie 23 000 i  $A_2$ , 7000 daltonów, połączonych ze sobą mostkiem dwusiarczkowym (22, 29, 30, 40, 45) (ryc. 1). Najprawdopodobniej podjednostka A syntetyzowana jest przez bakterie jako pojedynczy polipeptyd zawierający wewnątrzłańcuchowy mostek dwusiarczkowy, który po przecięciu cząsteczki przez proteazy bakteryjne utrzymuje peptydy  $A_1$  i  $A_2$  (46).

Skład aminokwasowy podjednostki A i tworzących ją peptydów ustalony został przez wielu autorów (29, 32, 41, 47), a ostatnio Lai i wsp. (48) przedstawili sekwencję aminokwasów fragmentów peptydu  $A_1$ . W odpowiednich warunkach peptyd  $A_1$  może aktywować cyklazę adenylową w układach bezkomórkowych (podrozdział III—6), a być może także w całych komórkach (51, 53, 54).

Peptyd  $A_2$  jest elementem łączącym podjednostkę A z fragmentem B cząsteczki cholragenu i jest niezbędny do renaturacji toksyny z podjednostek (36, 40). Rozmieszczenie peptydów tworzących cholragen można przedstawić jako:  $(5 \times B)NH_2\text{-Met-}A_2\text{-S-S-}A_1\text{-COOH}$  (40, 41, 45, 48).

### II—2. Podjednostki B

Masa cząsteczkowa podjednostki B wyliczona z jej składu aminokwasowego a także wyznaczona innymi metodami (22) wynosi 11 600 daltonów. Strukturę pierwszorzędową tej podjednostki tworzą 103 reszty aminokwasowe (55—58), przy czym miejsca 9 i 86 zajmują reszty cysteiny połączone dość opornym na redukcję mostkiem dwusiarczkowym (40, 59).

Przyjmuje się, że podczas interakcji cholragenu z błoną komórkową podjednostki B wiążą się z receptorami — cząsteczkami gangliozydu  $G_{M1}$  (6—14). W reakcji tej biorą, być może, udział reszty lizylove podjednostek B (60).

Reakcji cholragenu z gangliozydem  $G_{M1}$  (50, 61), a także otrzymanym z niego oligosacharydem (31), towarzyszy przesunięcie spektrum fluorescencji w kierunku krótszych fal (*blue shift*). Zjawisko to wynika ze zmian konformacji podjednostek B. Wydaje się, że każda z podjednostek B cholragenu lub cholragenoidu może wiązać jedną cząsteczkę gangliozydu lub oligosacharydu (14, 31).



### II—3. Budowa cholera genu

Najprawdopodobniej cząsteczka cholera genu zbudowana jest z pięcioczłonowego pierścienia podjednostek B, wewnątrz którego zanurzona peptydem A<sub>2</sub>, znajduje się podjednostka A (29, 32, 40) (Ryc. 1). Cholera genoid, który nie ma podjednostki A, ma kształt pustego wewnątrz pierścienia. Obie te (lecz także i inne) formy obserwowano w mikroskopie elektronowym (38).

Budowę cholera genu potwierdzono odtwarzając jego biologicznie aktywne cząsteczki z rozdzielonych podjednostek (22, 36, 40, 59). W niektórych przypadkach renaturacja przebiegała z dużą wydajnością (36).

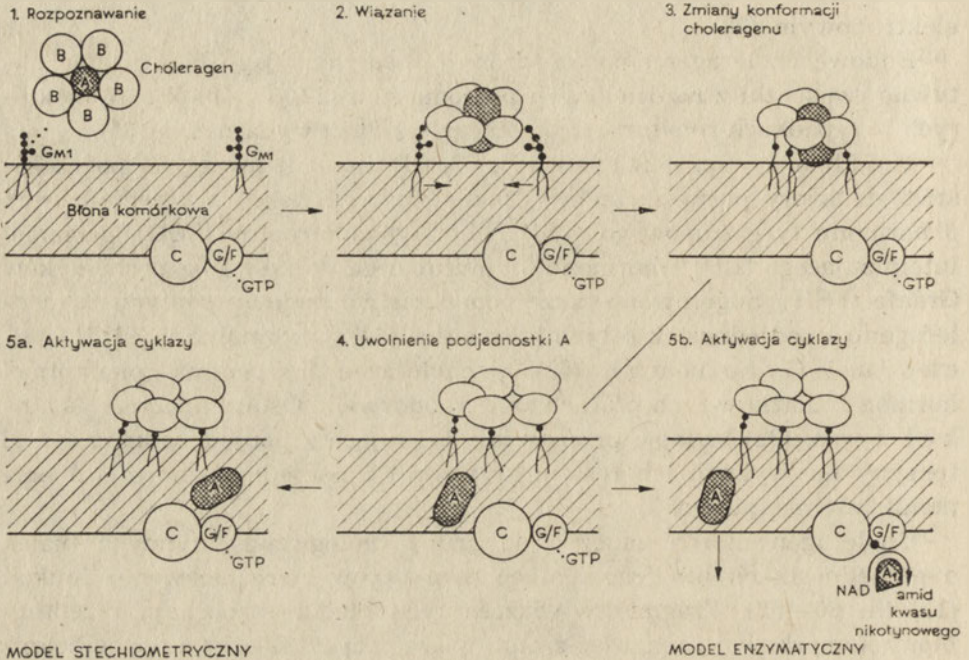
Mullin i wsp. (62) i inni (55, 63, 64) zwrócili uwagę na podobieństwo struktury pierwszorzędowej podjednostki B toksyny i podjednostek  $\beta$  hormonu tyreotropowego (TSH), choriogonadotropiny (hCG), hormonu luteinizującego (LH) i hormonu stymulującego dojrzewanie pęcherzyków Graafa (FSH). Sugerowano także podobieństwo budowy peptydu A<sub>1</sub> cholera genu i podjednostek  $\alpha$  tych hormonów (64). Oryginalna myśl Hirschorn i Greenough (65), że cholera gen przypomina „pierwotny” hormon znalazła w tych pracach szeroki oddźwięk. Ostatnio jednak Markel i wsp. (32) badając przeciwciała reagujące z podjednostkami A i B toksyny nie wykryli ich reakcji krzyżowej z podjednostkami  $\alpha$  i  $\beta$  hormonu luteinizującego.

Cholera gen można zaliczyć do grupy biologicznie czynnych białek o podjednostkach lub fragmentach dwu typów i zróżnicowanej funkcji (11, 14, 66—68). Fragmenty wiążące tych białek rozpoznają receptory błony komórkowej i reagując z nimi wiążą całą cząsteczkę z powierzchnią komórki. Fragmenty aktywne może następnie wywoływać właściwy efekt biologiczny np. poprzez stymulację cyklazy lub po przeniknięciu do wnętrza komórki zmieniać jej procesy życiowe.

### III. Mechanizm działania cholera genu

W 1970 r. Schafer i wsp. (69) zaobserwowali wzrost stężenia cAMP w komórkach śluzówki jelita pod wpływem cholera genu, który w późniejszych badaniach okazał się uniwersalnym aktywatorem cyklazy komórek kręgowców (5, 10, 70, 71). Zwiększając stężenie cAMP cholera gen powoduje nie tylko wzrost wydzielania płynów przez komórki śluzówki jelita (72—76) — objaw wywoływanej przez *Vibrio cholerae* choroby — ale także wiele rozmaitych efektów biologicznych (5, 10, 77). Cholera gen aktywując cyklazę adenylową powoduje jednocześnie charakterystyczne zmiany jej własności. Zmniejszeniu ulega stymulacja cyklazy przez fluorki (78—83), zmieniony zostaje wpływ nukleotydów guanylowych na aktywność cyklazy i powinowactwo receptorów

względem hormonów (8, 9, 82—87), a także wrażliwość układu cykazy na hormony (8, 78, 88, 89). Efekty działania cholera genu utrzymują się długo, nawet kilka dni (90). Zmienione własności cykazy adenylowej obserwuje się w preparatach błon i ekstraktach detergentowych otrzymanych z komórek potraktowanych cholera genem (73, 91—93).



**Ryc. 2.** Interakcja cholera genu z błoną komórkową i mechanizm aktywacji cykazy adenylowej wg Fishmana i Bradego (6, 14).

Za zgodą autora i wydawnictwa.

Zmodyfikowano na podstawie: 10, 13, 167, 186, 187, 189, 210, 215, 216.

W mechanizmie działania cholera genu wyróżnić można trzy etapy: a — rozpoznawanie i wiązanie z receptorami, b — interakcje z błoną komórkową umożliwiające kontakt (peptydu A<sub>1</sub>) z cykłąz adenylową, c — oddziaływania lub reakcje prowadzące do jej aktywacji. Stosując zamiast całych komórek preparaty błon można ominąć dwa pierwsze etapy. Cholera gen aktywował cykłąz adenylową błon otrzymanych z komórek pozbawionych receptorów i normalnie niewrażliwych na działanie toksyny (94).

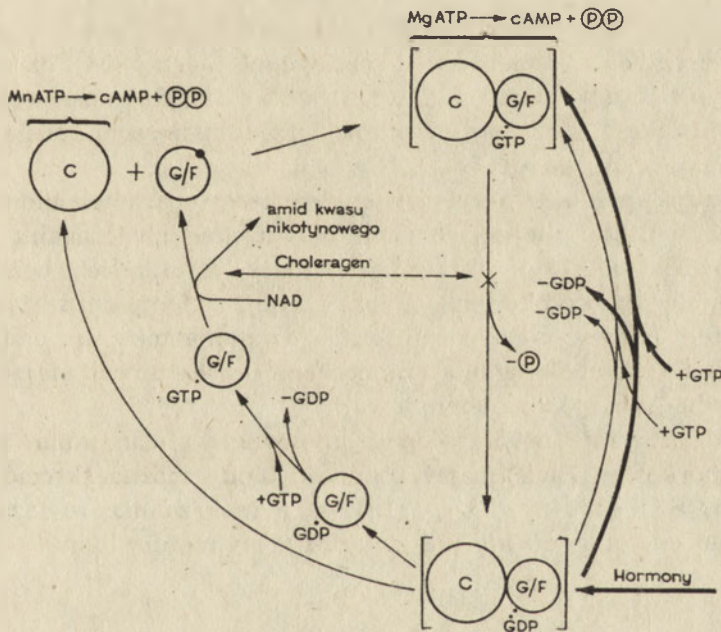
Wysunięto dwie różne (i kilka pośrednich) hipotezy wyjaśniające mechanizm aktywacji cykazy adenylowej przez cholera gen, przy czym różnice dotyczą drugiego i trzeciego etapu jego działania. Według zaproponowanego przez Cuatrecasas i wsp. (10, 95) modelu stechiometrycznego podjednostka A cholera genu łączy się bezpośrednio z cy-



klazą adenylową, co ma powodować wzrost aktywności tego enzymu. Według modelu enzymatycznego, którego głównym twórcą jest Gill (8, 11) podjednostka A jest enzymem katalizującym reakcję, prowadzącą do aktywacji cyklazy.

### III—1. Kinetyka aktywacji cyklazy adenylowej przez cholerażen

Proces aktywacji cyklazy adenylowej przebiega odmiennie w całych komórkach i preparatach błon. Wzrost aktywności cyklazy w komórkach obserwujemy po pewnym czasie od wprowadzenia cholerażenu do środowiska. Czas ten to tzw. faza latencji (*lag phase*) trwająca zwykle od kilku minut (96) do ponad 1 godz. (97). Długość tej fazy zależy jedynie w niewielkim stopniu od ilości użytego cholerażenu (80, 96, 98), wewnątrzkomórkowego stężenia NAD (96, 99) i jest właściwością badanych komórek.



**Ryc. 3.** Stabilizacja aktywnej formy cyklazy adenylowej przez cholerażen.

C — białko katalityczne cyklazy adenylowej, G/F — białka regulatorowe układu cyklazy adenylowej, ● — reszta ADP — rybozy.

Na podstawie: 13, 82, 87, 167, 184, 187, 189, 200, 209, 210, 215—217, 219—224.

Bennett i Cuatrecasas wyróżnili, poza fazą latencji, okresy wykładniczego i wolnego wzrostu aktywności cyklazy (10, 80, 84). Szybkość aktywacji cyklazy w okresie wykładniczego wzrostu jej aktywności zależy od ilości dodanego do komórek cholerażenu (90, 95, 100, 101). Zależność aktywacji cyklazy od ilości wiązanego cholerażenu ma



charakter złożony. Uzyskany efekt proporcjonalny był do ilości przyłączonego cholera genu w stosunkowo wąskim zakresie od 100 do 10 000 cząsteczek na komórkę (10, 90, 95, 100). Powyżej tego zakresu, stosując różne ilości cholera genu uzyskać można po odpowiednio długim czasie podobny stopień zaktywowania cyklazy (95, 96).

Cholera gen działa na komórki jedynie w temperaturze wyższej od wartości krytycznej, wynoszącej zwykle od kilkunastu do 30°C (80, 102). Wysokość tej temperatury, podobnie jak długość fazy latencji, jest charakterystyczną cechą użytych do badań komórek (10).

Badania kinetyczne aktywacji cyklazy adenylowej preparatów błon komplikuje jej labilność. Jednocześnie cyklaza zaktywowana przez cholera gen staje się bardziej stabilna (8, 79, 103). Stąd maksymalne końcowe aktywności zależały od ilości użytego cholera genu (103, 104). Odnosząc pomiary do początkowej szybkości aktywacji wykazano, że w ponad 200-krotnym zakresie stężeń była ona proporcjonalna do ilości cholera genu (8, 103).

W układach bezkomórkowych wzrost aktywności cyklazy następuje z nieznacznym opóźnieniem po dodaniu cholera genu (54, 79, 99, 103—105). Jedynie Sahyoun i Cuatrecasas (51) obserwowali fazę latencji. Szybkość aktywacji cyklazy przez cholera gen rosła płynnie wraz z temperaturą od 0°C do 37°C (103).

Porównując przebieg aktywacji cyklazy w preparatach błon i całych komórkach wątroby zaobserwowano, że wiązanie cholera genu z błonami (podrozdział III—3) i aktywacja cyklazy w układach bezkomórkowych przebiegają szybko (99). Fazę latencji i temperaturę krytyczną można zatem odnieść do drugiego etapu działania toksyny: oddziaływań między cząsteczką cholera genu a błoną komórkową, umożliwiającymi kontakt peptydu A<sub>1</sub> z cyklazą adenylową.

Na oddziaływanie te prawdopodobnie wpływa stan, m.in. płynności błony komórkowej. Zwiększając płynność błony można skrócić fazę latencji (96). Sinensky i wsp. (106) są jednak zdania, że faza latencji w działaniu cholera genu nie ma związku z płynnością błony.

### III—2.1. Gangliozydy jako receptory cholera genu

Interakcje toksyny *Vibrio cholerae* z komórkami rozpoczynają się od rozpoznawania i wiązania cząsteczek cholera genu z receptorami błony komórkowej. Van Heyningen i wsp. (107) przedstawili pierwsze dane wskazujące na udział gangliozydów w mechanizmie działania cholera genu. Spostrzeżenia te zostały potwierdzone i rozwinięte przez wielu autorów (108—112). Okazało się, że receptorem toksyny jest gangliozyd, określany w nomenklaturze wg Svennerholma (113) jako G<sub>M1</sub>. Wniosek ten wynika z wielu obserwacji:

1. Gangliozyd  $G_{M1}$  reaguje bezpośrednio z choleragenem:  $G_{M1}$  hamuje wiązanie choleragenu z błonami komórkowymi (114, 115) i jego aktywność biologiczną (79, 108—111, 116—120). Gangliozyd ten działa w bardzo niskich stężeniach (116, 121), precypitując z choleragenem w żelu (116), a po sprzęgnięciu z sefarozą (20), polistyrenem (109) lub, jako nierozpuszczalny kompleks z cerebrozydami (112), wychwytuje choleragen z roztworów. Choleragen zmienia przepuszczalność błon liposomów zawierających gangliozyd  $G_{M1}$  (49, 122—124), a w odpowiednich warunkach — działając jak lektyna — powoduje ich aglutynację (125, 126). Gangliozyd  $G_{M1}$  łącząc się z choleragenem powoduje zmiany konformacji jego cząsteczki (50, 61).

2. Ilość miejsc wiążących choleragen w komórkach i tkankach skorelowana jest z zawartością gangliozydu  $G_{M1}$ : Cuatrecasas (108) zaobserwował, że egzogenne gangliozydy inkubowane z komórkami stają się integralnymi składnikami błon plazmatycznych. Wbudowaniu gangliozydu  $G_{M1}$  do błon komórek towarzyszy pojawienie się nowych miejsc wiążących choleragen o takim samym powinowactwie jak jego natywne receptory (127). Ilość gangliozydu  $G_{M1}$  w komórkach można zwiększyć traktując je neuraminidazą. W większości przypadków (110, 114, 128), chociaż nie zawsze (127), neuraminidaza powodowała zwiększenie ilości związanego przez komórki choleragenu i wzrost jego efektów biologicznych (129, 130). Zwiększeniu zawartości gangliozydu  $G_{M1}$  w komórkach hodowanych w środowisku z dodatkiem maślanu towarzyszy wzrost ilości miejsc wiążących choleragen (131).

3. Choleragen łącząc się z błoną komórkową osłania gangliozyd  $G_{M1}$ . Terminalną galaktozę i kwas sialowy gangliozydu  $G_{M1}$  można utlenić przy pomocy oksydazy galaktozy (132—134) lub nadjodanu (135), a następnie poprzez redukcję borotrytkiem wprowadzać izotop ( $^3H$ ) do cząsteczki. Inkubacja błon komórkowych z choleragenem powoduje znaczną redukcję późniejszego znakowania gangliozydu  $G_{M1}$  nie zmniejszając ilości trytu wprowadzanego do innych związków (61, 136).

4. Egzogenne gangliozyd  $G_{M1}$  po wbudowaniu do błon komórek pozbawionych receptorów toksyny umożliwia aktywację cyklazy adenylowej.

W badaniach nad receptorami choleragenu zastosowano też stransformowane fibroblasty myszy pozbawione, w wyniku utraty dwu glikozyłotransferaz, gangliozydu  $G_{M1}$  (94, 137, 138). Wbudowanie egzogenne gangliozydu  $G_{M1}$  do błon komórek umożliwiało aktywację cyklazy adenylowej przez choleragen. Inne gangliozydy po przyłączeniu do błon reagowały z choleragenem przynajmniej 50 do 1000 razy mniej efektywnie niż gangliozyd  $G_{M1}$ .

5. Modyfikacje cząsteczki choleragenu zmniejszające jego powinowactwo do gangliozydu  $G_{M1}$  zmniejszają w tym samym stopniu jego wiązanie z błonami komórkowymi (139).

Można zatem sądzić na podstawie przedstawionych obserwacji, że



w badanych komórkach i tkankach gangliozydu  $G_{M1}$  jest receptorem choleragenu.

Komórki tłuszczowe szczura zawierają bardzo niskie, niewykrywalne metodami chemicznymi ilości gangliozydu  $G_{M1}$  (140). Stosując odpowiednie metody udało się jednak wykazać, że gangliozyd ten występuje w błonach komórek tłuszczowych i wiąże się z choleragenem (141).

Przedstawione obserwacje nie wykluczają jednak możliwości występowania innych związków wiążących choleragen. Ostatnio Kim i wsp. (142) wyizolowali glikoproteid, który reagował z choleragenem.

Rolę gangliozydu  $G_{M1}$  jako receptora choleragenu kwestionowano w przypadku nowotworowej linii komórek nadnercza (118). Komórki te odpowiadają syntezą steroidów na bardzo niskie stężenia choleragenu (143) i są przez to cennym ale i trudnym obiektem doświadczalnym.

### III—2.2. Rola reszty oligosacharydowej i lipidowej gangliozydu $G_{M1}$ w reakcji z choleragenem

Gangliozydy, podobnie jak inne glikosfingolipidy, zbudowane są z łańcucha cukrowcowego połączonego 0-glikozydowo z ceramidem (6, 14, 15, 111, 144). W komórkach gangliozydy występują na granicy między środowiskiem zewnętrznym a błoną komórkową; reszty ceramidu znajdują się w zewnętrznej warstwie lipidów błony a ich łańcuchy cukrowcowe wystają na zewnątrz. Stąd bezpośrednio dostępnym dla choleragenu fragmentem gangliozydu  $G_{M1}$  jest reszta oligosacharydowa. Z wielu pośrednich i bezpośrednich (31, 120, 121, 126, 145) obserwacji wynika, że fragmentem receptora błony komórkowej, który choleragen rozpoznaje i z którym się wiąże jest łańcuch oligosacharydowy gangliozydu  $G_{M1}$ . Nie wiadomo jednak jaki jest udział elementów struktury oligosacharydu  $G_{M1}$  w jego reakcji z toksyną *Vibrio cholerae*. Można przypuszczać, że wewnętrzna cząsteczka glukozy ma niewielkie znaczenie (120). Ponieważ zewnętrzna galaktoza i kwas sialowy, osłaniane są przez choleragen przed czynnikami zewnętrznymi (36, 61), biorą prawdopodobnie bezpośredni udział w wiązaniu tej toksyny. Gangliozyd  $G_{M1}$  i otrzymane z niego oligosacharydy zawierające kwas N-acetylo i N-glikolylo neuraminowy reagowały z choleragenem (141, 146, 147). Trudna do zinterpretowania jest obserwacja C u a t r e c a s a s a: gangliozyd  $G_{M1}$  połączony z sefarozą poprzez cząsteczkę kwasu sialowego zachowywał zdolność wiązania choleragenu (20).

