

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

POSTBAH 27 (3-4)  
(261-380 (1981))

1981

tom 27 nr 3-4

PL ISSN 0032-5422



*Pw*

<http://rcin.org.pl>

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE



POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1981 TOM 27 ZESZYT 3-4

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 27(3-4)  
(261-380) (1981)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Chorąży (Gliwice), E. Czuryło (Warszawa), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), E. Gąsior (Lublin), J. Gregorczyk (Szczecin), M. Gumińska (Kraków), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczak (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), L. Wojtczak (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

A. Wieraszko

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

Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1981

Nakład 2370

Ark. wyd. 10,0; ark. druk. 7,5

Pap. ilustr. b. sat. kl. V 80 g. 70×100

Zam. 1055/12/81

Oddano do składania 23.XI.1981 r.

Podpisano do druku w listopadzie 1982 r.

Druk ukończono w listopadzie 1982 r.

Cena zł 40,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



## NOWE W BIOCHEMII

### Geny eukariontów i wirusy onkogenne — struktura i transkrypcja \*

Struktura genów komórek eukariotycznych, transkrypcja i przetwarzanie prekursorowego mRNA oraz struktura wirusów onkogennych typu DNA i RNA były wiodącym tematem czwartej konferencji naukowej „Arolla Workshop”.

Sesję poświęconą strukturze DNA, chromatyny i chromosomów otworzył referat F. Cricka (Cambridge) na temat tzw. sekwencji pasożytniczych DNA (egoistyczny DNA ang. *selfish DNA*). Sekwencje te pojawiają się i rozsiewają w genomie organizmów wielu gatunków, gdzie pozostają jako sekwencje milczące, genetycznie nieczynne lub też ingerują w funkcję genomu stanowiąc dodatkowe sygnały kontrolujące ekspresję genów, mutacje itd. Warunkiem rozprzestrzeniania się sekwencji pasożytniczej jest uzyskanie przez nią specyficznej sekwencji nukleotyduowej a także znalezienia odpowiedniego „środowiska” jakim jest DNA komórkowy. K. Scherrer (Paryż) przedstawił elektronogramy DNA erytrocytów kaczki poddanego kontrolowanej denaturacji chemicznej. W cząsteczkach DNA znaleziono regiony bogate w AT o charakterystycznej budowie: rozrzucone one są jako regiony („łączniki”) o długości ok. 800 par zasad (pz) i występują w grupach 4-6 dzieląc sekwencje DNA na odcinki ok. 2500 pz. Grupy „łączników” bogatych w AT oddalone są od siebie o ok. 10-100 kpz (kilo pz). Organizację chromosomu metafazowego, a w szczególności budowę szkieletu (*scaffold*) chromosomu komórek HeLa przedstawił U. K. Laemli (Genewa). Po usunięciu histonów i większości białek niehistonowych z izolowanych chromosomów metafazowych pozostaje resztkowa struktura wykazująca w mikroskopie elektronowym szkielet nukleoproteidowy, z którego wychodzą niezliczone pętle DNA o długości 5-100 kpz. W skład niehistonowych białek resztkowych wchodzi 5-6 głównych komponentów oraz ok. 25 mniejszych. Podobną budowę wykazuje interfazowy chromosom myszy (R. Hancock, Lozanna).

A. Mirzabekov (Moskwa) prezentował własny model budowy nukleosomu.

Kilka wykładów poświęcono macierzy jądrowej. A. O. Pogo (Nowy Jork) sądzi, że macierz jądrowa determinuje domeny chromatyny aktywnej i nieaktywnej oraz pozycję tych domen w jądrze i bierze udział w formowaniu chromosomów w okresie profazy. Nowsze badania wskazują, że hnRNA jest silnie związany z macierzą, sądzi się więc, że macierz bierze udział w procesie przetwarzania pre-mRNA (*splicing*) i transporcie mRNA do cytoplazmy (Pogo; W. J. van Venrooij, Nijmegen). Macierz jądrowa jest wzbogacona w replikujący DNA i aktywne transkrypcyjnie domeny chromatyny (R. Berezney, Buffalo).