Rola reszty lipidowej gangliozydu  $G_{M1}$  w mechanizmie działania choleragenu nie została dotychczas wyjaśniona. Badano wpływ modyfikacji lub nawet usunięcia ceramidu na reakcję gangliozydu i jego pochodnych z choleragenem *in vitro* (117, 120, 121, 145). Z doświadczeń tych wynika, że reszta lipidowa gangliozydu  $G_{M1}$  warunkuje powstawanie

mniej lub bardziej trwałych miceli, które wiążąc cholerażen z roztworów mogą neutralizować jego toksyczność.

Ceramid jest hydrofobowym, zanurzonym w błonie składnikiem cząsteczki gangliozydów (6, 14, 15, 108, 111, 144). Można przypuszczać, że budowa ceramidu wpływa na ruchliwość gangliozydów w płaszczyźnie błony, ich ekspozycję poza tą płaszczyznę, oddziaływania z innymi lipidami i białkami błony a w konsekwencji na możliwość reagowania ze składnikami środowiska komórki (108, 148). Jeżeli gangliozydy biorą udział w przekazywaniu informacji biologicznej przez błony (14), to można przypuszczać, że funkcje te wynikają z budowy zarówno ich części oligosacharydowej (rozpoznawanie bodźców) jak i ceramidu.

Fishman i wsp. (146, 147) zaobserwowali, że zastąpienie reszty kwasu tłuszczowego kwasem octowym w cząsteczce ceramidu wpływa na funkcję gangliozydu  $G_{M1}$  jako receptora cholerażenu. W niektórych przypadkach modyfikowany  $G_{M1}$  po wbudowaniu do komórek funkcjonował „sprawniej” niż natywny gangliozyd.

### III—3. Wiązanie cholerażenu z błonami komórkowymi i zapasowe receptory

Wprowadzenie wysokoznakowanych radioaktywnym jodem  $^{125}J$  preparatów cholerażenu umożliwiło badanie kinetyki jego wiązania z błonami komórkowymi (114). Reakcja ta w porównaniu z długością fazy latencji przebiega szybko. W  $4^{\circ}C$  trwa ona kilkanaście minut, a w  $24^{\circ}C$  jest zakończona po kilku minutach (37, 114, 127). Błony komórkowe wiążą cholerażen w sposób „specyficzny”. Miejsca wiążące ulegają wysyceniu a reakcja wiązania ma charakter odwracalny (84, 98, 114, 149, 150). Odwracalność wiązania można zaobserwować stosunkowo krótko, już po 5—10 minutach część przyłączonego do błon cholerażenu zostaje „utrwalona” i nie można go wymienić nadmiarem nieznakowanego związku (98, 139). Sugerowano, że jedynie cholerażen związany w sposób „nieodwracalny” może aktywować cyklazę adenylową (2, 139).

Komórki wiążą różne ilości cholerażenu, od kilkudziesięciu do kilkuset cząsteczek w przypadku erytrocytów człowieka (114), tymocytów szczura (151) i erytrocytów gołębia (101) aż do kilku milionów w przypadku fibroblastów (92, 95). Pomimo różnic ilościowych miejsca wiążące cholerażen różnych komórek charakteryzują się podobnym, dość wysokim powinowactwem o stałej  $K_D$  około  $10^{-9}M$ . Niektóre obserwacje nie potwierdzają jednak tej prawidłowości (152).

Efekty biologiczne wynikające ze wzrostu stężenia cAMP w komórkach mogą być wywołane bardzo niewielkimi ilościami cholerażenu. Do zahamowania syntezy DNA w limfocytach (149) i stymulacji syntezy steroidów (119, 143) wystarczyły stężenia tego białka, przy których na jedną komórkę przypadało kilka cząsteczek cholerażenu. Wzrost aktywności cyklazy adenylowej — podstawy obserwowanych zjawisk — powodowały także



niewielkie ilości cholera genu (79, 153). W krańcowych przypadkach komórki mogą wiązać nawet 100 000 razy więcej cholera genu niż wynosi „efektywne minimum”. Okazało się, że dla komórek o dużej ilości miejsc wiążących jedynie około 0,5% cholera genu zostaje przyłączone w sposób „produktywny”, tj. prowadzący do aktywacji cykazy (95). Pozostałe miejsca wiążące są „zapasowymi” receptorami (*spare receptors*) (10, 95, 101). Do maksymalnego zaktwowania cykazy adenylowej komórek różniących się ilością miejsc wiążących nawet 200 razy wystarcza przyłączenie około 20 000 cząsteczek cholera genu (95). Komórki tłuszczowe szczura zawierają podobną ilość miejsc wiążących, z czego nie więcej niż 25% to receptory zapasowe. Dlatego w przypadku tych komórek dość łatwo można obserwować efekty blokowania cholera genoidem endogennych receptorów lub zwiększania ich ilości przez wprowadzenie egzogenego gangliozydu  $G_{M1}$  (108, 150). Fibroblasty myszy zawierające kilka milionów cząsteczek gangliozydu  $G_{M1}$  na komórkę nie odpowiadają na tego typu manipulacje (95).

Nie wiadomo, jakie czynniki powodują, że tylko niektóre cząsteczki cholera genu łączą się z receptorem — gangliozydem  $G_{M1}$  — w sposób „produktywny”. Być może, poza przypadkiem, znaczenie posiada mikrośrodowisko błony komórkowej, w którym znajduje się receptor, modulując interakcje między jego cząsteczką a błoną, umożliwiające kontakt peptydu  $A_1$  z cyklazą adenylową.

#### III—4. Interakcje cholera genu z błoną komórkową

Na podstawie prac wielu autorów (154—158) można sądzić, że cykaza adenylowa występuje w wewnętrznej warstwie lipidów błony komórkowej. Cząsteczki gangliozydu  $G_{M1}$  będące receptorami cholera genu, znajdują się w zewnętrznej warstwie błony, a ich łańcuchy oligosacharydowe skierowane są na zewnątrz komórki (108). Cząsteczki cholera genu łącząc się z receptorami nie mają początkowo kontaktu z cyklazą adenylową.

Ogromna efektywność cholera genu utrudnia badanie mechanizmu jego działania. Nie wiadomo, czy kilkadziesiąt lub kilkaset cząsteczek cholera genu wystarczających do zaktwowania cykazy adenylowej zachowuje się tak samo, jak pozostałe kilkanaście lub kilkadziesiąt tysięcy, których interakcje z błoną można śledzić.

Stosując metody mikroskopowe stwierdzono, że cząsteczki cholera genu rozmieszczone są początkowo równomiernie na powierzchni błony komórkowej ale już po kilkunastu minutach tworzą skupienia w kształcie łań i pierścieni (115, 128, 139, 149, 159, 160), które mogą zbliżyć się do siebie formując czapeczki (160—163).

W przemieszczaniu się kompleksów cholera genu związanego z błoną uczestniczą cząsteczki gangliozydu  $G_{M1}$  i to zarówno endogenne, jak i „egzogenne”, po wbudowaniu do błony komórkowej (161, 162). Po

pewnym czasie cholerażen można wykręć także wewnątrz komórki, zamknięty w pęcherzykach pinocytotycznych i innych strukturach błonowych (115, 164, 165), do których dostaje się w wyniku endocytozy.

Cholerażen utrzymuje się na powierzchni komórek dłużej, niż można by oczekiwać przy intensywnie przebiegającej endocytozie (165). Być może fragmenty błon zawierające kompleksy cząsteczek gangliozydu  $G_{M1}$ , połączonych z cholerażenem nie ulegają w lizosomach degradacji, ale wykorzystywane są do odtwarzania błony komórkowej (165). Tego typu zjawisko opisano także w przypadku innych receptorów (166).

W przedstawionych badaniach nad endocytozą cholerażenu nie można było śledzić zachowania się podjednostki A — aktywatora cykazy adenylowej. Zdaniem Cuatrecasasa i wsp. (9, 10, 92, 160) ruch kompleksów receptorów połączonych z cholerażenem jest ważnym zjawiskiem, umożliwiającym wnikięcie podjednostki A do warstwy lipidów błony komórkowej. Czynniki ograniczające ten ruch hamują działanie cholerażenu (92, 160). Przemieszczanie się kompleksów receptorów z cholerażenem w płaszczyźnie błony nie wystarcza jednak do zaktywowania cykazy adenylowej. Opisane zjawiska obserwowano stosując zarówno aktywny cholerażen jak i nieaktywny cholerażenoid. Cząsteczki cholerażenu wiążąc się z receptorami wędrują nie tylko w płaszczyźnie, ale także ulegają przemieszczeniu w głąb błony komórkowej (128), co być może ułatwia kontakt podjednostki A z cyklazą adenylową.

Próby znalezienia wolnego cholerażenu (podjednostki A) wewnątrz komórki nie dały jednoznacznej odpowiedzi (80, 139). Pośrednio jednak, na podstawie wyników hamowania aktywacji cykazy w układach bezkomórkowych przez przeciwciała reagujące z cholerażenem można przypuszczać, że podjednostka A wnika do wnętrza komórki (79). Do podobnego wniosku skłaniają także obserwacje Farfela i wsp. (167).

### III—5. Stechiometryczny model działania cholerażenu

Model ten zaproponowali Cuatrecasas i wsp. opierając się na wynikach własnych prac (9, 10, 80, 84, 92, 94, 160), jako szczególny przypadek przekazywania bodźców biologicznych przez błony przy pomocy „ruchomych receptorów” (168—170). Założono następującą kolejność zdarzeń: cholerażen rozpoznaje miejsca wiążące błony komórkowej łącząc się początkowo z jedną, a następnie w wyniku ruchu receptorów w błonie z kilkoma cząsteczkami gangliozydu  $G_{M1}$ . W ten sposób cholerażen zostaje umieszczony bezpośrednio na powierzchni komórki i ściśle z nią związany. Jednocześnie wiązanie z receptorami powoduje zmiany konformacji podjednostek B i całej cząsteczki cholerażenu ułatwiając uwolnienie podjednostki A i jej wbudowanie do błony komórkowej. Podjednostka A mająca właściwości hydrofobowe (49—51) staje się integralnym białkiem błony i „pływając” w podwójnej warstwie lipidów może bez-



pośrednio oddziaływać na cyklazę adenyłową (51, 92, 160). Przyłączenie podjednostki A do cyklazy powoduje wzrost aktywności i charakterystyczne zmiany właściwości tego enzymu (9, 51, 92). Częsteczką cholera genu aktywuje jedną częsteczkę cyklazy adenyłowej. Miejscem opisanych zdarzeń jest początkowo powierzchnia a następnie wnętrze błony komórkowej.

### III—6. Czynniki niezbędne do aktywacji cyklazy adenyłowej przez cholera gen

Do zaktywowania cyklazy adenyłowej komórek mających receptory cholera genu, wystarcza dodanie niewielkiej jego ilości do środowiska, w odpowiedniej temperaturze.

W układach bezkomórkowych receptory i wiążący się z nimi fragment B cholera genu stały się zbędne (79, 94), okazało się jednak, że do aktywacji cyklazy przez cholera gen konieczna jest obecność różnych związków. Poznanie wszystkich czynników biorących udział w mechanizmie działania cholera genu w złożonych układach doświadczalnych jakimi są homogenaty i preparaty błon jest trudnym zadaniem.

W chwili obecnej, wydaje się, że w procesie aktywacji cyklazy przez cholera gen biorą udział peptyd  $A_1$ , NAD, GDP, a być może, także ATP i białka cytoplazmy. Peptyd  $A_1$  aktywuje cyklazę adenyłową błon różnych komórek (54, 79, 83, 85, 99, 171), a Wodnar-Filipowicz i Lai (54) wykazali, że jest on bardziej efektywny niż cholera gen i cała podjednostka A. Prawdopodobnie jest to właściwy aktywator cyklazy (103). Preparat otrzymany po potraktowaniu cholera genu detergentem i dwutiotreitołem (uwolniony zostaje peptyd  $A_1$ ) (Ryc. 1) powodował szybszy wzrost aktywności cyklazy niż natywny cholera gen. Peptyd  $A_1$  działała po zredukowaniu mostka dwusiarczkowego łączącego go z peptydem  $A_2$ , natomiast jego dalsze oddysocjowanie od częsteczki toksyny nie jest konieczne (46). Obecność wolnej grupy SH peptydu  $A_1$  nie jest jednak wymagana do aktywacji cyklazy adenyłowej (54). Interesujące, chociaż trudne do zinterpretowania, są obserwacje Matuo i wsp.: produkty proteolizy cholera genu o masie cząsteczkowej około 1400 daltonów aktywowały cyklazę błon komórek nowotworu myszy (172).

Udział NAD w procesie aktywacji cyklazy adenyłowej wykryty przez Gilla (79, 103, 173) potwierdzony został przez wielu autorów (54, 61, 87, 93, 99, 104, 171, 174). W niektórych przypadkach wpływ NAD zaznaczył się dopiero po potraktowaniu preparatów błon glikohydrolazą (103, 173). O roli NAD, donora reszty ADP-rybozy będzie mowa w podrozdziale III—8.

Nukleotydy guanylowe uczestniczą w procesach regulacji aktywności cyklazy adenyłowej (170, 175—184) niezależnie od toksyny *Vibrio cholerae*. GTP pełni w mechanizmie działania cholera genu podwójną rolę. Wydaje się być niezbędny do aktywacji cyklazy adenyłowej przez cholera gen

(86, 185—188), a także do ekspresji aktywności zmienionego w tym procesie enzymu (82, 83, 87, 188). Zdaniem Gilla i Meren (187) cholera-gen modyfikuje białka regulatorowe układu cykazy adenyłowej, do których przyłączony jest GTP.

W wielu układach doświadczalnych zaobserwowano, że ATP stymuluje aktywację cykazy adenyłowej przez cholera-gen (79, 86, 103, 104). W przypadku błon komórek wątroby związek ten uznano za niezbędny w omawianym procesie (104). Czasami jednak badanie mogą utrudniać śladowe ilości GTP. Gill początkowo wykrył, że ATP (a nie GTP) stymulował aktywację cykazy adenyłowej przez cholera-gen (103). Ostatnio okazało się jednak, że czynnym związkiem jest GTP, a ATP służył jedynie do jego regeneracji lub osłaniania przed działaniem hydrolaz (186). Aktywację cykazy adenyłowej stymulują także białka pozostające w supernatancie po odwirowaniu błon komórkowych (103, 185, 186, 188). Obecność tych białek okazała się w niektórych przypadkach niezbędna dla działania cholera-genu (186). Niektórzy autorzy do aktywacji cykazy adenyłowej przez cholera-gen stosowali jedynie dodatek NAD, jednak użyte przez nich stężenia cholera-genu lub peptydu  $A_1$  były bardzo wysokie (54, 189). Co więcej, w badanym materiale mogły występować niewielkie ilości GTP, ATP i białek, biorących prawdopodobnie udział w omawianym procesie.

### III—7. Enzymatyczny model działania cholera-genu

Omówione w poprzednich podrozdziałach wyniki badań nad aktywacją cykazy adenyłowej w układach bezkomórkowych i udział w tym procesie NAD (79, 173), donora ADP-rybozy w reakcjach katalizowanych przez toksynę dyfterytu i egzotoksynę A *Pseudomonas* (190—192) stały się podstawą do opracowania enzymatycznego modelu działania cholera-genu (8, 11) (ryc. 2). Cholera-gen łączy się ma z receptorami błony komórkowej i reaguje z nią w sposób umożliwiający podjednostce A (peptydowi  $A_1$ ) przeniknięcie do wnętrza komórki. Jak już wspomniano, nie ma bezpośrednich dowodów na występowanie podjednostek  $A_1$  w cytoplazmie, chociaż istnieją obserwacje popierające taką możliwość (79, 167). Znajdując się po wewnętrznej stronie błony komórkowej peptyd  $A_1$  katalizowałby reakcje (ADP-rybozylację białek regulatorowych układu cykazy), powodujące zmiany własności cykazy adenyłowej. Na korzyść enzymatycznego mechanizmu aktywacji cykazy przez cholera-gen przemawia jego ogromna efektywność. W układach bezkomórkowych jedna cząsteczka peptydu  $A_1$  może aktywować kilkaset cząsteczek cykazy (103). Duże znaczenie miało także wykrycie reakcji enzymatycznych katalizowanych przez tę toksynę.



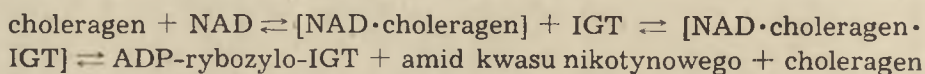
### III—8. Cholerażen jako enzym

Pierwszy raz własności enzymatyczne cholerażenu spostrzegli Moss i wsp. (193). Wykazali oni, że cholerażen ma aktywność glikohydrolazy NAD katalizując hydrolizę tego związku do ADP-rybozy i amidu kwasu nikotynowego. W odpowiednich warunkach cholerażen działał także jak ADP-rybozylotransferaza (194—196). Akceptorem przenoszonej ADP-rybozy jest ugrupowanie guanidynowe argininy (194, 195). Nowopowstałe wiązanie N-glikozydowe ma konfigurację  $\alpha$ , ulega jednak przekształceniu dając w stanie równowagi formę  $\alpha$  i  $\beta$  w stosunku 1 : 1 (195).

Reakcje katalizowane przez cholerażen można hamować analogami NAD i gangliozydami (50), przy czym wpływ gangliozydów jest mało swoisty i wynika prawdopodobnie z interakcji podjednostki A z lipidami (49, 50).

Aktywność enzymatyczna cholerażenu, podobnie jak zdolność aktywowania cyklazy adenylowej związana jest z peptydem  $A_1$  (46, 193). Natywny cholerażen wymaga zwykle traktowania czynnikami redukującymi mostki dwusiarczkowe. Podjednostka A zawierająca peptydy  $A_1$  i  $A_2$  połączone nie tylko mostkiem dwusiarczkowym ale także — w wyniku zahamowania proteaz bakteryjnych — wiązaniem peptydowym, nie ma własności enzymatycznych (46). Do działania wymaga ona nie tylko obecności związków redukujących, ale także potraktowania proteazami.

Przydatnym w badaniach własności enzymatycznych cholerażenu okazał się syntetyczny około 1000 razy aktywniejszy od argininy akceptor ADP-rybozy, jodowana N-guanidynotyramina (IGT) (196). Reakcja przenoszenia ADP-rybozy na ten akceptor przebiegać może wg schematu:



Cholerażen nie wykazuje powinowactwa do IGT (196), może się natomiast łączyć z NAD najprawdopodobniej za pośrednictwem podjednostki A (23). Przyłączenie NAD do cholerażenu indukuje powstanie miejsca wiążącego IGT (196). Utworzony kompleks enzymu i dwu substratów rozpada się uwalniając cholerażen, amid kwasu nikotynowego i ADP-rybozyl-IGT. W odpowiednich warunkach można wykazać odwracalność ADP-rybozylacji IGT (196). Wprawdzie coraz więcej wyników potwierdza enzymatyczne właściwości cholerażenu (194—196), jednak nie ma w tej sprawie pełnej zgodności. Sugerowano nawet, że obserwowana aktywność glikohydrolazowa cholerażenu jest artefaktem wynikającym z nieenzymatycznego rozpadu NAD lub obecności innych hydrolaz (197). Oddzielono także główną aktywność glikohydrolazową bakterii *Vibrio cholerae* od cholerażenu (197), co nie wyklucza jednak możliwości, że ma on zdolność hydrolazy NAD. Można przypuszczać, że główna aktywność glikohydrolazowa bakterii *Vibrio cholerae* związana jest z białkiem różniącym się od pod-

jednostki A choleragenu, jednak zagadnienie to jest dość złożone i wymaga dalszych badań (198). Przydatnym tu mógłby się okazać szczep bakterii syntetyzujących wyłącznie choleragenoid (44).

Do wykazania aktywności enzymatycznej choleragenu stosowano zwykle bardzo duże jego ilości (50, 185, 193—196). Cholera-gen wykazuje także stosunkowo niewielkie powinowactwo ( $K_m = 3,8$  mM) względem NAD (193, 196). Być może czynniki biorące udział w aktywacji cyklazy: GTP, ATP, białka cytoplazmy, zapewniają właściwą cholera-genowi efektywność.

### III—9. ADP-rybozylacja białek G/F układu cyklazy adenylowej

Warunkiem uznania słuszności enzymatycznego modelu działania cholera-genu było nie tylko znalezienie reakcji, które ta toksyna (peptyd A<sub>1</sub>) może katalizować, ale również wykazanie, że prowadzą one do aktywacji cyklazy adenylowej. Wiadomo, że przyłączenie ADP-rybozy do białek powoduje zmiany ich własności (199). Wzrost aktywności cyklazy mógłby być następstwem katalizowanej przez cholera-gen ADP-rybozylacji tego enzymu (194, 193). Zbadanie tej hipotezy komplikuje złożony charakter zarówno układu cyklazy adenylowej, jak i zmian jego własności będących wynikiem działania cholera-genu.

Układ cyklazy adenylowej komórek zwierząt, pełniący w ich błonach funkcję przekaźnika i wzmacniacza bodźców biologicznych, tworzą białko C o aktywności katalitycznej cyklazy, białka regulatorowe i receptory (184, 200—207). Nie bez znaczenia są lipidy błony komórkowej, tworzące środowisko, w którym składniki układu cyklazy na siebie oddziałują (106, 208).

Jak już wspomniano, cholera-gen aktywując cyklazę adenylową jednocześnie modyfikuje jej wrażliwość na nukleotydy guanylowe i fluoroki, a także hamuje aktywność swoistej GTP-azy (82, 209). Efekty te mogą być wynikiem ADP-rybozylacji jednego wielofunkcyjnego białka lub kilku białek związanych z różnymi własnościami układu cyklazy. Można przypuszczać, że względu na charakter wprowadzanych przez cholera-gen zmian, że modyfikacji ulega białko C lub białka reagujące z nukleotydami guanylowymi i fluorokami, nazywane wg Gilmana G/F (210).

Białka C i G/F można rozdzielić poprzez ekstrakcję błon detergentami, przy czym ponowne ich połączenie pozwala na odtwarzanie niektórych własności natywnego układu cyklazy (201, 202, 210—213). Występują one także niezależnie od siebie w komórkach wykazujących defekty układu cyklazy adenylowej (201, 202, 210).

Odtwarzając układ cyklazy z rozdzielonych elementów otrzymanych z błon traktowanych cholera-genem wykazano, że zmiany jego właściwości dotyczą białek regulatorowych G/F a nie białka C (167, 215, 216).

Próby charakterystyki białek ulegających ADP-rybozylacji pod wpły-



wem cholera genu dostarczyły interesujących, chociaż niecałkowicie jednoznacznych wyników. Cholera gen może katalizować przeniesienie radioaktywnej ADP-rybozy z NAD na wiele białek związanych z błonami komórkowymi i występujących w cytoplazmie (187, 217). Reakcje te przebiegały równocześnie z pojawieniem się zmian własności cykazy adenylowej (187, 189, 217), a odwróceniu ADP-rybozylacji towarzyszył jej powrót do stanu pierwotnego (187, 189).

Najwięcej uwagi poświęcono białku błon komórkowych o masie cząsteczkowej podobnej do białek G/F, tj. około 42 000 daltonów. W odpowiednich warunkach jest to główny akceptor ADP-rybozy w katalizowanej przez cholera gen reakcji (167, 187—189, 216, 217). ADP-rybozylację białka o masie około 42 000 obserwowano we wszystkich badanych przypadkach z wyjątkiem błon komórek nie zawierających białek G/F (216). Przypuszcza się zatem, że cholera gen katalizuje ADP-rybozylację białek regulatorowych G/F układu cykazy adenylowej (167, 187—189, 200, 215—217).

Porównując białka znakowane radioaktywną ADP-rybozą w błonach komórek wykazujących defekty układu cykazy adenylowej znaleziono przynajmniej dwa specyficzne substraty cholera genu (216). Oprócz białka G/F były to białka o masie cząsteczkowej około 52 000 daltonów. Być może biorą one udział w regulacji, przy udziale nukleotydów guanylowych, powinowactwa receptorów do hormonów (182, 183, 216). Wiadomo z pracy Lina i wsp. (83), że cholera gen zmniejsza wpływ GTP na reakcję receptora glukagonu z hormonem.

### III—10. Hamowanie aktywności GTP-azowej układu cykazy adenylowej

Na podstawie hamowania przez cholera gen aktywności swoistej GTP-azy (82, 209, 218) i zmian interakcji układu cykazy z nukleotydami guanylowymi (87, 219), wysunięto hipotezę, że toksyna aktywuje cyklazę adenylową stabilizując jej aktywną formę (ryc. 3). Byłby to kompleks  $[C \cdot G/F] \cdot GTP$  utworzony z białka katalitycznego C połączonego niekowalencyjnie z białkami regulatorowymi G/F ze związanym GTP (82, 184, 200, 215). Kompleks ten wykazuje dwie aktywności enzymatyczne, a mianowicie katalizuje powstawanie cAMP z Mg ATP a także hydrolizę, związanego z białkiem G/F, GTP (209, 220, 221). Hydroliza tej cząsteczki GTP do GDP hamuje syntezę cAMP. Powstały kompleks  $I[C \cdot G/F]GDP$  jest nieaktywną formą cykazy adenylowej (82, 184, 200, 209, 215). Prawdopodobnie bodźce hormonalne powodują zmiany ułatwiające oddysocjowanie GDP i zastąpienie go przez GTP a w konsekwencji odtworzenie aktywnej formy cykazy adenylowej (222) (Ryc. 3). Pozornie paradoksalny wzrost aktywności dezaktywującej cyklazę GTP-azy obserwowany pod wpływem hormonów (220) wynika w rzeczywistości tylko ze zwiększenia ilości substratu tj. kompleksu  $[C \cdot G/F] \cdot GTP$  (220).

Choleragen — najprawdopodobniej poprzez ADP-rybozylację białek G/F — powoduje prawie całkowite zahamowanie „wewnętrznej” GTP-azy, nie wpływa natomiast na reakcję zastępowania GDP przez GTP (82, 209). W ten sposób prawie wszystkie cząsteczki cykazy adenylowej zostają utrwalone w formie  $[C \cdot G/F] \cdot GTP$ . Podobny efekt można uzyskać zastępując GTP przez jego oporny na hydrolizę analog GppNHp, stabilizujący układ cykazy w aktywnej formie  $[C \cdot G/F] \cdot GppNHp$  (82, 22, 223).

Zmniejszenie podatności cykazy adenylowej na stymulację przez fluorki dotyczy zmian (ADP-rybozylacji) własności białek G/F (187, 188, 200), nie jest jednak wynikiem hamowania GTP-azy (224). Fluorki stymulują układ cykazy adenylowej będący w formie  $[C \cdot G/F]$  tj. nie zawierający nukleotydów guanylowych (224).

Wyjaśnienie wszystkich efektów działania choleragenu wymaga lepszej znajomości funkcjonowania układu cykazy adenylowej. Doniesiono, że aktywną formą cykazy adenylowej jest być może białko C a nie kompleks  $[C \cdot G/F] \cdot GTP$ , ponieważ stymulacji układu cykazy adenylowej przez hormony towarzyszyło zmniejszenie jego wielkości (207). Obserwacje te nie zostały jednak potwierdzone przez innych autorów (206). Szkoda, że w obu pracach nie badano zmian wielkości układu związanych z jego aktywacją przez choleragen.

Ostatnio wyizolowano z erytrocytów indyka enzym, wykazujący podobnie jak choleragen aktywność NAD-glikohydrolazy i ADP-rybozylotransferazy, który w odpowiednich warunkach aktywował cyklazę adenylową mózgu szczura (225, 226).

Być może, modyfikacje cykazy adenylowej wywoływane przez nieco egzotyczny czynnik, jakim jest choleragen mieszczą się w ramach fizjologicznych mechanizmów regulacji aktywności tego enzymu.

Kończąc polecam uwagę czytelników kilkanaście nowych prac dotyczących mechanizmu działania choleragenu, które ukazały się po oddaniu manuskryptu do druku (227—242).

ZAAKCEPTOWANO DO DRUKU 22.5.1980

## PIŚMIENICTWO

1. Howard-Jones N., (1972), *Perspectives Biol. Med.*, **11**, 422—433.
2. Holmgren J., (1978) w *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, red. Jeljaszewicz J., Wadström T., str. 333—366, Academic Press, London.
3. De S. N., (1959), *Nature*, **183**, 1533—1534.
4. De S. N., Ghose M. L., Sen A., (1960), *J. Pathol. Bacteriol.*, **79**, 373—380.
5. Finkelstein R. A., (1973), *C. R. C. Crit. Rev. Microbiol.*, **2**, 553—623.
6. Fishman P. H., Brady R. O., (1976), *Science*, **194**, 906—915.
7. Van Heyningen S., (1977), *Biol. Rev.*, **52**, 509—549.
8. Gill D. M., (1977), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 8 red. Greengard P., Robinson G. A., 86—118, Raven Press, N. Y.
9. Bennett V., Craig S., Hollenberg M. D., O'Keefe E., Sahyoun N., Cuatrecasas P., (1976), *J. Supramolec. Struct.*, **4**, 99—120.



10. Bennett V., Cuatrecasas P., (1976), w *The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins. Receptors and Recognition*, red. Cuatrecasas P., Ser. B, t. I, 1—66, Chapman and Hall, London.
11. Gill D. M., (1978) w *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, red. Jeljaszewicz J., Wadstrom T., str. 291—332. Academic Press, London.
12. Vaughan M., Moss J., (1978), *J. Supramolec. Struct.*, **8**, 473—488.
13. Moss J., Vaughan M., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 581—600.
14. Brady R. O., Fishman P. H., (1979), *Adv. Enzymol.*, red. Meister A., t. **50**, 303—323, John Wiley and Sons, Inc.
15. Gardas A., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 309—331.
16. Finkelstein R. A., Lo Spalluto J. J., (1969), *J. Exp. Med.*, **130**, 185—202.
17. Finkelstein R. A., Lo Spalluto J. J., (1970), *J. Infect. Dis.*, **121**, S63—S71.
18. Richardson S. H., Evans D. G., Feeley J. C., (1970), *Infect. Immunity*, **1**, 546—554.
19. Spyrides G. J., Feeley J. C., (1970), *J. Infect. Dis.*, **121**, S96—S99.
20. Cuatrecasas P., Parikh J., Hollenberg M. D., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4253—4264.
21. Rappaport R. S., Rubin B. A., Tint H., (1974), *Infect. Immunity*, **9**, 294—303.
22. Sattler J., Wiegandt H., Steark J., Kranz T., Ronnenberger H. J., Schmidtberger R., Zilg H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **57**, 309—316.
23. Antoni G., Brizzi A., Casagli M. C., Neri P., (1978), *Ital. J. Biochem.*, **27**, 373—377.
24. Mekalanos J. J., Collier R. J., Romig W. R., (1978), *Infect.-Immunity*, **16**, 832—841.
25. Banwell J. G., Hanke D. W., Dietrich D., (1978), *Infect. Immunity*, **21**, 613—618.
26. Finkelstein R. A., Lo Spalluto J. J., (1972), *Science*, **175**, 529—530.
27. Sigler P. B., Druyan M. E., Kiefer H. C. H., Finkelstein R. A., (1977), *Science*, **197**, 1277—1279.
28. Lo Spalluto J. J., Finkelstein R. A., (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **257**, 158—166.
29. Lai C. Y., Mendez E., Chang D., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S23—S30.
30. Van Heyningen S., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S5—S13.
31. Fishman P. H., Moss J., Osborne Jr., J. C., (1978), *Biochemistry*, **17**, 711—716.
32. Markel D. E., Hejtmancik K. E., Peterson J. W., Kurosky A., (1979), *J. Supramolec. Struct.*, **10**, 137—149.
33. Finkelstein R. A., La Rue M. K., Lo Spalluto J. J., (1972), *Infect. Immunity*, **6**, 934—944.
34. Lönnroth I., Holmgren J., (1973), *J. Gen. Microbiol.*, **76**, 417—427.
35. Van Heyningen S., (1974), *Science*, **183**, 656—657.
36. Finkelstein R. A., Boesman M., Neoh S. H., La Rue M., Delaney R., (1974), *J. Immunol.*, **113**, 145—150.
37. Holmgren J., Lönnroth I., (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **86**, 49—65.
38. Ohtomo N., Muraoka T., Tashiro A., Zinnaka Y., Amako K., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S31—S40.

39. Kurosky A., Markel D. E., Touchstone B., Peterson J. W., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S14—S22.
40. Gill M. D., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1242—1248.
41. Klapper D. G., Finkelstein R. A., Capra J. D., (1976), *Immunochem.*, **13**, 605—611.
42. Finkelstein R. A., Peterson J. W., Lo Spalluto J. J., (1971), *J. Immunol.*, **106**, 868—871.
43. Karpiak S. E., Mahadik S. P., Rapport M. M., (1978), *Exp. Neurol.*, **62**, 256—259.
44. Honda T., Finkelstein R. A., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 2052—2056.
45. Mendez E., Lai C. Y., Wodnar-Filipowicz A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1435—1443.
46. Mekalanos J. J., Collier R. J., Romig W. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5855—5861.
47. Jacobs J. W., Niall H. D., Sharp G. W. G., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 341—345.
48. Lai C. Y., Cancedda F., Chang D., (1979), *FEBS Letters*, **100**, 85—89.
49. Moss J., Richards R. L., Alving C. R., Fishman P. H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 797—798.
50. Moss J., Osborne Jr., J. C., Fishman P. H., Brewer Jr., H. B., Vaughan M., Brady R. O., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 74—78.
51. Sahyoun N., Cuatrecasas P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3438—3442.
52. Tomasi M., Battistini A., Ausiello C., Roda L. G., D'Agno G., (1978), *FEBS Letters*, **94**, 253—256.
53. Van Heyningen S., King C. A., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 269—271.
54. Wodnar-Filipowicz A., Lai C. Y., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 465—471.
55. Kurosky A., Markel D. E., Peterson J. W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7257—7264.
56. Lai C. Y., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7249—7256.
57. Lai C. Y., Mendez E., Chang D., Wang M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 215—222.
58. Narashima Y., Napiórkowski P., Schafer D. E., Konigsberg W. H., (1976), *FEBS Letters*, **68**, 275—278.
59. Tomasi M., Battistini A., Araco A., Roda L. G., D'Agno G., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **93**, 621—627.
60. Lönnroth I., Holmgren J., (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **91**, 263—277.
61. Mullin B. R., Aloj S. M., Fishman P. H., Lee G., Kohn L. D., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1679—1683.
62. Mullin B. R., Fishman P. H., Lee G., Aloj S. M., Ledley F. D., Winand R. J., Kohn L. D., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 842—846.
63. Kurosky A., Markel D. E., Fitch W. M., (1977), *Science*, **195**, 299—301.
64. Ledley F. D., Mullin B. R., Lee G., Aloj S. M., Fishman P. H., Hunt L., Dayhoff M. O., Kohn L. D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 852—859.
65. Hirschhorn N., Greenough W. B., (1971). *Sci. Amer.*, **225**, No 2, 15—21.



66. Gilliland D. G., Collier R. J., Moehring J. M., Moehring T. J., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 5319—5323.
67. Uchida T., Yamazumi M., Mekada E., Okada Y., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6307—6310.
68. Olsnes S., Refsnes K., Christensen T. B., Pihl A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 1—10.
69. Schafer D. E., Lust W. D., Sircar B., Goldberg N. D., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 851—856.
70. Sharp G. W. G., Hynie S., (1971), *Nature*, **229**, 266—269.
71. Kimberg D. V., Field M., Johnson J., Henderson A., Gershon E., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 1218—1230.
72. Field M., Fromm D., Al-Awquati Q., Greenough III W. B., (1972), *J. Clin. Invest.*, **51**, 796—804.
73. Hynie S., Sharp G. W. G., (1972), *Adv. Cyclic Nucleot. Res.*, **1**, 163—174.
74. Sharp G. W. G., (1973), *Ann. Rev. Med.*, **24**, 19—28.
75. Strewler G. J., Orloff J., (1977), *Adv. Cyclic Nucleot. Res.*, **8**, 311—363.
76. Forsyth G. W., Hamilton D. L., Goertz K. E., Johnson M. R., (1978), *Infect. Immunity*, **21**, 373—380.
77. Vaughan M., Pierce N. F., Greenough III, W. B., (1970), *Nature*, **226**, 658—659.
78. Field M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 3299—3303.
79. Gill D. M., King C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6424—6432.
80. Bennett V., Cuatrecasas P., (1975), *J. Membr. Biol.*, **22**, 29—52.
81. Petrella V. J., Zenser T. V., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **421**, 237—245.
82. Cassel D., Selinger Z., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3307—3311.
83. Lin M. C., Welton A. F., Berman M. F., (1978), *J. Cyclic Nucl. Res.*, **4**, 159—168.
84. Bennett V., Cuatrecasas P., (1975), *J. Membr. Biol.*, **22**, 1—28.
85. Cooper D. M. F., Schlegel W., Lin M. C., Rodbell M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8927—8931.
86. Evain D., Anderson W. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8726—8729.
87. Levinson S. L., Blume A. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3766—3774.
88. Lefkowitz R. J., Limbird L. E., Mukherjee C., Caron M. G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 1—39.
89. Rudolph S. A., Schafer D. E., Greengard P., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7132—7139.
90. O'Keefe E., Cuatrecasas P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2500—2504.
91. Beckman B., Flores J., Witkum P. A., Sharp G. W. G., (1974), *J. Clin. Invest.*, **53**, 1202—1205.
92. Bennett V., O'Keefe E., Cuatrecasas P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 33—37.
93. Flores J., Witkum P., Sharp G. W. G., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 450—458.
94. Moss J., Fishman P. H., Manganiello V. C., Vaughan M., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 1034—1037.
95. O'Keefe E., Cuatrecasas P., (1978), *J. Membr. Biol.* **42**, 61—78.
96. Houslay M. D., Elliot K. R., (1979), *FEBS Letters*, **104**, 359—363.
97. Vaughan M., (1976), w Eucaryotic Cell Function and Growth Regulation by

- Intracellular Cyclic Nucleotides, red. Dumont J. E., str. 113—121, Plenum, New York.
98. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3567—3577.
  99. Fischer J., Kohler T. R., Lipson L. G., Flores J., Witkum P. A., Sharp G. W. G., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 59—64.
  100. Hollenberg M. D., Fishman P. H., Bennett V., Cuatrecasas P., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 4224—4228.
  101. King C. A., van Heyningen W. E., Gascoyne N., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S75—S81.
  102. Van Sande J., Pochet R., Dumont J. E., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **585**, 282—292.
  103. Gill M. D., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S55—S63.
  104. Martin B. R., Houslay M. D., Kennedy E. L., (1977), *Biochem. J.*, **161**, 636—642.
  105. Beckner S., Blecher M., (1978), *FEBS Letters*, **95**, 319—322.
  106. Sinensky M., Minneman K. P., Molinoff P. B., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9135—9141.
  107. Van Heyningen W. E., Carpenter C. C. J., Pierce N. F., Greenough III, W. B., (1971), *J. Infect. Dis.*, **124**, 415—418.
  108. Cuatrecasas P., (1979), *Biochemistry*, **12**, 3558—3566.
  109. Holmgren J., (1973), *Infect. Immunity*, **8**, 851—859.
  110. King C. A., van Heyningen W. E., (1973), *J. Infect. Dis.*, **127**, 639—647.
  111. Van Heyningen W. E., (1974), *Nature*, **249**, 415—417.
  112. Van Heyningen S., (1974), *Science*, **183**, 656—657.
  113. Svennerholm L., (1963), *J. Neurochem.*, **10**, 613—623.
  114. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3547—3558.
  115. Manuelidis L., Manuelidis E. E., (1976), *Science*, **193**, 588—590.
  116. Holmgren J., Lönnroth I., Svennerholm L., (1973), *Infect. Immunity*, **8**, 208—214.
  117. Staerk J., Ronneberger H. J., Wiegandt H., Ziegler W., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **48**, 103—110.
  118. Donta S. T., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S115—S119.
  119. Wishnow R. M., Lifrak E., Chen C. C., (1976), *J. Infect. Dis.* **133**, S108—S114.
  120. Schwarzman G., Mraz W., Sattler J., Schindler R., Wiegandt H., (1978), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1277—1286.
  121. Holmgren J., Mansson J. E., Svennerholm L., (1974), *Med. Biol.*, **52**, 229—233.
  122. Moss J., Fishman P. H., Richards R. L., Alving C. R., Vaughan M., Brady R. O., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3480—3483.
  123. Ohsawa T., Nagai Y., Wiegandt H., (1977), *Jap. J. Exp. Med.*, **47**, 221—222.
  124. Moss J., Richards R. L., Alving C. R., Fishman P. H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 797—798.
  125. Richards R. L., Moss J., Alving C. R., Fishman P. H., Brady R. O., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 1673—1676.
  126. Tomasi M., Ausiello C., Battistini A., D'Agnolo G., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 309—312.
  127. Holmgren J., Lönnroth I., Mansson J. E., Svennerholm L., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2520—2524.



128. Hansson H. A., Holmgren J., Svennerholm L., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3782—3786.
129. Haksar A., Maudsley D. V., Péron F. G., (1974), *Nature*, **251**, 514—515.
130. Haksar A., Maudsley D. V., Péron F. G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **381**, 308—323.
131. Fishman P. H., Atikkan E. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4342—4344.
132. Bradley R. M., Kanfer J. N., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 210—212.
133. Suzuki Y., Suzuki K., (1972), *J. Lipid Res.*, **13**, 687—690.
134. Steck T. L., Dawson G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2135—2142.
135. Van Lenten L., Ashwell G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1889—1894.
136. Moss J., Manganiello V. C., Fishman P. H., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1876—1881.
137. Fishman P. H., Moss J., Vaughan M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4490—4494.
138. Fishman P. H., Bradley R. M., Moss J., Manganiello V. C., (1978), *J. Lipid Res.*, **19**, 77—81.
139. Holmgren J., Lonroth I., (1976), *J. Infect. Dis.*, **133**, S64—S74.
140. Kanfer J., Carter T. P., Katzen H. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7610—7619.
141. Pacuszka T., Moss J., Fishman P. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5103—5108.
142. Morita A., Tsao D., Kim Y. S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2549—2553.
143. Donta S. T., King M., (1973), *Nature New Biol.*, **243**, 246—247.
144. Brunngraber E. G., (1979), *Neurochemistry of Aminosugars*. Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois.
145. Sattler J., Schwarzman G., Knack J., Röhm K. H., Wiegandt H., (1978), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 719—723.
146. Fishman P. H., Moss J., Hom B., Pacuszka T., (1979), *Federation Proc.*, **38**, 825 Abstr.
147. Fishman P. H., Pacuszka T., Hom B., Moss J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7657—7664.
148. Shinitzky M., Souroujon M., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4438—4440.
149. Holmgren J., Lindholm L., Lönnroth I., (1974), *J. Exp. Med.*, **139**, 801—819.
150. Cuatrecasas P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3577—3581.
151. Boyle J. M., Gardner J. D., (1974), *J. Clin. Invest.* **53**, 1149—1158.
152. Dufau M. L., Horner K. A., Hayashi K., Tsuruhara T., Conn P. M., Catt K. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3721—3729.
153. Palfreyman J. W., Schulster D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **404**, 221—230.
154. Birnbaumer L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 129—158.
155. Perkins J. P., (1973), *Adv. Cyclic Nucl. Res.*, **3**, 1—64.
156. Houslay M. D., Ellory J. C., Smith G. A., Hesketh T. R., Stein J. M., Warren G. B., Metcalfe J. C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **467**, 208—219.
157. Houslay M. D., Palmer R. W., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 909—919.
158. Dipple I., Houslay M. D., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 663—666.

159. Peterson J. W., Lo Spalluto J.J., Finkelstein R. A., (1972), *J. Infect. Dis.*, **129**, 617—628.
160. Craig S. W., Cuatrecasas P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3844—3848.
161. Révész T., Greaves M., (1975), *Nature*, **257**, 103—106.
162. Sedlacek H. H., Stärk J., Seiler F. R., Ziegler W., Wiegandt H., (1976), *FEBS Letters*, **61**, 272—276.
163. De Cicco D., Greaves M. F., (1978), *Immunology*, **35**, 183—188.
164. Joseph K. C., Kim S. U., Stieber A., Gonatas N. K., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 2815—2819.
165. Joseph K. C., Stieber A., Gonatas N. K., (1979), *J. Cell Biol.*, **81**, 543—554.
166. Doyle D., Hou E., Warren R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6853—6856.
167. Farfel Z., Kaslow H. R., Bourne H. R., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1237—1241.
168. Cuatrecasas P., Hollenberg M. D., (1976), *Adv. Protein Chem.*, **20**, 252—451.
169. Jacobs S., Cuatrecasas P., (1977), *Trends Biochem. Sci.*, **2**, 280—282.
170. Skrzypek-Osiecka I., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 373—400.
171. Wheeler M. A., Solomon R. A., Cooper C., Hertzberg L., Mehta H., Miki N., Bitensky M. W., (1976), *J. Infect. Dis.* **133**, S89—S96.
172. Matuo Y., Wheeler M. A., Bitensky M. W., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2654—2658.
173. Gill D. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2064—2068.
174. Bitensky M. W., Wheeler M., Mehta H., Miki N. C., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2572—2576.
175. Birnbaumer L., Duran J. M., Nakahara T., Kaumann A. J., (1977), *Mammalian Cell Membranes*, red. Jamieson G. A., Robinson D. M., t. 5, str. 105—150. Butterworth, London, Boston.
176. Lad P. M., Welton A. F., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5942—5946.
177. Londos C., Cooper D. M. F., Schlegel W., Rodbell M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 5362—5366.
178. Johnson G. S., Mukku V. R., (1979), *J. Biol. Chem.* **254**, 95—100.
179. Mukku V. R., Anderson W. B., Johnson G. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5588—5590.
180. Limbird L. E., De Lean A., Hickey A. R., Pike L. J., Lefkowitz R. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 292—314.
181. Lin M. C., Lin C. S., Whitlock Jr., J. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4684—4688.
182. Tsai B. S., Lefkowitz R. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 28—41.
183. Iyengar R., Birnbaumer Y., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 3189—3193.
184. Levitzki A., Helmreich E. J. M., (1979), *FEBS Letters*, **101**, 213—218.
185. Moss J., Vaughan M., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4396—4400.
186. Enomoto K., Gill D. M., (1979), *J. Supramolec. Struct.* **10**, 51—60.



187. Gill D. M., Meren R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3050—3054.
188. Malbon C. C., Gill D. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 518—527.
189. Cassel D., Pfeuffer T., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 2669—2673.
190. Kandel J., Collier R. J., Chung D. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2088—2097.
191. Chung D. W., Collier R. J., (1977), *Infect. Immunity*, **16**, 832—841.
192. Pappenheimer Jr., A. M., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 69—94.
193. Moss J., Manganiello V. C., Vaughan M., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 4424—4427.
194. Moss J., Vaughan M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2455—2457.
195. Oppenheimer N. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4907—4910.
196. Mekalanos J. J., Collier R. J., Romig W. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5849—5854.
197. Tait R. M., Van Heyningen S., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 1059—1062.
198. Fernandes P. B., Welsh K. M., Bayer M. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9254—9261.
199. Skórko R., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 5—22.
200. Pfeuffer T., (1979), *FEBS Letters*, **101**, 85—88.
201. Howlett A. C., Sternweis P. C., Macik B. A., Van Arsdale P. M., Gilman A. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2287—2295.
202. Sternweis P. C., Gilman A. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3333—3340.
203. Londos C., Lad P. M., Nielsen T. B., Rodbell M., (1979), *J. Supramolec. Struct.*, **10**, 31—37.
204. Spiegel A. M., Downs Jr., R. W., Aurbach G. D., (1979), *J. Cyclic Nucl. Res.*, **5**, 3—17.
205. Limbird L. E., Hickey A. R., Lefkowitz R. J., (1979), *J. Cyclic Nucl. Res.*, **5**, 251—259.
206. Schlegel W., Kempner E. S., Rodbell M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5168—5176.
207. Martin B. R., Stein J. M., Kennedy E. L., Doberska C. A., Metcalfe J. C., (1979), *Biochem. J.*, **184**, 253—260.
208. Bakardijeva A., Galla H. J., Helmreich E. J. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3016—3023.
209. Cassel D., Eckstein F., Lowe M., Selinger Z., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9835—9838.
210. Ross E. M., Howlett A. C., Ferguson K., Gilman A. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6401—6412.
211. Pfeuffer T., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7224—7234.
212. Sahyoun N., Schmitges C. J., Le Vine III, H., Cuatrecasas P., (1977), *Life Sci.*, **21**, 1857—1864.
213. Hebdon M., Le Vine III, H., Sahyoun N., Schmitges C., Cuatrecasas P., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3693—3697.
214. Ross E. M., Gilman A. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6966—6969.
215. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 3113—3117.
216. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7120—7123.
217. Gill D. M., (1979), *J. Supramolec. Struct.*, **10**, 151—161.

218. Cassel D., Levkovitz H., Selinger Z., (1977), *J. Cyclic Nucl. Res.*, **3**, 393—406.
219. Johnson G. L., Bourne H. R., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 792—798.
220. Cassel D., Selinger Z., (1976), *Biochem. Biophys. Acta*, **452**, 538—551.
221. Lambert M., Svoboda M., Christophe J., (1979), *FEBS Letters*, **99**, 303—307.
222. Cassel D., Selinger Z., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 4155—4159.
223. Levitzki A., (1978), *Biochem. Pharm.*, **27**, 2083—2088.
224. Eckstein F., Cassel D., Levkovitz H., Lowe M., Selinger Z., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9829—9834.
225. Moss J., Vaughan M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **75**, 3621—3624.
226. Moss J., Stanley S. J., Oppenheimer N. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8891—8894.
227. Moss J., Stanley S. J., Lin M. C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11993—11996.
228. Holmgren J., Svennerholm A. M., (1979), *Current Microbiol.*, **2**, 55—58.
229. Nickols G. A., Brooker G., (1979), *J. Cycl. Nucleot. Res.*, **5**, 435—447.
230. Gill M. D., Richardson S. H., (1980), *J. Infect. Dis.*, **141**, 64—70.
231. Enomoto K., Gill M. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1252—1258.
232. Reed B. C., Moss J., Fishman P. H., Lane M. D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1711—1715.
233. Doberska C. A., Mac Pherson A. J. S., Martin B. R., (1980), *Biochem. J.*, **186**, 749—754.
234. Rodbell M., (1980), *Nature*, **284**, 17—22.
235. Hebdon G. M., Le Vine III H., Sahyoun N. E., Schmitges C. J., Cuatrecasas P., (1980), *Life Sci.*, **26**, 1385—1396.
236. Watkins P. A., Moss J., Vaughan M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3959—3963.
237. Lin M. C., Cooper D. M. F., Rodbell M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7250—7254.
238. Hudson T. H., Johnson G. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7480—7486.
239. Pinkett M. O., Jaworski C. J., Evain D., Anderson W. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7716—7721.
240. Moss J., Stanley S. J., Watkins P. A., Vaughan M., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7835—7837.
241. Fishman P. H., Atkkan E. E., (1980), *J. Membrane Biol.*, **54**, 51—60.
242. Fishman P. H., (1980), *J. Membrane Biol.*, **54**, 61—72.





EWA SIKORA \*)

## Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach

### Altered Enzymes in Aging Cells and Organisms

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Występowanie i własności zmienionych enzymów
- III. Mechanizmy powstawania zmienionych enzymów
- III—1. Utrata wierności syntezy białka
- III—2. Posttranslacyjne zmiany enzymów
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Occurrence and properties of altered enzymes
- III. Mechanisms of formation of altered enzymes
- III—1. Loss of fidelity of protein synthesis
- III—2. Post-translational modifications of enzymes
- IV. Concluding remarks

## I. Wprowadzenie

Prawdopodobnie nie ma takiej drugiej dziedziny biologii, na której temat powstałoby tyle różnych teorii, co nauka o starzeniu. Jednakże żadna z nich nie wyjaśnia w sposób wyczerpujący przyczyn tego zjawiska. Jedne z nich przyjmują, że starzenie się jest zaprogramowanym wydarzeniem genetycznym polegającym na ekspresji swoistych „genów starzenia” lub wyczerpaniu niezbędnych informacji genetycznych (1). Inne zakładają, że starzenie się wynika z nagromadzonych w komórkach w czasie ich życia przypadkowych (niezaprogramowanych) uszkodzeń. Według Orgela (2, 3), który sformułował hipotezę nazywaną „katastrofą błę-

\*) Mgr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, ul. Pasteura 3, 02—093 Warszawa.



dów”, pomyłki zachodzą na wszystkich etapach syntezy białka i są przyczyną powstawania zmienionych cząsteczek białkowych.

Błędy w enzymach takich jak polimerazy, syntetazy aminoacylo tRNA, enzymy aktywujące tRNA pociągają za sobą syntezę błędnych makromolekuł, które z kolei powodują dalszy wzrost ilości błędów w białkach. Prowadzi to do tzw. „kaskady błędów”, czyli utraty wierności syntezy białka i w rezultacie końcowym do śmierci komórki.

## II. Występowanie i własności zmienionych enzymów

Wychodząc z założeń teorii Orgela próbowano określić, czy w starzejących się organizmach, a także w komórkach hodowanych *in vitro*, wykazujących morfologiczne objawy starzenia się, występują „nienormalne” cząsteczki enzymatyczne. Okazało się, że większość z badanych enzymów wykazuje mniejszą aktywność specyficzną\*, a niektóre z nich dodatkowo obniżoną stabilność cieplną, w porównaniu z enzymami występującymi w młodych komórkach. Inne ich własności, jak masa cząsteczkowa, ładunek elektryczny i zachowanie się wobec inhibitorów pozostają na ogół bez zmian. Występowanie enzymów o zmniejszonej aktywności specyficznej w tkankach starych zwierząt podaje Tabela 1. Termolabilne formy mają: aldolaza (7), kinaza fosfoglicerynianowa (11), enolaza (19), liaza izocytrynianowa (5, 6) — występujące w tkankach wolnożyjących niciani *Turbatrix aceti*, a także aldolaza z mięśni szkieletowych i serca myszy (12), dysmutaza nadtlenkowa z wątroby szczura (16) oraz dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowa i 6-fosfoglukonianowa diploidalnych ludzkich fibroblastów z późnych pasaży (24). Termolabilną formę dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej wykryto także w fibroblastach ludzkich otrzymanych od dawców z objawami zespołów przedwczesnego starzenia się (20—22).

Zmniejszoną aktywność enzymów wyizolowanych ze starych organizmów czy komórek można wyjaśnić w następujący sposób (23):

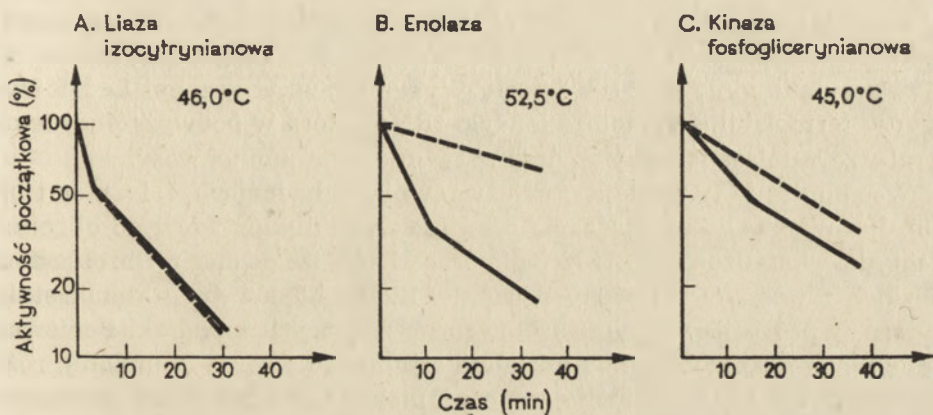
- „Stare”\*\* enzymy zawierają zarówno aktywne jak i częściowo nieaktywne termolabilne cząsteczki (np. liaza izocytrynianowa, 4, 6) (Ryc. 1A).
- „Stare” enzymy zawierają wyłącznie tylko częściowo aktywne cząsteczki dwóch rodzajów: termolabilne i mniej termolabilne. O występowaniu tego typu cząsteczek możemy sądzić na podstawie ana-

\* Aktywność enzymu powinna być wyrażona na mg czystego białka enzymatycznego lub jednostkę antysurowicy. Spadek aktywności enzymu mierzony w homogenacie na mg białka lub  $\mu\text{g}$  DNA nie musi wcale świadczyć o występowaniu zmienionych cząsteczek enzymu lecz może być spowodowany zmniejszoną ilością białka.

\*\* „Starymi” enzymami nazywa się enzymy występujące w tkankach starych organizmów lub komórkach hodowanych *in vitro* z późnych pasaży. Odpowiednio „młode” enzymy są to takie, które występują w młodych komórkach i organizmach.

lize wykresu stabilności cieplnej np. enolazy z nicieni (10) (Ryc. 1B).

- „Stare” enzymy zawierają aktywne, jak i całkiem nieaktywne cząsteczki. Wykres stabilności cieplnej takich enzymów przedstawia Rycina 1C. W tym przypadku nie stwierdza się żadnej różnicy pomiędzy właściwościami „młodych” i „starych” enzymów, gdyż całkowicie nieaktywne cząsteczki wchodzące w skład tych ostatnich nie mają żadnego wpływu na stabilność cieplną (np. kinaza fosfoglicerynianowa (11) i aldolaza (8) z nicieni).



Ryc. 1. Wykresy stabilności cieplnej „młodych” i „starych” enzymów.

— — — „młody” enzym; — „stary” enzym

Dane dotyczące lizy izocytrynianowej wg (4,6), enolazy (10), kinazy fosfoglicerynianowej (8).

### III. Mechanizmy powstawania zmienionych enzymów

#### III—1. Utrata wierności syntezy białka

Fakt występowania w starych tkankach zmienionych enzymów jest bezsporny. Do dzisiaj jednak toczy się dyskusja nad mechanizmami tych zmian. Teoria Orgela ma zarówno wielu przeciwników, jak i zwolenników. Holliday i Tarrant (24) opierając się na założeniach tej teorii, jako pierwsi wykazali, że analog uracylu wchodzącego w skład RNA, 5-fluorouracyl, wywołuje przyspieszone starzenie się ludzkich diploidalnych komórek hodowanych *in vitro* (zmniejszona liczba podwojeń populacji w stosunku do hodowli kontrolnej). Starzenie to jest poprzedzone pojawieniem się zmienionych termolabilnych enzymów: dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej i dehydrogenazy 6-fosfoglukonianowej, które występują również w komórkach z późnych pasażu hodowanych bez 5-fluorouracylu. Podobny efekt przedwczesnego starzenia się wywołują analogi aminokwasów. Długość życia dorosłych form *Drosophila* ulegała wyraźnemu skróceniu podczas karmienia ich larw analogami argininy, metioniny, fe-



nyloalaniny i tryptofanu (25). Również skróceniu ulegała długość życia grzyba *Podospora anserine* hodowanego w obecności fluorofenyloalaniny i etioniny podanych w niskim, nietoksycznym stężeniu (26). Zdaniem autorów wspomnianych eksperymentów wyniki ich badań przemawiają na korzyść teorii Orgela, gdyż błędy zaindukowane w białkach poprzez wprowadzenie zmian na etapie transkrypcji (5-fluorouracyl), czy też translacji (analogi aminokwasowe), powodowały przedwczesne starzenie. Jednakże dowody te są pośrednie i właściwie do dnia dzisiejszego mamy tylko jeden bezpośredni dowód na to, że nagromadzenie się błędów w syntezie białka prowadzi do śmierci (27). Mutant *Neurospora crassa* tzw. Leu-5, w niskiej temperaturze 20—25°C rośnie normalnie, podobnie jak szczep dziki. Natomiast jeśli temperatura środowiska zostanie podwyższona do 35°C grzybnia ginie po 3—4 dniach. Wykazano, że w grzybni Leu-5 występuje termolabilna syntetaza leucylo-tRNA, która w podwyższonej temperaturze zamiast leucyny mylnie aktywuje inne aminokwasy.

Wspomnieć w tym miejscu należy również o badaniach Lin n'a i in. (28). Porównywali oni włączanie niewłaściwych nukleotydów do oligonukleotydów katalizowane przez polimerazę DNA izolowaną z fibroblastów ludzkich z wczesnych i późnych pasaży. Liczba błędów była kilkakrotnie wyższa w przypadku enzymu izolowanego ze starych komórek. Ponieważ jednak synteza przebiegała z udziałem sztucznego wzorca (*template*), różniącego się od DNA zapewniającego normalne funkcjonowanie polimerazy, do wyników tego eksperymentu należy podchodzić bardzo ostrożnie.

Jak wspomniano wyżej, nie wszyscy badacze są zwolennikami teorii „katastrofy błędów”. Uważa się, że może ona dotyczyć zjawisk zachodzących w komórkach postmitotycznych. W populacjach komórek zdolnych do proliferacji, komórki z nagromadzonymi błędami są prawdopodobnie usuwane na drodze selekcji (29). Nie stwierdzono np. zmniejszenia całkowitej ilości podwojeń populacji fibroblastów ludzkich hodowanych w obecności fluorofenyloalaniny i etioniny (29). Na niekorzyść teorii Orgela przemawiają również wyniki badań enzymów wolnożyjących nicieni (30). U zwierząt tych badano ilość nieaktywnej aldolazy po jednorazowym podaniu kanawaniny i 6-fluorotryptofanu. Okazało się, że w organizmach młodych zwierząt „nienormalne” białka zostają szybko rozłożone i zastąpione białkami prawidłowymi. Początkowa wysoka śmiertelność młodych zwierząt w populacji wraca do przeciętnej charakterystycznej dla zwierząt kontrolnych. Przeprowadzono również badania polegające na zakażeniu wirusami diploidalnych ludzkich komórek z różnych pasaży, wychodząc z założenia, że funkcjonowanie starych komórek ma wpływ na tworzenie się cząstek wirusa. Nie wykryto jednak różnic ani w ilości, ani w cechach wirusów produkowanych w młodych i starych komórkach (31, 32).

Wiadomo również, że wszelkie zmiany w składzie aminokwasowym białek pociągają za sobą zmiany w ładunku elektrycznym. Nie udało się

wykryć takich zmian w wielu badanych „starych” enzymach wykazujących zmniejszoną aktywność specyficzną, stosując takie metody jak elektroforeza (6, 7, 11, 16, 18), czy też bardzo czuła metoda jaką jest izoelektroogniskowanie (13, 33).

### III—2. Posttranslacyjne zmiany enzymów

Jako alternatywny mechanizm powstawania zmienionych enzymów podaje się coraz częściej występowanie posttranslacyjnych modyfikacji białek. Jedną z lepiej opisanych modyfikacji, która może mieć znaczenie w procesie starzenia się białek jest deamidacja reszt asparagilowych i glutamyliowych (34—36). *In vivo* obserwuje się występowanie czterech białek deamidowanych nieenzymatycznie. Hemoglobina *Providence N*<sup>\*)</sup> ulega konwersji do hemoglobiny *Providence D* poprzez deamidację pojedynczej reszty asparagilowej. Ilość tej ostatniej rośnie wraz z wiekiem erytrocytów (36). Aldolaza z mięśnia królika występuje jako tetramer składający się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i dwóch  $\beta$ . W mięśniach młodych królików dominuje forma  $\alpha$ , a starych  $\beta$ , która powstaje w wyniku deamidacji reszty asparagilowej w białku  $\alpha$  (37). Alfa krystalina (*Alfa krystallin*) w sozczewce wołu różni się od formy embrionalnej liczbą grup amidowych (38, 39). W trakcie kilku kolejnych procesów deamidacji glutaminy i asparaginy w cząsteczce cytochromu C szczura, powstają cztery jego formy różniące się zarówno konformacją jak i aktywnością oksydoredukcyjną (40, 41).

Rozpatrywano również problem proteolitycznego odszczepiania końcowych grup aminokwasów. Starzenie się w ten sposób dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w ludzkich erytrocytach (42) jest jednakże przypadkiem raczej odosobnionym, nie znajdującym potwierdzenia w badaniach pod kątem innych enzymów (43, 44).

Ponadto zarówno deamidacja reszt asparagilowych i glutamyliowych jak i proteoliza końcowych aminokwasów, a także inne rodzaje modyfikacji jak fosforylacja, acetylacja, adenylacja, glikozylacja powodują zmianę ładunku elektrycznego w białku. Jak wspomniano wyżej, nie wykryto różnic w ładunkach badanych „młodych” i „starych” enzymów. Jedynie więc modyfikację przez utlenianie grup SH i metioniny, można rozpatrywać jako przyczynę zmian w „starych” białkach, gdyż nie pociąga za sobą zmian ładunku elektrycznego. Niestety niewiele danych doświadczalnych zgromadzono na ten temat. Do tej pory stwierdzono jedynie występowanie tej modyfikacji w dysmutazie nadtlenkowej z wątroby szczura (45). Zwiększona oporność aldolazy z nicieni (8) na działanie podwyższonej

<sup>\*)</sup> Hemoglobina *Providence N* stanowi formę zmutowaną — w pozycji  $\beta$  82 zamiast lizyny jest asparagina, która w trakcie deamidacji przechodzi w kwas asparaginowy (hemoglobina *Providence D*).



temperatury może być również rezultatem wewnątrzcząsteczkowych połączeń powstałych na skutek utleniania grup SH. Badanie „starej” enolazy (46) w celu wykrycia utleniania grup SH nie dało pozytywnych rezultatów.

Mniejszą aktywność „starych” enzymów w porównaniu z „młodymi” próbuje się także wyjaśnić występowaniem w ich cząsteczkach subtelnymi zmian konformacyjnymi, które nie mają wpływu na ładunek elektryczny białka (23). Zauważono mianowicie występowanie różnic spektralnych pomiędzy natywnej „starą” i „młodą” enolazą z nicieni, których nie obserwuje się w warunkach denaturujących białko (w obecności mocznika i guanidyny) (47). Postuluje się, że zmiany konformacyjne mogą zachodzić podczas zwolnionego obrotu białek w starych organizmach (23), bez obawy, że zmienione enzymy zostaną szybko zastąpione przez białka prawidłowe. Zgodnie z tym założeniem białka bardzo stabilne nie ulegają zmianom, inne mają jedną lub więcej form pośrednich, częściowo aktywnych, natomiast białka najmniej stabilne ulegają denaturacji bezpośrednio do form nieaktywnych. Np. enolaza z nicieni zawiera trzy typy cząsteczek, co można stwierdzić na podstawie krzywej stabilności cieplnej: enolazę „młodą”, „termolabilną starą” i „mniej termolabilną starą” (6). „Stara” aldolaza z nicieni natomiast zawiera normalne jak i nieaktywne cząsteczki (8). Niewiele jest danych doświadczalnych na temat zwolnienia czasu obrotu białka w starych organizmach. Wiadomo, że okres półtrwania aldolazy z tkanek młodego nicienia z 40 godz. wzrasta do 200 godz. w tkankach starego (7). Podobny efekt obserwowano także w przypadku enolazy z nicieni (48). Jednakże nie znaleziono różnic związanych z wiekiem w okresie półtrwania mitochondrialnych białek z różnych tkanek szczura (49) jak również nie wykryto zmian czasu obrotu białka w wątrobie starych szczurów w porównaniu z młodymi (50).

#### IV. Uwagi końcowe

Występowanie zmienionych enzymów w starych organizmach, czy kulturach tkankowych, jest już dzisiaj udowodnione. Większość badanych enzymów wykazuje spadek aktywności specyficznej od 30 do 80% na jednostkę antysuwrowicy lub mg oczyszczonego białka, jako funkcji wieku (Tabela 1). Badane enzymy otrzymywano z różnych tkanek zwierząt, ale trzeba zaznaczyć, że kilka z przebadanych enzymów nie ma nieaktywnych form np. aldolaza z mięśni ludzkich (51), dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa z ludzkiej wątroby (52), dekarboksylaza ornitynowa z wątroby szczura (53) oraz izomeraza triozofosforanowa z wolnożyjących nicieni *Turbatrix aceti* (44). Przyczyny braku zmian aktywności mogą być następujące:

1) Niektóre typy modyfikacji zmieniają różne białka w niejednakowym stopniu. Na przykład oksydacja grup SH jest możliwa w różnych warun-

Tabela 1

Występowanie enzymów o zmniejszonej aktywności specyficznej w tkankach starych zwierząt

Enzym	Źródło	Aktywność specyficzna „starego” enzymu (w %) w odniesieniu do aktywności „młodego” (100%)
Liaza izocytrynianowa (4, 5, 6)	Nicień <i>Turbatrix aceti</i>	30
Aldolaza (7, 8)	„	30
Czynnik wydłużający EF <sub>1</sub> (9)	„	75
Enolaza (10)	„	58
Kinaza-3-fosfoglicerynianowa (11)	„	50
Aldolaza A (12, 13)	mięśnie szkieletowe myszy	65
Aldolaza A (12)	serce myszy	63
Aldolaza A (14)	erytrocyty z krwi królika	44
Aldolaza B (15)	wątroba myszy	50
Dysmutaza nadtlenkowa (16, 17)	wątroba szczura	43
	serce szczura	80
	mózg szczura	80
Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (18)	erytrocyty z krwi ludzkiej	25

kach fizjologicznych, ale tylko wtedy gdy grupy te są wyeksponowane. Niektóre białka nie mają takich dostępnych grup SH i w tych samych warunkach utleniania mogą pozostać bez zmian.

2) Niektóre zmienione białka nie muszą być tolerowane przez komórkę i są szybko degradowane, a w związku z tym trudne do wykrycia. Natomiast modyfikacje w innych białkach nie muszą być przyczyną ich szybkiej degradacji.

3) Część białek może ulegać modyfikacji do form nie wykazujących zgodności immunologicznej w stosunku do przeciwciała otrzymanego dla prawidłowego białka.

4) Jest prawdopodobne, że niektóre zmienione formy są eliminowane podczas oczyszczania enzymu.

5) Występowanie zmienionych form enzymatycznych jako funkcji wieku nie musi być wcale zjawiskiem uniwersalnym.

Dziękuję Pani doc. dr hab. Barbarze Grzelakowskiej-Sztabert za cenne uwagi i sugestie podczas przygotowywania niniejszego tekstu.

ZAAKCEPTOWANO DO DRUKU 10.6.1980



## PIŚMIENNICTWO

1. Wright W. E., Hayflick L., (1975), *Exp. Cell Res.*, **96**, 113—121.
2. Orgel L. E., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **49**, 517—521.
3. Orgel L. E., (1973), *Nature*, **243**, 441—445.
4. Gershon H., Gershon D., (1970), *Nature*, **227**, 1214—1217.
5. Reiss U., Rothstein M., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1012—1016.
6. Reiss U., Rothstein M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 826—830.
7. Zeelon P., Gershon H., Gershon D., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1743—1750.
8. Reznick A., Gershon D., (1977), *Mech. Ageing Dev.* **6**, 345—353.
9. Bolla R., Brot N., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 227—236.
10. Sharma H. K., Gupta S. K., Rothstein M., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 324—332.
11. Gupta S. K., Rothstein M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 632—644.
12. Gershon H., Gershon D., (1973), *Mech. Ageing Dev.*, **2**, 33—41.
13. Chetsanga C. J., Liskiwskyi M., (1977), *Int. J. Biochem.*, **8**, 753—756.
14. Mennequier F., Dreyfus J. C., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 320—326.
15. Gershon H., Gershon D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 909—913.
16. Reiss U., Gershon D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 255—267.
17. Reiss U., Gershon D., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **63**, 617—623.
18. Kahn A., Boivin P., Vibert M., Cottreau D., Dreyfus J. C., (1974), *Biochimie*, **56**, 1395—1407.
19. Sharma H. K., Gupta S. K., Rothstein M., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 324—332.
20. Holliday R., Porterfield J., Gibbs D., (1974), *Nature*, **248**, 762—763.
21. Goldstein S., Singal D., (1974), *Nature*, **251**, 719—721.
22. Goldstein S., Moerman E., (1975), *New England J. Med.*, **292**, 1305—1309.
23. Rothstein M., (1979), *Mech. Ageing Dev.*, **9**, 197—202.
24. Holliday R., Tarrant G. M., (1972), *Nature*, **238**, 26—30.
25. Harrison B. J., Holliday R., (1967), *Nature*, **213**, 990—992.
26. Holliday R., (1969), *Nature*, **221**, 1224—1226.
27. Lewis C. M., Holliday R., (1970), *Nature*, **228**, 877—880.
28. Linn S., Kairis M., Holliday R., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2818—2822.
29. Ryan J. M., Duda G., (1974), *J. Geront.*, **29**, 616—621.
30. Reznick A. Z., Gershon D., (1979), *Mech. Ageing Dev.*, **11**, 403—415.
31. Tomkins G., Stanbridge E. J., Hayflick L., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 385.
32. Pitha J., Stork E., Wimmer E., (1975), *Exp. Cell Res.*, **94**, 310—314.
33. Goren P., Reznick A. Z., Reiss U., Gershon D., (1977), *FEBS Lett.*, **84**, 83—86.
34. Mc Kerrow J. M., (1979), *Mech. Ageing Dev.*, **10**, 371—377.

35. Robinson A. B., Rudd C. J., (1974), *Current Topics in Cellular Regulation*, 8, Academic Press, New York, 247—294.
36. Charache S., Fox J., Mc Curdy P., Kazazian H., Winslon R., (1977), *J. Clin. Invest.*, 59, 652—658.
37. Lai C. Y., Chen C., Horecker B. L., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 40, 461—468.
38. Palmer W. G., Papaconstantinou J., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 64, 404—410.
39. Bloemendal H., Berns A. J. M., van der Ouderaa F., De Jong W. W. W., (1972), *Exp. Eye Res.*, 14, 80—81.
40. Flatmark T. T., (1966), *Acta Chem. Scand.*, 20, 1487—1496.
41. Flatmark T. T., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, 2454—2459.
42. Kahn A., Bertrand O., Cottreau D., Boivin P., Dreyfus J. C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 65—72.
43. Gershon H., Gershon D., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 909—913.
44. Gupta S. K., Rothstein M., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 333—338.
45. Gershon D., (1979), *Mech. Ageing Dev.*, 6, 241—257.
46. Rothstein M., (1977), *Mech. Ageing Dev.*, 6, 241—257.
47. Sharma H. K., Rothstein M., (1978), *Biochemistry*, 17, 2869—2875.
48. Sharma H. K., Prasanna H. R., Lane R. S., Rothstein M., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, 194, 275—282.
49. Menzies R. A., Gold P. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 2425—2429.
50. Comoli R., Ferioli M. E., Azzalo S., (1972), *Exp. Gerontol.*, 7, 369—376.
51. Steinhagen-Thiessen G., Hilz H., (1976), *Mech. Ageing Dev.*, 5, 447—457.
52. Yagil G., (1976), *Exp. Gerontol.*, 11, 73—78.
53. Obenrader M., Prouty W. F., (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 2866—2872.



## KOMUNIKATY

W dniach 16 do 18 września 1981 r. odbędzie się we Wrocławiu XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Zjazd jest otwarty dla wszystkich interesujących się zagadnieniami biochemicznymi i pokrewnymi, ma służyć wymianie poglądów i doświadczeń, oraz integracji środowiska naukowego.

Wstępny program Zjazdu przewiduje 4 Sympozja obejmujące następujące zagadnienia:

1. Receptory powierzchni komórek
2. Lektyny
3. Struktura biopolimerów
4. Zmienność gatunkowa enzymów
5. Doniesienia różne — sesja plakatowa

Zgłoszenia należy kierować na adres Komitetu Organizacyjnego XVIII-go Zjazdu PTBioch, 50-368 Wrocław, ul. Chałubińskiego 10, Zakład Biochemii A.M.

\* \*

Specjalny Zjazd FEBS na temat funkcji i różnicowania się komórek, Grecja — Ateny, 25-29 kwiecień 1982 r.; informacji na temat Zjazdu udziela Sekretariat Zjazdu: Special FEBS Meeting, Nuclear Research Center Demokritos, Dept. of Biology, Aghia Paraskevi, Attikis, Greece

## NOWE W BIOCHEMII

### Wykorzystanie genu *lacI* dla określenia specyficzności mutacji

Od czasu gdy Benzer (1) wykazał, że mutacje spontaniczne, jak i indukowane, nie są równomiernie rozproszone w genomie bakteriofaga T4, ale w pewnych miejscach pojawiają się ze znacznie większą częstotliwością (*hot spots*), wiele uwagi poświęcono wyjaśnieniu tego zjawiska. Nieznajomość sekwencji fragmentu DNA ulegającego mutacji, jak też sekwencji białka przez niego kodowanego, ograniczało wyciąganie wniosków. Wśród niewielu układów stosowanych dla oznaczenia zmian zachodzących w genomie, jednymi z łatwiejszych do interpretacji były układy oparte na badaniach przemian zachodzących w kodonach terminalnych. I tak na przykład z prostych porównań szyfru kodu genetycznego wynika, że zmiany typu tranzycji par zasad AT → GC, mogą prowadzić do otrzymania z kodonu UAG (amber) kodonu CAG (glutamina) lub UGG (tryptofan), a zmiany typu tranzycji GC → AT do otrzymania kodonu terminalnego UAA (ochre). Badania te wykazały, że istnieją ogromne różnice w częstości mutacji tej samej pary zasad występującej w kodonie amber, pod wpływem tego samego mutagenu, w zależności od miejsca występowania kodonu amber. Te różnice przypisywano wpływowi zasad sąsiednich (*neighbour effect*). Notowanie dużej rozpiętości w szybkości konwersji różnych mutantów ochre do opal (UAA → UGA) i *vice versa*, gdzie obydwie przylegające zasady są identyczne świadczy, że nie tylko sąsiedztwo przylegających zasad, ale i inne czynniki z zewnątrz, decydują o szybkości mutacji (2).

Ostatnio Miller i wsp. (3, 4) opracowali doskonały układ doświadczalny dla badania zjawiska „*hot spots*”, jak też i specyficzności działania mutagenów. Układ ten obejmuje badanie mutacji postępowych (*forward*) które prowadzą do otrzymania mutantów amber i ochre w genie *lacI* *E. coli*, kodującym białko represora operonu *lac*. Gdy Miller rozpoczął swoje badania znany był skład i sekwencja aminokwasów białka represora. Obecnie znany jest skład i sekwencja nukleotydów genu kodującego represor laktozy, co pozwala, po ustaleniu miejsca mutacji, na określenie w sposób jednoznaczny zmian zachodzących w sekwencji nukleotydów.

Gen kodujący białko represora *lac* zawiera 73 potencjalne miejsca, które poprzez zmianę jednej pary zasad mogą prowadzić do otrzymania kodonów terminalnych amber lub ochre. Każda taka zmiana powoduje utratę funkcjonalnego białka i w konsekwencji indukcję β-galaktozydazy. Tranzycję GC do AT można śledzić w 26 miejscach genu *lacI*, transwersję AT do TA w 19-tu, transwersję AT do CG w 5-ciu, a GC do CG w 3-ech miejscach. Nie można jedynie śledzić tranzycji AT do GC, gdyż zmiany tego typu nie prowadzą do powstawania z kodonów sensownych kodonów amber czy ochre.

W metodzie Millera można wyróżnić kilka etapów: 1) oznaczenie częstości mutacji *lacI* (poprzez obliczenie powstałych mutantów rosnących na płytkach z cukrem nieindukującym operonu *lac*—β-fenilo-D-laktozą), 2) losowe izolowanie z każdej płytki 20—25 kolonii i identyfikacja wśród nich mutantów amber i ochre (poprzez badanie zdolności ich supresji), i 3) zachowanie po jednym mutancie (pierwszym napotkanym) amber i ochre izolowanych z odrębnych hodowli bakteryjnych, oznaczenie pozycji danej mutacji oraz typu zmian zasad (poprzez oznaczenie wzoru supresji i krzyżowanie genetyczne ze szczepami delecyjnymi w genie *lacI*).



Opracowanie tego układu umożliwiła bardzo dokładna znajomość systemu indukcji operonu *lac*, znajomość natury szeregu mutantów i metod ich selekcji, dostępność różnych mutantów zawierających znane supresory i otrzymanie wielu mutantów delecyjnych w rejonie *lac*. Sam proces mutacji badany jest w operonie umieszczonym nie na chromosomie bakteryjnym, z którego operon *lac* został wydeletowany, ale na episomie F', co pozwala na dowolne przeniesienie mutacji do odpowiednich szczepów bakteryjnych, w celu ustalenia wzoru supresji lub miejsca mutacji.

Pewną niedogodnością układu jest jego wielka pracochłonność. Miller, aby oznaczyć spektrum mutacji, izolował niekiedy ponad 1000 mutantów amber i ochre. Ale często zadawalające wyniki można uzyskać po izolacji 200—300 mutantów. Jednak warto podkreślić, że szereg stosowanych metod zostało uproszczonych. Krzyżówki ze szczepami supresorowymi, czy szczepami zawierającymi delecję w *lacI* odbywają się na płytkach, techniką replikacji. I trzeba przyznać, że mimo swej złożoności i wieloetapowości, układ ten pracuje bezbłędnie.

Stosując ten układ Coulondre i Miller (4) wykazali po raz pierwszy, że pod wpływem promieni UV istotna część mutacji następuje poprzez zmianę dwóch kolejnych nukleotydów. Jest to wynik, którego powinniśmy spodziewać się, gdyż jest on zgodny z logicznym następstwem przyjęcia dimerów pirymidyn za główną przyczynę mutacji.

Innym zaskakującym wynikiem było stwierdzenie, że przy otrzymaniu mutacji amber, miejscem szczególnie wyraźliwym (*hot spot*) na działanie 2-aminopuryny jest sekwencja:  $\begin{matrix} \text{C} & \text{NAG} \\ \text{G} & \text{GTC} \end{matrix}$  z obecnością 5-metylocytozyny ( $C^m$ ) w miejscu mutacji (5). Nasunęło to przypuszczenie, że tranzycja  $GC \rightarrow AT$  w tym przypadku, jest wynikiem reakcji wtórnej (6), wywołanej włączeniem się 2-aminopuryny naprzeciw 5-metylocytozyny. Z porównania bowiem zdolności zasad do tworzenia wiązań komplementarnych wynika, że grupa aminowa 5-metylocytozyny w parze z 2-aminopuryną (przeciwieństwo niż w parze z guaniną) pozostaje wolna i dlatego łatwo może ulegać dezaminacji. W efekcie dezaminacji powstaje tymina, czyli zachodzi tranzycja  $GC \rightarrow AT$ .

Istotnie obraz indukcji mutacji amber w rejonie *lacI* pod wpływem 2-aminopuryny u mutantów *dem*<sup>-</sup> (brak enzymu metylującego cytozynę w DNA) zmienia się drastycznie (Janion, Glickman, w opracowaniu).

Stwierdzono również, że pod wpływem  $N^4$ -hydroksycytydyny (silny mutagen typu analogów zasad), mimo indukcji mutantów *lacI* i *str*<sup>r</sup>, nie można uzyskać mutantów amber ani ochre (7). Świadczy to o braku indukcji tranzycji  $GC \rightarrow AT$ , i potwierdza wyniki wcześniejszych prac przeprowadzanych w układach bakteriofagów (8, 9) o specyficznym działaniu  $N^4$ -hydroksycytydyny, powodującym jednokierunkową tranzycję par zasad  $AT \rightarrow GC$ .

Z tych nielicznych, podanych przykładów wynika, że analiza specyficzności mutacji w układzie opracowanym przez Millera, stanowi dobre narzędzie badawcze pozwalające na wgląd w skomplikowane układy zmienności mutacyjnej u bakterii.

C. Janion

## PISMIENICTWO

1. S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1961) 47, 403—416.
2. Y. Salts, A. Ronen, *Mutation Res.* (1971) 13, 109—113.
3. J. H. Miller, D. Ganem, P. Lu, A. J. Schmitz (1977) *J. Mol. Biol.*, 109, 275—302.
4. C. Coulondre, J. H. Miller, (1977) *J. Mol. Biol.*, 117, 577—606.

5. C. Colouandre, J. H. Miller, P. J. Farabaugh, W. Gilbert *Nature* (1978) 274, 775—780.
6. C. Janion, *FEBS*, Vol. 63, *DNA: Recombination, interactions and repair* (S. Zadrzil and J. Sponar, Edts.) Pergamon Press (1980) str. 531—535.
7. C. Janion, B. W. Glickman, *Mutation Res.* (1980) 72, 43—47.
8. C. Janion, E. Kajtaniak, *Mutation Res.* (1979) 62, 191—195.
9. E. Sledziewska, C. Janion, *Mutation Res.* (1980) 70, 11—16.

### Model struktury miejsc rybosomalnych A i P

Powszechnie uznany schemat procesu translacji został zaproponowany przez Watsona 15 lat temu (1); zakłada on istnienie dwóch miejsc rybosomalnych:

1. miejsca rybosomalnego „A”, do którego przyłącza się aminoacylo-tRNA (AA-tRNA),
2. miejsca peptydylowego „P”, w którym znajduje się zsyntetyzowany peptydylotRNA.

Hipotezy o istnieniu innych miejsc aktywnych na rybosomie w trakcie procesu wydłużania łańcucha polipeptydowego (np. tzw. miejsce pre—A lub R) (2, 3) nie zostały w pełni potwierdzone.

Zasadniczym problemem badawczym dotyczącym bezpośrednio funkcji rybosomu w procesie translacji jest wyjaśnienie struktury miejsc rybosomalnych A i P, czyli lokalizacja białek i kwasów nukleinowych tworzących te centra aktywne. Dzięki pracom Wittmana (4), Lake'a (5) i Boublika (6) konfiguracja rybosomu bakteryjnego oraz mapa topograficzna jego białek jest bliska ostatecznego rozwiązania. Modele rybosomu prokariotycznego z dwóch pracowni (Wittmana i Boublika) są w pełni zgodne (informacja prywatna od H. G. Wittmana); natomiast model Lake'a różni się od dwóch poprzednich jedynie ułożeniem mniejszej podjednostki rybosomalnej w stosunku do większej.

Przystępując do lokalizacji miejsc A i P konieczne jest przyjęcie pewnych wstępnych założeń, a mianowicie:

1. na rybosomie muszą znajdować się jednocześnie dwie molekuly AA-tRNA (względnie AA-tRNA i peptydylotRNA),
2. oba antykodony muszą leżeć w swym bezpośrednim sąsiedztwie,
3. dwie cząsteczki aminokwasów (będące na przeciwnych końcach molekuly transferowego RNA w stosunku do antykodonu) powinny znajdować się wystarczająco blisko siebie, aby mogło nastąpić utworzenie wiązania peptydowego.

W pracowni Jamesa Ofenganda dla lokalizacji miejsca przyłączenia AA-tRNA oraz miejsca peptydylowego zastosowano głównie dwie techniki: wiązania krzyżowe (ang. *crosslinking*) oraz immunomikroskopię elektronową powinowactwa (ang. *affinity immunoelectron microscopy*) (8—11).

Wiązanie krzyżowe jest wytwarzane pomiędzy zmodyfikowaną cząsteczką aminoacylo-tRNA a białkami rybosomalnymi w wyniku naświetlania promieniowaniem nadfioletowym (UV) (ang. *photoaffinity labelling*). Światło wysokoenergetyczne o długości fali w przedziale 300—400 nm powoduje utworzenie wiązania kowalentnego pomiędzy wysoce reaktywną grupą funkcyjną (zazwyczaj syntetyzowaną chemicznie) a aktywnym miejscem substratu. Dla tworzenia wiązań krzyżowych są często stosowane azydki arylowe; w omawianej pracowni wybrano dla tego celu dwa następujące związki: 2-nitro-4-azydofenyloglicynę (NAG) oraz p-azydofenacyl (APA). Związki te przyłączają się specyficznie do dwóch rzadkich nukleotydów występujących w cząsteczce tRNA, a mianowicie odpowiednio do 4-tiourydyny (4S) i 3-(amino-



3-karboksypropylo)-urydyny (acp<sup>3</sup>U). W przypadku tRNA specyficznego dla fenyloalaniny z *E. coli* te nukleotydy znajdują się w pozycjach 8 i 47.

Wykonane zostały odpowiednie próby kontrolne kwalifikujące przygotowany w ten sposób tRNA do badań nad lokalizacją miejsc A i P. Stwierdzono, że zmodyfikowana w ten sposób cząsteczka Phe-tRNA nie traci swej aktywności biologicznej i jest prawidłowo rozpoznawana przez faktor elongacyjny EF Tu. Reakcja przyłączania do rybosomu zachodziła *in vitro* zarówno w sposób enzymatyczny jak i nieenzymatyczny w standardowych warunkach, tj. w obecności mRNA i GTP. Miejsca rybosomalne A i P różniono na podstawie tzw. reakcji puromycynowej. Antybiotyk puromycyna ma strukturę chemiczną podobną do końca aminoacylowego cząsteczki AA-tRNA. Po przyłączeniu puromycyny do miejsca A rybosomu następuje utworzenie peptydylopuromycyny. Uwolnienie tego związku z kompleksu rybosomalnego, a więc przerwanie biosyntezy polipeptydu, zachodzi z pominięciem przeniesienia go do miejsca P. Funkcjonalność biologiczną przyłączonych modyfikowanych Phe-tRNA wykazano poprzez tworzenie dwupeptydu. W laboratorium J. Ofenganda wiązanie pomiędzy grupą dwufunkcyjną modyfikowanego Phe-tRNA a białkami rybosomalnymi było wytwarzane w wyniku naświetlania układu reakcyjnego promieniowaniem UV o długości fali w przedziale 300—325 nm, które nie powoduje zniszczenia subtelnej struktury rybosomu. Wykluczona została możliwość tworzenia wiązania kowalentnego przez inne fragmenty molekuly Phe-tRNA, jak również tworzenia połączenia mostkowego (ang. *bridge linkage*) poprzez inne białka, znajdujące się w pobliżu, a nie uczestniczące w tworzeniu miejsc A lub P. Warto zaznaczyć, że zastąpienie GTP przez jego niehydrolizujący analog GDCPC (co zapobiega uwalnianiu EF Tu z rybosomu) całkowicie blokowało tworzenie wiązania krzyżowego. Dla wykrywania Phe-tRNA przyłączonego w wyniku reakcji krzyżowej stosowano immunomikroskopię elektronową powinowactwa. Istotą metody jest przyłączenie przeciwciała do cząsteczki (np. do Phe-tRNA) celem uwidocznienia jej na elektronogramie. Pewne trudności interpretacyjne powoduje wydłużony kształt przeciwciała oraz występowanie kilku miejsc odpowiadzi immunologicznej w badanej cząsteczce.

W wyniku zastosowania opisanych powyżej pokrótce technik stwierdzono:

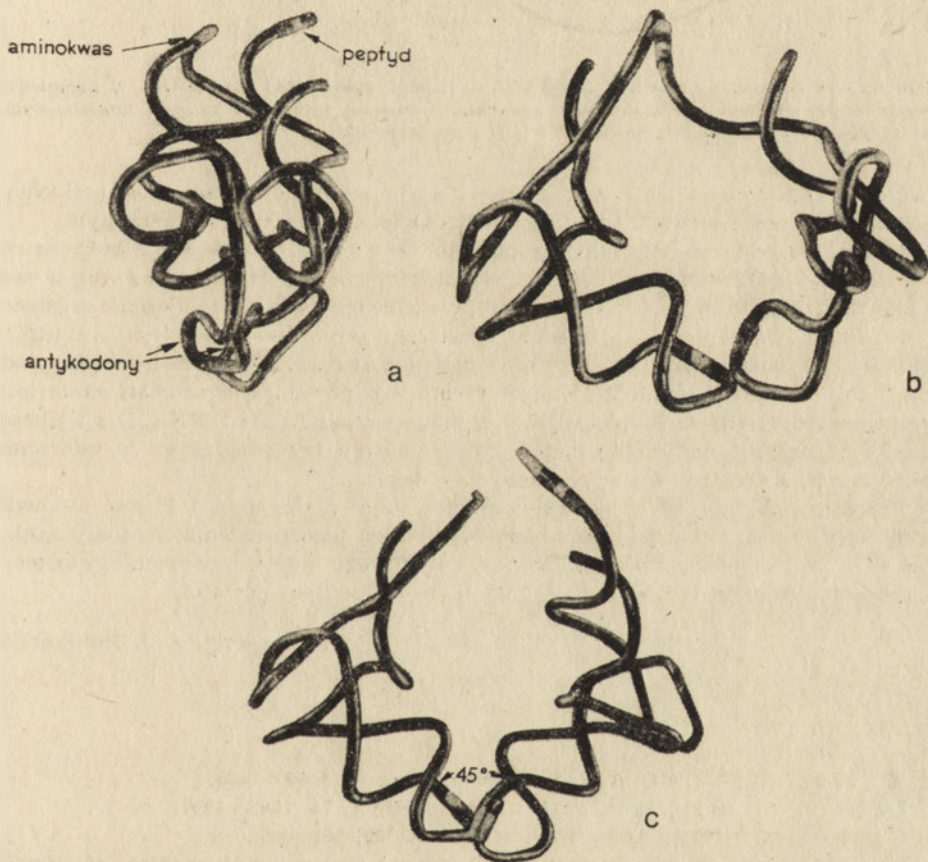
- w miejscu rybosomalnym P występują następujące białka większej podjednostki: L2, L11, L18 oraz prawdopodobnie L15 i L27;
- natomiast w miejscu A: L27, L11, L18 i L2.

Ponieważ cząsteczka AA-tRNA przyłączona do rybosomu jest odporna na trawienie rybonukleazami, należy przypuszczać, iż znajduje się ona pomiędzy obu podjednostkami rybosomalnymi. Tak więc w tworzeniu miejsc rybosomalnych A i P uczestniczą zarówno mniejsza jak i większa podjednostka rybosomalna. Na mniejszej podjednostce, w pobliżu końca aminokwasowego cząsteczki AA-tRNA zidentyfikowano białka S3, S7 i S14 (niewykluczona jest również obecność białka S18). Natomiast w pobliżu antykodonu znaleziono: S1, S3, S4, S5, S12, S18 i S21.

Problemem równie skomplikowanym jak lokalizacja białek jest ustalenie, które kwasy rybonukleinowe biorą udział w tworzeniu miejsc A i P. Zasadniczą trudnością jest określenie specyficzności oddziaływań, czyli rozróżnienie wiązania utworzonego pomiędzy antykodonem tRNA a odpowiadającym mu kodonem mRNA kompleksu polisomalnego od ew. innych wiązań powstałych niespecyficznie, np. w wyniku naświetlania promieniami UV. Wymiar cząsteczki tRNA (wynoszący ok. 1/3 rybosomu) oraz jej wydłużony kształt dodatkowo utrudniają analizę danych. Stwierdzono występowanie bezpośredniego oddziaływania antykodonu z cząsteczką rybosomalnego kwasu nukleinowego 16 S RNA. Interakcja ta zachodzi z tzw. fragmentem I cząsteczki 16 S RNA, który stanowi ok. 1/3 cząsteczki licząc od końca 3' i charakteryzuje się stałą sedymentacji 8 S. Istotnym dowodem bezpośredniego sąsiedztwa pętli (ang. *loop*) cząsteczki 16 S RNA w stosunku do antykodonu peptydylo-tRNA jest zdolność tworzenia pierścienia cyklobutanowego w wyniku naświetlania światłem

UV. Pierścień cyklobutanu powstaje pomiędzy wysuniętą zasadą pirymidynową pętli 16 S RNA a zewnętrzną zasadą antykodonu w stosunku do końca 5'. Interakcję tę uwidoczniło na rycinie 2b. W procesie oddziaływania kodon—antykonon nie stwierdzono (poza omówionym) uczestnictwa innego kwasu nukleinowego. Fragment I kwasu 16 S RNA jest zasocjowany z białkami mniejszej podjednostki: S4 oraz prawdopodobnie S13 i S17.

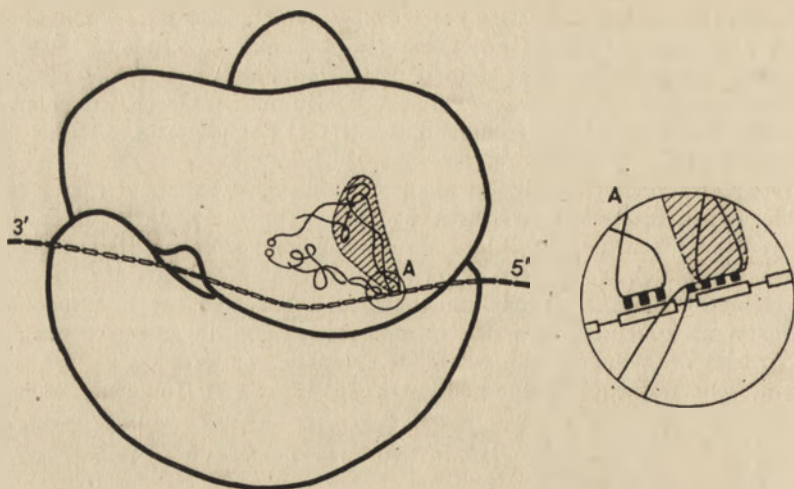
Interesującym zagadnieniem jest analiza możliwych wzajemnych położań względem siebie dwóch cząsteczek AA-tRNA wewnątrz rybosomu. James Ofengand rozpatruje trzy takie konfiguracje, które zostały schematycznie przedstawione na modelach (rys. 1 a, b i c). We wszystkich przypadkach są spełnione warunki wymienione we wstępie do niniejszego artykułu (bezpośrednie sąsiedztwo antykodonów oraz aminokwasów na końcu 3'). Jednakże na podstawie przeprowadzonych eksperymentów najbardziej prawdopodobna wydaje się sytuacja, w której dwie cząsteczki AA-tRNA są ułożone względem siebie pod kątem 45° (Ryc. 1 c). Takie położenie zostało



**Ryc. 1.** Schematyczne przedstawienie na modelach możliwych położań dwóch cząsteczek AA-tRNA (lub AA-tRNA i peptydylo-tRNA) spełniających warunek bezpośredniego sąsiedztwa antykodonów oraz końców —CCA cząsteczek transferowych RNA.

a. płaskie ułożenie dwóch molekuł AA-tRNA, b. cząsteczki AA-tRNA w pełni równolegle względem siebie, c. cząsteczki AA-tRNA pod kątem 45°.





Ryc. 2.

a. Lokalizacja cząsteczek AA-tRNA (lub AA-tRNA i peptydylo-tRNA) oraz mRNA w kompleksie rybosomalnym (miejsce P zostało zacieniowane), b. schemat interakcji kwasów nukleinowych: mRNA, AA-tRNA (lub peptydylo-tRNA) i 16 S RNA w miejscu P.

również przedstawione na rys. 2 a ilustrującym lokalizację cząsteczek aminoacylo-tRNA (lub też AA-tRNA i peptydylo-tRNA) w kompleksie rybosomalnym.

Rysunek 2 został opracowany wg prac J. Ofenganda (8—11). Struktura rybosomu przy konstrukcji tego modelu została przyjęta wg Boublika (6), a cząsteczka tRNA wg Kim'a (7). Na rysunku przedstawiono wzajemne ułożenie cząsteczki AA-tRNA w miejscu A względem cząsteczki peptydylo-tRNA (lub AA-tRNA) w miejscu P (obszar zacieniowany) oraz przebieg cząsteczki mRNA pomiędzy podjednostkami rybosomalnymi. Natomiast rycina 2 b przedstawia oddziaływanie cząsteczki peptydylo-tRNA (lub AA-tRNA) w miejscu P z pętlą 16 S RNA. Dla większej jasności obrazu nie naniesiono białek rybosomalnych uczestniczących w tworzeniu miejsc A i P, a szczegółowo wymienionych w tekście.

Przedstawiony model strukturalny miejsc rybosomalnych A i P jest w chwili obecnej jednym z najbardziej kompleksowych ujęć tego problemu. Autorzy zakładają, że w procesie elongacji łańcucha polipeptydowego uczestniczy również cząsteczka rybosomalnego 16 S RNA, co jest istotnym elementem nowości.

T. Twardowski, J. Pulikowska

## PIŚMIENICTWO

1. Watson J. P., (1964), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 1399—1425.
2. Lake J. A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1903—1907.
3. Cashel M., (1975), *Annu. Rev. Microbiol.*, **29**, 301—318.
4. Stöffler G., Wittman H. G., (1977), w *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis* (red. Weissbach H., Pestka S.), Acad. Press, str. 117—202.
5. Lake J. A., (1976), *J. Mol. Biol.*, **105**, 131—159.
6. Boublik M., Hellman W., Kleinschmidt A. K., (1977), *Cytobiologie*, **14**, 293—300.
7. Kim S.-H., (1978), w *Transfer RNA* (red. Altman S.), M. I. T. Press, Cambridge, str. 248—293.

8. Ofengand J., Lion R., Kohut J. III, Schwartz I., Zimmerman R. A., (1979), *Biochemistry*, 18, w druku.
9. Zimmerman R. A., Gates S. M., Schwartz I., Ofengand J., (1979), *Biochemistry*, 18, w druku.
10. Ofengand J., Lin F.-L., Hsu L., Keren-Zur M., Boublik M.; (1979), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (w druku).
11. Keren-Zur M., Boublik M., Ofengand J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1054—1058.



## KOMUNIKATY

### **W sprawie nazewnictwa biochemicznego**

Polskie Słownictwo Biochemiczne — nowe rozszerzone wydanie w serii Monografie Biochemiczne ukaże się w 1981 roku. Wstępne zamówienia należy pilnie kierować na adres Zarządu Głównego PTBioch, ul. Freta 16, 00-227 Warszawa. Otrzymane zamówienia dadzą podstawę do ustalenia wielkości nakładu.

\* \* \*

Komisja Słownictwa PTBioch. działa stale w trybie korespondencyjnym. Wszelkie wątpliwości terminologiczne oraz nowe hasła można i należy kierować na adres koordynatora prac Komisji:

Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska-Korczak  
Instytut Biochemii i Biofizyki, ul. Chałubińskiego 10  
50-368 Wrocław

## SPRAWOZDANIA

### Międzynarodowa Konferencja nt. *Biological Implications of Protein-Nucleic Acids interactions*, Dymaczewo k/Poznań, 19—23.V.1980

Od kilkunastu lat intensywnie rozwijają się w Poznaniu badania nad kwasami nukleinowymi i biosyntezą białka. Zagadnienia te znajdują odzwierciedlenia w organizowanych przez środowisko poznańskie konferencjach międzynarodowych, które objęły swą tematyką szeroki wachlarz problemów (przykładowo: chemię kwasów nukleinowych, a w szczególności transferowych RNA i ich komponentów, translację naturalnych i syntetycznych mRNA, a ostatnio również biologię molekularną i inżynierię genetyczną) (1). Do serii tego typu sympozjów należy również konferencja nt.: „Biologiczne implikacje oddziaływań białko—kwas nukleinowy”, której sponсорami były: Komisja Genetyki i Biologii Molekularnej Oddziału Poznańskiego PAN, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, oraz Zakład Stereochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Organicznej PAN. Przygotowaniem konferencji i jej bezpośrednim zorganizowaniem zajął się tym razem zespół biochemików z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza pod kierunkiem prof. J. Augustyniaka.

W sympozjum uczestniczyło ok. 100 polskich naukowców i ok. 70 z Europy i Ameryki Północnej. Wygłoszonych zostało ok. 60 referatów plenarnych, przedstawiono 80 komunikatów naukowych (w formie plakatowej) oraz odbyły się dwie dyskusje plenarne.

Obszerną problematykę zjazdu możemy podzielić na cztery zasadnicze tematy:

- 1) struktura rybosomów,
- 2) ekspresja genu,
- 3) mechanizm procesu translacji,
- 4) interakcje kwasów nukleinowych z peptydami i białkami.

Wiele spośród analizowanych zagadnień wywoływało bardzo ożywioną dyskusję. Niewątpliwie jednym z takich problemów była struktura rybosomu. Profesor A. Spirin (Akademia Nauk, ZSRR) przedstawił interesującą koncepcję modelu struktury mniejszej podjednostki rybosomu prokariotycznego, której podstawowym założeniem jest globularność białek rybosomalnych. Budowa rybosomu (w szczególności bakteryjnego) była również dyskutowana przez prof. H. Wittmanna (Instytut Maxa-Plancka, Berlin Zachodni), który przedstawił ogólne uwagi dotyczące metod badawczych stosowanych w tej problematyce. Profesor H. Wittmann poprowadził również dyskusję nt. ewolucji aparatu translacyjnego na przykładzie zróżnicowania rybosomów eukariotycznych i prokariotycznych. Zagadnieniem szeroko dyskutowanym była także budowa rybosomów i tRNA z organelli komórkowych. Struktura transferowych RNA z mitochondriów i chloroplastów oraz organizacja genomu organellowego została szczegółowo przedstawiona przez wielu znakomitych specjalistów (J. H. Weil, B. Parthier, H. Kössel i in.).

Model miejsc funkcjonalnych bakteryjnego czynnika elongacyjnego EFTu na podstawie eksperymentów z zastosowaniem specyficznych inhibitorów oraz techniki znakowania na zasadzie powinowactwa przedstawił dr J. Jonak (Czechosłowacka Akademia Nauk, Praga). Natomiast dr B. F. C. Clark (Uniwersytet Aarhus, Dania) zaprezentował strukturę I-rzędową oraz trójwymiarowy model czynnika EFTu



z *E. coli* na podstawie analizy rentgenograficznej. Dyskutowany był schemat oddziaływań cząsteczki EFTu z tRNA oraz GTP i GDP. Godnym zuważenia jest fakt dużej zgodności wyników otrzymanych zasadniczo odmiennymi technikami badawczymi.

Profesor W. Szybalski (Uniwersytet Wisconsin, USA) (który niedawno otrzymał godność doktora honoris causa Uniwersytetu im. M. Skłodowskiej-Curie) oraz inni prelegenci przedstawili i analizowali szczegółowo oddziaływania białko—kwas deoksyrybonukleinowy w procesie transkrypcji.

Polscy naukowcy przedstawili trzy referaty plenarne (prof. P. Szafranski, M. Wiewiórowski oraz K. L. Wierzchowski) jak również blisko połowę doniesień plakatowych.

Odbyta konferencja była dobrym forum wymiany poglądów i dyskusji; przedstawione zostały nowe problemy, koncepcje, niejednokrotnie kontrowersyjne i nie przez wszystkich akceptowane. Jednocześnie należy podkreślić duże znaczenie szkoleniowe sympozjum dla wszystkich uczestników, a w szczególności dla licznej grupy młodych naukowców. Sprawna organizacja obrad w ośrodku wczasowo-wypoczynkowym w pobliżu Poznania sprzyjała twórczej atmosferze. Uczestnicy konferencji wyjeżdżając z Dymaczewa zapytywali o termin następnego zjazdu.

(1) Poprzednie konferencje:

- 1974 r. — Kiekrz k. Poznań — „Synteza oligonukleotydów i chemia rzadkich zasad tRNA”, przewodniczący komitetu organizacyjnego: prof. M. Wiewiórowski,  
 1976 r. — Dymczewo k. Poznań — „Synteza, struktura i chemia tRNA i jego komponentów”, przewodniczący komitetu organizacyjnego: prof. M. Wiewiórowski,  
 1977 r. — Błażejewko k. Poznań — „Translacja naturalnych i syntetycznych polinukleotydów”, przewodniczący komitetu organizacyjnego: prof. A. B. Le-gocki.

T. Twardowski

### Konferencja nt. „Aktualne Problemy Biofizyki i Biologiczne Funkcje Melanin” Parma, 3—4 marzec, 1980.

W ciągu ostatnich kilku lat wzrosło zainteresowanie chemicznymi i fizycznymi własnościami naturalnych i syntetycznych melanin. Konferencja „Aktualne Problemy Biofizyki i Biologiczne Funkcje Melanin” była zorganizowana przez Instytut Fizyki Uniwersytetu w Parmie (dr Pier Raimondo Crippa) oraz Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu w Neapolu (dr Guiseppe Prota) we współpracy z Kliniką Dermatologiczną Uniwersytetu w Parmie (dr Pulvie Allegra). W konferencji wzięło udział około 50 osób z 13 krajów. Można więc sądzić, że wzięli udział przedstawiciele prawie wszystkich ośrodków naukowych, prowadzących badania nad melaninami.

Program naukowy zawierał wykłady zaproszonych wykładowców z wybranych zagadnień oraz dyskusje panelowe. Konferencję podzielono na cztery następujące sesje (półdniowe):

Aktualne poglądy na strukturę, biosyntezę i chemiczne własności naturalnych i syntetycznych melanin.

Wolne rodniki i własności przenoszenia elektronu melanin.

Niezwykłe własności fizyczne melanin i ich możliwa rola fizjologiczna.

Własności i biologiczne znaczenie poza skórnych melanin.

Jak widać z powyższego, tematyka konferencji obejmowała zagadnienia interdys-

cyplinarne chemii, biofizyki i biologii molekularnej melanin. W pierwszej sesji zwrócono szczególną uwagę na analogie i różnice pomiędzy naturalnymi i syntetycznymi melaninami, a także na melaniny zawierające siarkę (np. produkty utleniania 5-S-cysteina 1-dopa). Pomiary masy cząsteczkowej biopolimerów tej klasy są niekompletne i często kontrowersyjne. W ramach sesji wygłoszono następujące wykłady: „Biochemiczne i chemiczne aspekty pigmentacji melanin”, H. Rorsman (Szwecja), „Ostatnie osiągnięcia chemii melanogenezy” G. Prota (Włochy) oraz „Analogie i różnice pomiędzy naturalnymi i syntetycznymi melaninami” H. Wyler (Szwajcaria).

W następnej sesji szczególnie interesujące były wykłady: „Wykorzystanie wolnorodnikowych własności melanin do identyfikacji oraz charakterystyki melanin w złożonych układach biologicznych” H. M. Swartza (USA) oraz „Właściwości melanin przenoszenia elektronów” I. A. Manon i inni (Kanada).

Trzecią sesję poświęcono niezwykłym własnościom fizycznym melanin. Melaniny absorbują bardzo efektywnie promieniowanie podczerwone, widzialne i UV, wykazują przewodnictwo oraz fotoprzewodnictwo elektryczne. Polimery te charakteryzuje trwały paramagnetyzm, który może być dodatkowo wzmagany przez światło. Melaniny uczestniczą w reakcjach utleniania i redukcji, działając jako przenośnik elektronów. Wygłoszono wykłady: „Fizyczne własności melanin: wiedza i perspektywy” J. E. Mc Ginness (USA), „Zależne od hydratacji właściwości fizyczne melanin” M. Bridelli, R. Capelletti, P. R. Crippa (Włochy), „Widmo ultradźwięków i półprzewodnictwo amorficznej dwuetyloaminowej melaniny” R. Kono (Japonia), „Struktura i własności aktywnych centrów melanin” T. Sarna (Polska) oraz „Chemiluminescencja i tlen singletowy w foto- i samoutlenianiu melanin” D. Sławińska, J. Sławiński (Polska). Ponadto w ramach trzeciej sesji podczas dyskusji panelowej przedstawiono pracę „Antyutleniająca aktywność melanin badana metodami elektro- i fotochemiluminescencji” J. Sławiński, D. Sławińska, L. Cieśla (Polska). Podkreślano, że zawartość wody hydratowanej wpływa silnie na własności melanin w stanie stałym (np. absorpcję i dyspersję fali dźwiękowej, przewodnictwo elektryczne i fotoprzewodnictwo). Przedyskutowano udział cząsteczek elektronowo-wzbudzonych w procesach utleniania melanin oraz ewentualne biologiczne konsekwencje tego faktu.

Ostatnia sesja poświęcona była własnościom i biologicznemu znaczeniu skórnych i poza skórnych melanin. Zwrócono uwagę na istotne dla medycyny i farmakologii nowo poznane właściwości melanin, jak zdolność nagromadzenia niektórych leków i innych związków chemicznych w melaninach i potrzebę uwzględnienia tego zjawiska w toksykologii. Uszkodzenie wzroku i słuchu, jako skutek przedłużonej terapii niektórymi lekami wydaje się być wyjaśnione powyższymi własnościami melanin. Podczas powyższej sesji wygłoszono następujące referaty: „Spektroskopowa charakterystyka i oznaczanie melanin pochodzenia syntetycznego i naturalnego” K. C. Das (USA), „Fizjologiczna rola zewnętrzno-skrónych melanin” P. H. Proctor, I. Hilton, I. E. McGinness (USA), „Akumulacja leków i innych związków chemicznych w melaninach” B. Larsson (Szwecja), „Melaniny i słuch” L. Littkens (Szwecja).

Uczestnicy konferencji, ograniczeni do osób bezpośrednio pracujących w temacie melanin mieli okazję do bezpośredniej wymiany poglądów i zaprzyjaźnienia się na wieczornych spotkaniach towarzyskich. Dodatkowym walorem wzorowo zorganizowanej imprezy była jej lokalizacja w pobliżu najpiękniejszych zabytków architektonicznych Parmy.

*D. Sławińska*



## KOMUNIKAT

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na zebraniu w dniu 9 października 1980 r., powołał „komórkę interwencyjną”. Jej zadaniem jest pomaganie członkom Towarzystwa m.in. w sprawach:

1. trudności w kontaktach z jednostkami zaopatrującymi w aparaturę i materiały;
2. poszukiwania trudno dostępnych odczynników;
3. trudności w uzyskiwaniu delegacji na szkolenia, sympozja i zjazdy.

Zgłoszenia i dalsze propozycje można przysyłać na adres: Doc. dr hab. Zygmunt Machoy, Zakład Chemii Fizjologicznej PAM, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin, telefon centrali 822-421 i 822-431 wew. 365 lub 174.

## RECENZJE

### **Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a Symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, 19—22 September 1977.**

**Red. E. J. Hewitt and C. V. Cutting**

**Academic Press, 1979, London, New York and San Francisco, str. 708.**

Recenzowana książka ujmuje szeroko problem asymilacji azotu przez rośliny oraz skutki jej dla świata ożywionego jako całości. Zawiera ona materiały z sympozjum, które odbyło się w stacji rolniczej Long Ashton w październiku 1977 r. W sympozjum uczestniczyło ok. 140 osób, w tym 34 specjalistów spoza Anglii. Wygłoszono 25 referatów 20—40 minutowych, przygotowanych na zaproszenie organizatorów; doniesienia „wolne” przedstawiono pod postacią demonstracji plakato- wych. W monografii te pierwsze wydrukowano *in extenso*, łącznie z dyskusją; te drugie zaś pod postacią 2—10 stronicowych komunikatów.

F. Fowden w wykładzie inauguracyjnym omówił kluczową pozycję azotu w me- tabolizmie i wzroście roślin oraz przedstawił kłopoty, jakie ludzkość sama sobie sprawi, gdyby niezbędne do żywienia plony miały wzrastać wyłącznie na poczet wzrastającej produkcji nawozów azotowych. Pomijając kłopoty energetyczne i trans- portowe (na syntezę tony nawozów azotowych zużyć należy co najmniej 2 tony ropy, przy czym koszty dystrybucji produktu wraz z rozrzuceniem na pola przekraczają koszty produkcji) wspomnieć warto o niebezpieczeństwie rzadko wspominanym a groźnym:  $N_2O$  powstający w wyniku denitryfikacji nawozów wiąże ozon; gdyby roczne zużycie nawozów azotowych ustabilizowało się na poziomie 200 Mt rocznie, to ozonowa otoczka wokół Ziemi zmniejszy się o 20% w ciągu 100 lat!

Sześciu sesjom referatowym odpowiada sześć działów w monografii. W rozdziale I „Spożytkowywanie azotu atmosferycznego” J. Chatt wykazuje, że można produ- kować  $NH_3$  w normalnej temperaturze i pod normalnym ciśnieniem drogą komplek- sowania  $N_2$  z metalami ziem rzadkich, zwłaszcza molibdenem, niklem i wanadem. Następnie omówiono genetykę, biochemię i mechanizmy regulujące aktywność nitro- genazy, łącznie z naturą asocjacji  $N_2$ -wiązących prokariotów z eukariotami. W roz- dziale II „Wykorzystanie azotu związanego” omówiono zagadnienia pobierania i utylizacji  $NO_3^-$  i  $NO_2^-$  z gleb i pożywek przez rośliny uprawne. P. J. Goodman wykazał, że istnieją duże możliwości selekcjonowania odmian, lepiej wykorzystu- jących N do produkcji białka (obecnie ok. 50% nawozów azotowych traci się).

W rozdziale III „Regulacja asymilacji azotanów” omówiono strukturę reduktazy azotanowej i reduktazy azotynowej, molekularną genetykę obu enzymów oraz me- chanizmy kontrolujące ich aktywność (8 referatów i 6 plakatów). E. J. Hewitt ze współpracownikami przedstawił atrakcyjny model reduktazy azotanowej szpinaku. D. J. Cove charakteryzuje 14 genów strukturalnych (świadomie pomijając geny re- gulacyjne), odpowiedzialnych za syntezę kompleksu reduktazy azotanowej *Aspergil- lus nidulans*.

W rozdziale IV omówiono mechanizmy włączania jonu amonowego do białek, specyfikę syntezy białek w roślinach i ich odkładania w nasionach i organach zapa-



sowych. Ważne jest stwierdzenie D. D. Daviesa, że w warunkach stresu następuje gwałtowne przyspieszenie zarówno degradacji jak i syntezy białek w roślinach wyższych. Następnie omówiono powiązania metabolizmu azotowego roślin z metabolizmem związków C (8 referatów i 4 plakaty). Zwrócono uwagę na udział fitochromu w regulacji aktywności reduktazy azotanowej (R. Wyn Jones i R. W. Sheard, oraz J. S. Knypl).

Na koniec w rozdziale „Efektywność wykorzystania azotu” przedyskutowano problemy związane z wydajnością produkcji białka przez różne modele gospodarstw rolnych (N. W. Pirie), związek asymilacji azotu z plonami (R. H. Hageman), konsekwencje nieasymilowania azotu przez rośliny (O. C. Heal) oraz konsekwencje gromadzenia azotanów w roślinach (C. L. Walters i R. Walker). N. W. Pirie wykazuje, że nauka oferuje realne sposoby rozwiązania problemów żywienia, ich realizacja w dużej mierze zależy od zmiany polityki wobec rolnictwa oraz przełamania gustów konsumpcyjnych i zerwania z tradycyjnymi, marnotrawnymi sposobami gospodarowania. W ostatnim referacie omówiono problem toksyczności nitrozamin dla organizmów zwierzęcych, łącznie z metodami zapobiegania ich syntezie i toksykologicznej kontroli produktów żywnościowych.

Całość uzupełniła indeks nazwisk, wykaz uczestników sympozjum oraz wyczerpiący indeks rzeczowy. Academic Press wydał książkę na najwyższym poziomie jakościowym i użytkowym, z troską o każdy szczegół. Samo sympozjum zaś — czego nie ma w monografii — było wyśmienicie zorganizowane; odbyło się wiele spontanicznych i nie protokołowanych dyskusji okrągłego stołu, przeciągających się do późnych godzin nocnych. Kto wie, czy te właśnie dyskusje nie będą miały największego znaczenia dla kierunków dalszych badań w omawianej dziedzinie. Wiązanie azotu przez rośliny jest drugim obok fotosyntezy najważniejszym procesem, warunkującym życie na ziemi. Szkoda, iż badania podstawowe w obu dziedzinach są zaniedbane w naszym kraju.

Monografia przedstawia wiele nowego materiału faktycznego, budzi sporo refleksji szczegółowych i ogólniejszych; autorzy i dyskutanci stawiają istotne pytania, czekające odpowiedzi eksperymentalnej. Pozytywne odpowiedzi na nie oznaczać będą nie tylko poszerzenie wiedzy, lecz i możliwość uporania się z problemami żywienia. Już Leonardo da Vinci stwierdzał był bowiem: „Ci, którzy lubują się w praktyce bez wiedzy, podobni są do żeglarza, co wsiada do łodzi bez steru i busoli i nie ma nigdy pewności, dokąd płynie. Praktyka musi być zawsze zbudowana na podstawie dobrej teorii...” („Pisma wybrane” w tłum. F. Staffa; wydawn. J. Mortkowicza, Warszawa—Kraków 1913, t. 2, s. 239). Omawianą monografię można traktować jak busolę teoretyczną do budowania dobrej praktyki. Rzadko się zdarza spotkać dzieło, które by w tak zrównoważony sposób łączyło problemy teoretyczne i praktyczne, z należytym wyważeniem proporcji i szczerą troską o przyszłość.

*J. S. Knypl*

**Jerzy Kączkowski**

**Podstawy biochemii**

**Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1979, Warszawa, stron 389, cena 47 zł**

Ostatnio na polskim rynku wydawniczym ukazało się kilka podręczników biochemii, które w dużym stopniu uzupełniają braki istniejące w tym zakresie.

Jednym z tych podręczników jest recenzowana praca profesora J. Kączkowskiego zatytułowana „Podstawy biochemii”. Książka ta, jak stwierdza w przedmowie autor, przeznaczona jest dla studentów akademii rolniczych, a więc w dużym stopniu opisane zagadnienia są ukierunkowane pod kątem przydatności książki dla przyszłych inżynierów rolników. Jest to już szóste wydanie (pierwsze ukazało się w 1968 roku), a więc świadczy to o dużym zapotrzebowaniu na tego typu publikacje. W porównaniu z pierwszym wydaniem podręcznik został uzupełniony o dwa nowe rozdziały: o funkcjach komórki i o energetyce reakcji biochemicznych. Ponadto wiele rozdziałów zostało w sposób znaczny poszerzonych i uzupełnionych w nowe dane w jakie w ciągu ostatnich lat wzbogaciło się dynamicznie rozwijająca się biochemia.

Na szczególne zainteresowanie zasługują rozdziały dotyczące metabolizmu cukrowców i fotosyntezy. Rozdziały te opisują dokładnie przebieg syntezy i rozkładu cukrów prostych, dwucukrów i cukrów złożonych; opatrzone są czytelnymi schematami ułatwiającymi zrozumienie przedstawionych procesów. Na uwagę zasługuje rozdział dotyczący fotosyntezy zawierający między innymi dobry opis szlaku Hatcha i Slacka, rzadko dotąd pojawiający się w polskich podręcznikach. Ponadto autor starał się podać w sposób prosty i zrozumiały korelacje pomiędzy poszczególnymi procesami, bądź to przez krótkie podsumowania, bądź przez umieszczenie w tekście odsyłaczy do odpowiednich podrozdziałów, co powinno ułatwić studentom zrozumienie przedstawianych treści. Książka zawiera w sumie 15 rozdziałów i nie sposób wymienić tu wszystkie.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że każdy rozdział zakończony jest spisem literatury zawierającym głównie pozycje w języku polskim, a więc dostępne studentowi. Są to pozycje w wielu przypadkach pochodzące z „Postępów Biochemii”, które mogą pomóc zainteresowanym studentom w pogłębieniu wiedzy.

Książka niestety nie jest wydana na najładniejszym papierze (w przedstawionym redakcji egzemplarzu są co najmniej dwa jego gatunki), a korektorzy nie poprawili wielu błędów literowych w tekście.

W sumie książka ta jest godna polecenia studentom akademii rolniczych i studentom biochemii uniwersytetów, a szczególnie jako wstępna pozycja dla podręcznika „Biochemia roślin” tegoż autora.

M. Balińska

### **Biophysikalische Aspekte der elementaren Zellfunktionen pod redakcją J. Segala**

Tom 4, VEB Georg Thieme, 1978, Leipzig, stron 217, cena 39,-M.

W czwartym tomie o aspektach biofizycznych podstawowych funkcji komórek prof. Segal podobnie jak w poprzednich seriach podaje przykłady tych wyników badań, które w sposób istotny kształtowały pojęcia omawianych na łamach książki problemów. Przedstawienie w sposób prosty często rozbieżnych poglądów dotyczących funkcji komórek jest tym trudniejsze im bardziej poglądy te ulegały zmianie w oparciu o nowe fakty stwierdzane w badaniach, w których zastosowano bardziej dokładne metody. Podobnie jak poprzednie tomy tej serii wydawniczej książka przeznaczona jest dla osób, którym podstawy są dobrze znane. Zawiera ona bowiem opis szeregu teorii o funkcji różnych komórek przy czym niekiedy są to teorie dawne zastąpione nowymi również niedoskonałymi. Prof. Segal stara się zwrócić uwagę na fakty, których zaproponowane teorie czy hipotezy przedstawiające istotę funkcji jej



fizykochemiczne podstawy, nie tłumaczą lub wręcz są z tymi podstawami w sprzeczności. Prof. Segal przedstawia również własne poglądy nie uważając ich jednak za ostateczne. Takie ujęcie trudnych problemów biofizycznych powoduje wzrost zainteresowania w miarę czytania i pobudza do refleksji. Szczególnie wiele uwagi poświęca omówieniu pobudzenia uważając je za podstawową funkcję każdego żyjącego systemu, a następnie wiążącemu się z pobudzeniem zagadnieniu regulacji biochemicznych procesów i ich patologii. Omawia także nadal niedoskonałe teorie związane z wykorzystaniem energii procesów chemicznych na wytworzenie pracy mięśni, jak również związane z tymi procesami inne formy ruchu żywych komórek. Książka zawiera wiele ciekawie przedstawionych informacji. Jest to ostatni tom tej serii wydawniczej. Krótka charakterystyka poprzednich tomów zostało podana we wcześniejszych tomach „Postępów Biochemii”.

I. Kąkol

**Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 29 Theoretische Aspekte der Wirkstoffforschung**  
**Red. P. Oehme**

VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1978, str. 173, cena 19,50 M.

Wydawnictwo ciągle (Gesellschaft für experimentelle Medizin der DDR) Towarzystwa Medycyny Doświadczalnej NRD. Tom 29 zawiera artykuły poświęcone aktualnym informacjom, przeglądowi niektórych dziedzin o specjalnie ważnym znaczeniu dla farmakologii. Szczególnie wiele uwagi poświęcono omówieniu zależności pomiędzy strukturą leku a jego działaniem jak również przedstawiono molekularne mechanizmy działania. Centralnym zagadnieniem wydają się być aspekty stereochemiczne przy badaniu mechanizmu działania leku. Artykuły poświęcone tym problemom niezwykle dokładnie omawiają doświadczenia nad działaniem niektórych leków, transportem do miejsca działania, powiązaniem między budową związku i jego działaniem oraz innymi zagadnieniami, których znajomość jest ważna zarówno dla rozwoju farmakologicznych badań jak też dla farmakologów, którzy poszukują leków zapewniających skuteczność działania.

I. Kąkol

## KRONIKA

### Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

#### Nowi Członkowie Honorowi

Walne zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w dniu 12 września 1980 roku nadało godność Członka Honorowego

profesor dr **Stelli Niemierko**

i profesorowi dr **Tadeuszowi Korzybskiemu**.

Składamy im serdeczne gratulacje i życzenia wielu lat dalszej pracy w dziedzinie, do której wnieśli tak duży wkład.

#### Nowi Profesorowie

W IV kwartale 1980 roku tytuł profesora otrzymali następujący członkowie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

profesor zwyczajny dr hab. **Ludmiła Basalik-Chablelska**

profesor zwyczajny dr hab. **Józef Chmiel**

profesor zwyczajny dr hab. **Zdzisław Kleinrok**

profesor nadzwyczajny dr hab. **Konstancja Raczyńska-Bojanowska**

Kolegom naszym przekazujemy serdeczne gratulacje i życzenia dalszej owocnej pracy.

#### Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego

Zarząd PTBioch na walnym zebraniu w dniu 9 października 1980 r. przyznał nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików za najlepsze komunikaty na XVII Zjazd Towarzystwa. Nagrody otrzymali:

Hanna Brzeska z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

Andrzej Gamian z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda

Małgorzata Jastreboff z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

Wojciech Piotr Michalski z Instytutu Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego

Maciej J. Nałęcz z Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN im. M. Nenckiego

Jadwiga Pulikowska z Instytutu Chemii Organicznej PAN w Poznaniu

Andrzej Składanowski z Zakładu Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku

Zbigniew Szewczuk z Instytutu Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Paweł Tłomak z Instytutu Fizjologii Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Nagrodzonym gratulujemy i życzymy dalszych dobrych prac.



## Nowy Zarząd

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w X kadencji (1980-1983) ukonstytuował się w dniu 9 października 1980 r. w sposób następujący:

Prezes: prof. dr Kazimierz Zakrzewski  
Wiceprezes: doc. dr hab. Magdalena Fikus  
Sekretarz: dr Barbara Sochanowicz  
Z-ca sekretarza: dr hab. Andrzej Gardas  
Skarbnik: dr Wirginia Janiszowska  
Z-ca skarbnika: dr Piotr Chomczyński

### Członkowie Zarządu:

prof. dr Lech Wojtczak — koła specjalistyczne i sekcje  
doc. dr hab. Andrzej Leonowicz — zjazdy i sympozja  
doc. dr hab. Celina Janion — wydawnictwa  
prof. dr Janina Kwiatkowska — bibliografia  
dr Henryka Wierzbicka — sprawy członkowskie  
doc. dr hab. Zygmunt Machoy — dział interwencji  
doc. dr hab. Adam Krawczyk  
doc. dr hab. Jerzy Popinigis  
dr Bogna Skoczylas  
doc. dr hab. Ryszard Wierzbicki

### Komisja Rewizyjna:

dr Barbara Czartoryska  
prof. dr Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz  
dr Anna Mazanowska

### Sprawy Członkowskie

We wrześniu roku 1980 Polskie Towarzystwo Biochemiczne miało 12 oddziałów, liczyło 1156 członków, w tym:

w Białymstoku	39	w Olsztynie	41
w Gdańsku	49	w Poznaniu	134
w Katowicach	64	w Szczecinie	43
w Krakowie	79	w Toruniu	22
w Lublinie	68	w Warszawie	380
w Łodzi	137	we Wrocławiu	100

### Nowi Członkowie

z Wrocławia: Irena Kamrowska                      Leszek Purzyc  
                  Anna Marcinkowska                    Maciej Siewiński  
                  Halina Milnerowicz                    Wanda Tyran  
                  Elżbieta Prusak  
z Warszawy: Hanna E. Osińska  
                  Andrzej Wieraszkowski

Nowo przyjętych członków serdecznie witamy w naszym gronie i apelujemy o propagowanie naszego Towarzystwa wśród młodych biochemików i biologów.

### Informacje o dyżurach Zarządu Towarzystwa

Informujemy, że biuro Zarządu Towarzystwa pracuje w każdy wtorek od godziny 19 do 21 na ul. Freta 16 w siedzibie Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

## SPIS TREŚCI

H. Strzelecka-Gołaszewska, U. Piwowar — Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych . . . . .	517
K. Pawełczak, B. Rzeszotarska — Struktura tyreoglobuliny i jej funkcja w tarczycy . . . . .	559
T. Pacuszka, R. M. Bradley — Mechanizm działania toksyny <i>Vibrio cholerae</i> — choleragenu . . . . .	585
E. Sikora — Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach . . . . .	613
Nowe w biochemii:	
Wykorzystanie genu lacI dla określenia specyficzności mutacji (C. Janion) .	623
Model struktury miejsc rybosomalnych A i P (T. Twardowski, J. Pulikowska) .	625
Sprawozdania:	
Międzynarodowa Konferencja nt. Biological Implications of Protein-Nucleic Acids Interactions, Dymaczewo k/Poznań, 1980 (T. Twardowski) .	631
Konferencja „Aktualne problemy biofizyki i biologiczne funkcje melanin”, Parma, 1980 (D. Sławińska) . . . . .	632
Recenzje książek:	
Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a Symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, 1977 . . . . .	635
Podstawy biochemii, 1979 . . . . .	636
Biophysikalische Aspekte der elementaren Zellfunktionen . . . . .	637
Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 29. Theoretische Aspekte der Wirkstoffforschung . . . . .	638
Spis treści — Tom XXVI, 1980 . . . . .	643
Indeks autorów — Tom XXVI, 1980 . . . . .	645



# POSTĘPY BIOCHEMII

December 1980

## ARTICLES IN POLISH

Volume 26

Number 4

H. Strzelecka-Golaszewska, U. Piwowar — Polymorphism of Myosin in Muscle and Nonmuscle cells (Dept. Biochem. Nerv. System and Muscle, Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	517
K. Pawelczak, B. Rzeszotarska — Structure of Thyroglobulin and Its Function in Thyroid Gland (Inst. Chem. Pedagogical Univ., Opole) . . . . .	559
T. Pacuszka, R. M. Bradley — Mechanism of Action of Cholera Toxin (05—840 Brwinów, Kępińska Str. 80; N.I.N.C.D.S., National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.) . . . . .	585
E. Sikora — Altered Enzymes in Aging Cells and Organisms (Dept. of Cellular Biochem., Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	613
Biochemical News . . . . .	623
Meeting Reports . . . . .	631
Book reviews . . . . .	635
Contents of Volume 26, (1980) . . . . .	643
Index of Authors, Vol. 26 (1980) . . . . .	645

## SPIS TREŚCI — TOM XXVI, 1980

### ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

M. Kopeć — Białka krzepnięcia krwi „zależne od witaminy K” . . . . .	3
I. Stiasna, J. Grabowska-Hibner, B. Szukalski — Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie . . . . .	29
E. Turska — Enzymatyczna i chemiczna charakterystyka mitochondrialnej błony zewnętrznej . . . . .	47
J. Szopa, H. Jańska, W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Białka destabilizujące DNA . . . . .	63
J. Fronk — Struktura nukleosomu . . . . .	77
K. Nowak — Degradacja Edmana peptydów lub białek związanych ze stałym nośnikiem . . . . .	105
H. Wehr — Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i komórek . . . . .	139
K. Ślaska — Specyficzne wiązanie polimerazy RNA z DNA jako najwcześniejszy etap transkrypcji u <i>Prokaryota</i> . . . . .	161
J. Pulikowska, T. Twardowski — Poglądy na strukturę i funkcję czynnika elongacyjnego 1 (EFI) u <i>Eucaryota</i> . . . . .	183
Z. Grabarek, J. Kuźnicki — Homologiczne białka wiążące wapń . . . . .	209
D. Kosk-Kosicka — Receptory acetylocholino w mięśniu szkieletowym . . . . .	225
W. Ostrowski — Molekularne właściwości czynnika przeciwanemicznego — 50-lecie rozpoczęcia badań . . . . .	259
J. Kuźnicki, W. Drabikowski — Kalmodulina — aktywator procesów regulowanych przez jony wapnia . . . . .	265
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Znaczenie reszt arginylowych dla funkcji biologicznej peptydów i białek . . . . .	291
Z. Żak — Rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze i funkcji białek . . . . .	313
Z. Żak — Badania geometrii wiązań dwusiarczkowych za pomocą metod fizycznych . . . . .	329
A. Stasiak — Enzymy restrykcyjne. I. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II . . . . .	343
A. Stasiak — Enzymy restrykcyjne. II. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I i III . . . . .	369
R. Winter, D. Piskorska — Enzymy układu gliksalazy . . . . .	389
B. Rzeszotarska, I. Kozłowska — Struktura i funkcja luliberyny . . . . .	411
A. M. Konecka — Enkefaliny — aktywnie biologiczne związki ośrodkowego układu nerwowego . . . . .	443
J. J. Bujarski — Mechanizmy odporności roślin na zakażenie wirusowe . . . . .	477
H. Strzelecka-Gołaszewska, U. Piwowar — Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych . . . . .	517
K. Pawełczak, B. Rzeszotarska — Struktura tyreoglobuliny i jej funkcja w tarczycy . . . . .	559



T. Pacuszka, R. M. Bradley — Mechanizm działania toksyny <i>Vibrio cholerae</i> — choleragenu . . . . .	585
E. Sikora — Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach . . . . .	613

## NOWE W BIOCHEMII

J. S. Knypl — Biosynteza etylenu . . . . .	119
T. Twardowski, J. Pulikowska — Model rybosomu eukariotycznego . . . . .	499
C. Janion — Wykorzystanie genu <i>lacI</i> dla określenia specyficzności mutacji . . . . .	623
T. Twardowski, J. Pulikowska — Model struktury miejsc rybosomalnych A i P . . . . .	625

## RECENZJE KSIĄŻEK

J. S. Knypl — Biosynteza Mikroorganizmami Nukleaz i Proteaz. Akademia Nauk SSSR, Naucznyj sovet po problemam fiziologii i biochemii mikroorganizmow; Institut mikrobiologii: Ordena Lenina Institut biochemii im. A. N. Bacha. Red. odpowiedzialny akademik A. A. Imseneckij. Izd. Nauka, Moskwa, 1979 . . . . .	131
J. S. Knypl — Metody Molekularnej Biologii. Red. G. Ch. Macuka, I. P. Kok, A. V. El'skaja, O. M. Platonov, V. K. Kibirev. Naukowa Dumka, Kiev, 1979 . . . . .	133
J. S. Knypl — How to Write and Publish a Scientific Paper, Robert A. Day. ISI Press, Philadelphia, 1979 . . . . .	244
L. Tomaszewski — Abriss der Pathologischen Biochemie, red. R. Haschen, D. W. Scheuch. VEB G. Fischer Verlag Jena, 1978 . . . . .	245
K. Nowak — R. A. D. Williams, J. C. Elliot — Basic and Applied Dental Biochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1979 . . . . .	247
B. Szukalski — Steroid hormone receptor systems. red. Wendell W. Leavitt and James H. Clark, Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . .	248
J. Lisowski — Struktur und Synthese von Immunglobulinen und die Bedeutung von Mediatoren bei Immunreaktionen. Herausgeber: Doz. Dr. sc. med. Rolf Dargel, Dr. sc. med. Dietrich Dettmer. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1979. . . . .	250
A. Śliwowski — Homeostasis of Phosphate and other Minerals, red. S. G. Massry, E. Ritz. A. Rapado. Plenum Press, New York, London, 1978. . . . .	251
J. T. Wróbel — Isoquinoline Alkaloids Research 1972—1977. M. Shamma, J. L. Moniot, Plenum Press, New York and London, 1978 . . . . .	252
L. Tomaszewski — Ergebnisse der experimentellen Medizin, t. 32. Stand und Fortschritte der Methoden in der experimentellen Medizin, red. K. Lohmann. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1978. . . . .	509
I. Wald — The Biochemical Genetics of Man, wyd. II., red. D. J. H. Brook, O. Mayo. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1978. . . . .	510
J. S. Knypl — Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a Symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, red. E. J. Hewitt and C. V. Cutting. Academic Press, 1979, London, New York and San Francisco . . . . .	635
M. Balińska — Jerzy Kączkowski — Podstawy biochemii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1979 . . . . .	636
I. Kąkol — Biophysikalische Aspekte der elementaren Zellfunktionen, red. J. Segala, t. 4. VEB Georg Thieme, Leipzig, 1978. . . . .	637

- I. K a k o l — Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 29. Theoretische Aspekte der Wirkstoffforschung, red. P. Oehme, VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 1978 . . . . . 638

## KRONIKA

- Sprawozdanie — Co nowego w biochemii po XI Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Toronto (Kanada) (*M. Nałęcz*) . . . . . 123
- Sprawozdanie z VIII Międzynarodowego Kolokwium nt. Bioenergetyki i Mitochondriów, Smolenice k/Bratysławy, 1979 (*J. Duszyński, J. Zborowski*) . . . . . 130
- Sprawozdanie z III Krajowego Konwersatorium — Analiza Biopolimerów (*K. Nowak*) . . . . . 243
- Wspomnienie — Prof. dr Irena Mochnacka (*T. Szymczyk*) . . . . . 257
- Komunikat o powołaniu Zespołu d/s Bezpieczeństwa nad badaniami przy użyciu metod inżynierii genetycznej (*Z. Loriewicz*) . . . . . 512
- Sprawozdanie z Międzynarodowej Konferencji nt. Biological Implications of Protein-Nucleic Acids interactions, Dymaczewo k/Poznań, 1980 (*T. Twardowski*) . . . . .
- Sprawozdanie z Konferencji nt. Aktualne problemy biofizyki i biologiczne funkcje melanin, Parma, 1980 (*D. Stawińska*) . . . . .

## INDEKS AUTORÓW — TOM XXVI, 1980

### B

- Balińska M. — Jerzy Kączkowski — Podstawy biochemii. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1979 . . . . . IV
- Bradley R. M. — (patrz Pacuszka T., Bradley R. M.) . . . . . IV
- Bujarski J. J. — Mechanizmy odporności roślin na zakażenie wirusowe . . . . . III

### D

- Drabikowski W. — (patrz Kuźnicki J., Drabikowski W.) . . . . . III
- Duszyński J., Zborowski J. — Sprawozdanie z VIII Międzynarodowego Kolokwium nt. Bioenergetyki i Mitochondriów, Smolenice k/Bratysławy, 1979 . . . . . I

### F

- Farbiszewski R., Gabryel H. — Znaczenie reszt argynylowych dla funkcji biologicznej peptydów i białek . . . . . III
- Fronk J. — Struktura nukleosomu . . . . . I

### G

- Gabryel H. — (patrz Farbiszewski R., Gabryel H.) . . . . . III
- Grabarek Z., Kuźnicki J. — Homologiczne białka wiążące wapń . . . . . II
- Grabowska-Hibner J. — (patrz I. Stiasna, J. Grabowska-Hibner, B. Szukalski) . . . . . I

## J

- Janion C. — Nowe w biochemii — Wykorzystanie genu *lacI* dla określenia specyficzności mutacji . . . . . IV  
 Jańska H. — (patrz Szopa J., Jańska H., Mejbaum-Katzenellenbogen W.) . . . . . I

## K

- Kąkol I. — Recenzja książek — Biophysikalische Aspekte der elementaren Zellfunktionen, red. J. Segala, t. 4, VEB Georg Thieme, Leipzig, 1978 . . . . . IV  
 Kąkol I. — Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 29. Theoretische Aspekte der Wirkstoffforschung, red. P. Oehme, VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin, 1978 . . . . . IV  
 Knypl J. S. — Nowe w biochemii — Biosynteza etylenu . . . . . I  
 Knypl J. S. — Recenzja książki — Biosynteza Mikroorganizmami Nukleaz i Proteaz. Akademia Nauk SSSR, Naucznyj sovet po problemam fizjologii i biochemii mikroorganizmow; Institut mikrobiologii; Ordena Lenina Institut biochemii im. A. N. Bacha. Red. odpowiedzialny akademik A. A. Imse-neckij. Izd. Nauka, Moskwa, 1979 . . . . . I  
 Knypl J. S. — Recenzja książki — Metody Molekularnej Biologii. Red. G. Ch. Macuka, I. P. Kok, A. V. El'skaja, O. M. Platonov, V. K. Kibirev. Naukowa Dumka, Kiev, 1979 . . . . . I  
 Knypl J. S. — Recenzja książki — Robert A. Day. How to write and Publish a Scientific Paper. ISI Oress, Philadelphia, 1979 . . . . . II  
 Knypl J. S. — Recenzja książki — Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a Symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, red. E. J. Hewitt and C. V. Cutting. Academic Press, 1979, London, New York and San Francisco . . . . . IV  
 Konecka A. M. — Enkefalinny — aktywnie biologiczne związki ośrodkowego układu nerwowego . . . . . III  
 Kopeć M. — Białka krzepnięcia krwi „zależne od witaminy K” . . . . . I  
 Kosk-Kosicka D. — Receptory acetylocholino w mięśniu szkieletowym . . . . . II  
 Kozłowska I. — (patrz Rzeszotarska B., Kozłowska I.) . . . . . III  
 Kuźnicki J. — (patrz Grabarek Z., Kuźnicki J.) . . . . . II  
 Kuźnicki J., Drabikowski W. — Kalmodulina — aktywator procesów regulowanych przez jony wapnia . . . . . III

## L

- Lisowski J. — Recenzja książki — Struktur und Synthese von Immunglobulinen und die Bedeutung von Mediatoren bei Immunreaktionen. Herausgeber: Doz. Dr. sc. med. Rolf Dargel, Dr. sc. med. Dietrich Dettmor. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1979 . . . . . II

## M

- Mejbaum-Katzenellenbogen W. — (patrz Szopa J., Jańska H., Mejbaum-Katzenellenbogen W.) . . . . . I

## N

- Nałęcz M. J. — Sprawozdanie — Co nowego w biochemii po XI Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Toronto . . . . . I



Nowak K. — Degradacja Edmana peptydów lub białek związanych ze stałym nośnikiem . . . . .	I
Nowak K. — Sprawozdanie z III Krajowego Konwersatorium — Analiza Biopolimerów . . . . .	II
Nowak K. — Recenzja książki — R. A. D. Williams, J. C. Elliot — Basic and Applied Dental Biochemistry. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, 1979 . . . . .	II
O	
Ostrowski W. — Molekularne właściwości czynnika przeciwanemicznego — 50-lecie rozpoczęcia badań . . . . .	III
P	
Pacuszka T., Bradley R. M. — Mechanizm działania toksyny <i>Vibrio cholerae</i> — cholera genu . . . . .	IV
Pawelczak K., Rzeszotarska B. — Struktura tyreoglobliny i jej funkcja w tarczycy . . . . .	IV
Piskorska D. — (patrz Winter R., Piskorska D.) . . . . .	III
Piwowar U. — (patrz Strzelecka-Gołaszewska H., Piwowar U.) . . . . .	IV
Pulikowska J., Twardowski T. — Poglądy na strukturę i funkcję czynnika elongacyjnego I (EF1) u <i>Eucarojta</i> . . . . .	II
Pulikowska J. — (patrz Twardowski T., Pulikowska J.) . . . . .	III
Pulikowska J. — (patrz Twardowski T., Pulikowska J.) . . . . .	IV
R	
Rzeszotarska B., Kozłowska I. — Struktura i funkcja luliberyny . . . . .	III
Rzeszotarska B. — (patrz Pawelczak K., Rzeszotarska B.) . . . . .	IV
S	
Sikora E. — Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach . . . . .	IV
Sławińska D. — Sprawozdanie z Konferencji nt. Aktualne problemy biofizyki i biologiczne funkcje melanin, Parma, 1980 . . . . .	IV
Stasiak A. — Enzymy restrykcyjne. I. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II . . . . .	III
Stasiak A. — Enzymy restrykcyjne. II. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I i III . . . . .	III
Stiasna I., Grabowska-Hibner J., Szukalski B. — Metabolizm alkoholu etylowego w wątrobie . . . . .	I
Strzelecka-Gołaszewska H., Piwowar U. — Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych . . . . .	IV
Szopa J., Jańska H., Mejsbaum-Katzenellenbogen W. — Białka destabilizujące DNA . . . . .	I
Szukalski B. — (patrz Stiasna I., Grabowska-Hibner J., Szukalski B.) . . . . .	I
Szukalski B. — Recenzja książki — Steroid hormone receptor systems, red. Wendell W. Leavitt and James H. Clark, Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . .	II
Szymczyk T. — Wspomnienie — Prof. dr Irena Mochnacka . . . . .	III

- Ślaska K. — Specyficzne wiązanie polimerazy RNA z DNA jako najwcześniejszy etap transkrypcji u *Prokaryota* . . . . . II
- Śliwowski A. — Recenzja książki — *Homeostasis of Phosphate and other Minerals*, red. S. G. Massry, E. Ritz, A. Rapado. Plenum Press, New York, London, 1978 . . . . . II

## T

- Tomaszewski L. — Recenzja książki — *Abriss der Pathologischen Biochemie*, red. R. Haschen, D. W. Scheuch. VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1978 . . . . . II
- Tomaszewski L. — Recenzja książki — *Ergebnisse der experimentellen Medizin*, t. 32. Stand und Fortschritte der Methoden in der experimentellen Medizin, red. K. Lohmann. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1978 . . . . . III
- Turska E. — Enzymatyczna i chemiczna charakterystyka mitochondrialnej błony zewnętrznej . . . . . I
- Twardowski T. — (patrz Pulikowska J., Twardowski T.) . . . . . II
- Twardowski T., Pulikowska J. — Nowe w biochemii — Model rybosomu eukariotycznego . . . . . III
- Twardowski T., Pulikowska J. — Nowe w biochemii — Model struktury miejsc rybosomalnych A i P . . . . . IV
- Twardowski T. — Sprawozdanie z Międzynarodowej Konferencji nt. *Biological Implications of Protein-Nucleic Acids Interactions*, Dymaczewo k/Poznań, 1980 . . . . . IV

## W

- Wald I. — Recenzja książki — *The biochemical Genetics of Man*, wyd. II, red. D. J. H. Bröok, O. Mayo. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1978 . . . . . III
- Wehr H. — Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i komórek . . . . . II
- Winter R., Piskorska D. — Enzymy układu glioksalazy . . . . . III
- Wróbel J. T. — Recenzja książki — *Isoquinoline Alkaloids Research 1972—1977*. M. Shamma, J. L. Moniot. Plenum Press, New York and London, 1978 . . . . . II

## Z

- Zborowski J. — (patrz Duszyński J., Zborowski J.) . . . . . I

## Ż

- Żak Z. — Rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze i funkcji białek . . . . . III
- Żak Z. — Badania geometrii wiązań dwusiarczkowych za pomocą metod fizycznych . . . . . III





## ERRATA

1. Do niniejszego zeszytu dołączono poprawnie wydrukowaną stronę 2-gą z zeszytu 3-go gdzie zamiast „zeszyt 3” zostało wydrukowane „zeszyt 2”. Redakcja zwraca się z prośbą do Czytelników, aby we własnym zakresie byli uprzejmi wymienić załączoną do niniejszego zeszytu stronę na stronę z błędnym wydrukiem.
2. W artykule E. Sikory pt. „Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach” na str. 615 (ryc. 1) zostały zamienione wykres pierwszy z trzecim. Podpisy są umieszczone prawidłowo.

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

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

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

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

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

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

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) prac(y) pochodzi informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a wzory cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

## SPIS TREŚCI

H. Strzelecka-Gołaszewska, U. Piwowar—Polimorficzne formy miozyny w komórkach mięśniowych i niemięśniowych	517
K. Pawełczak, B. Rzeszotarska—Struktura tyreoglobuliny i jej funkcja w tarczycy	559
T. Pacuszka, R. M. Bradley—Mechanizm działania toksyny <i>Vibrio cholerae</i> — cholera genu	585
E. Sikora—Zmienione enzymy w starzejących się komórkach i organizmach	613
Nowe w biochemii:	
Wykorzystanie genu lacI dla określenia specyficzności mutacji (C. Janion)	623
Model struktury miejsc rybosomalnych A i P (T. Twardowski, J. Pulikowska)	625
Sprawozdania:	
Międzynarodowa Konferencja nt. Biological Implications of Protein-Nucleic Acids Interactions, Dymaczewo k/Poznań, 1980 (T. Twardowski)	631
Konferencja „Aktualne problemy biofizyki i biologiczne funkcje melanin”, Parma, 1980 (D. Sławińska)	632
Recenzje książek:	
Nitrogen Assimilation of Plants. Proceedings of a Symposium held at Long Ashton Research Station, University of Bristol, 1977	635
Podstawy biochemii, 1979	636
Biophysikalische Aspekte der elementaren Zellfunktionen	637
Ergebnisse der experimentellen Medizin, Band 29. Theoretische Aspekte der Wirkstoffforschung	638
Spis treści — Tom XXVI, 1980	643
Indeks autorów — Tom XXVI, 1980	645