W krótkim sprawozdaniu nie sposób omówić bliżej kilku dużych sesji poświęconych strukturze genów i regulacji transkrypcji. Przedstawiono szereg nowych analiz struktury pierwszorzędowej genów i otaczających je sekwencji. W odległości około 30 pz od punktu inicjacji transkrypcji (miejsce CAP) u wielu genów transkrybowanych przez RNA-polimerazę II znaleziono sekwencję TATAA lub sekwencje pochodne od niej (zwaną „*TATA-box*”, sekwencją Hognesa lub sekwencją Goldber-

\* Jest to omówienie problematyki konferencji naukowej „Arolla Workshop”, która odbyła się w dniach 18-22 sierpnia 1980 r. w Arolla, Szwajcaria.

ga), którą wielu badaczy uważa za niezbędną dla inicjacji transkrypcji. Istotnie w warunkach transkrypcji w układach bezkomórkowych wycięcie regionu zajmowanego przez sekwencje TATA lub indukowanie mutacji w tym rejonie prowadzi do znacznego zahamowania transkrypcji. Zależność taką wykazali R. A. Flavell (Londyn) i P. Dierks (Zurich) na modelu genu  $\beta$ -globiny, a M. J. Tsai (Houston) dokonał analogicznego spostrzeżenia w odniesieniu do genu owoalbuminy kurczęcia. Regulatorowy region o podstawowej budowie CCAAT położony jeszcze dalej „w lewo” od punktu CAP (ok. 80 pz) jest najpewniej niezbędny w transkrypcji *in vivo*, jednakże jego usunięcie nie wpływało w widoczny sposób na transkrypcję izolowanego genu.

Znaczenie sekwencji poprzedzających początek genu w procesie regulacji transkrypcji ilustrowano wynikami badań nad zwiększoną wrażliwością na działanie nukleaz regionów przyległych do końca 5' genu. S. Elgin z Uniwersytetu Harvard stwierdziła taką zwiększoną wrażliwość na DNAazę I końca 5' genu białka szoku termicznego w locus 67B u *Drosophila melanogaster*. U tego gatunku A. Worcel (Princeton) spostrzegł podwyższoną wrażliwość na DNAazę I i nukleazę mikrokokalną końca 5' genów histonowych. Na podstawie badań wrażliwości regionu 5' genów 5S Worcel sądzi, że nadwrażliwość regionu regulatorowego jest związana z odpowiednim ułożeniem w fazie nukleosomów, których pozycja warunkuje związanie czynnika niezbędnego dla rozpoczęcia transkrypcji. Spostrzeżenie Y. Aloni (Rehovot), że region późnego promotera w minichromosomie wirusa SV40 wykazuje nadwrażliwość na DNAazę i jednocześnie pozbawiony jest struktury nukleosomalnej, także wskazuje, że stan organizacji nukleosomów może mieć istotne znaczenie dla ekspresji genu.

Geny transkrybowane RNA polimerazą I i III posiadają również regiony niezbędne dla rozpoczęcia transkrypcji ale lokalizacja ich jest odmienna. Przycinanie (*truncation*) od końca 5' segmentu restrykcyjnego zawierającego gen tRNA<sup>Met</sup> nie powodowało żadnych zaburzeń transkrypcji aż do osiągnięcia 13 pz od końca 5' genu. Naruszenie tej sekwencji znosiło transkrypcję genu (H. Hofstetter, Zurich). Analogiczna sekwencja niezbędna dla zachowania transkrypcji znajduje się u końca genu tRNA<sup>Met</sup>.

Doskonały wykład D. Flavella (Londyn) podsumował najnowsze dane o budowie genów globinowych oraz strukturze i procesie przetwarzania cząsteczek prekursorowych mRNA globiny począwszy od pierwszego transkryptu o wielkości 15S poprzez formy pośrednie. Przedstawiono liczne dane uzupełniające niepełny jeszcze obraz mechanizmu wycinania sekwencji intronowych i spajania wiązaniem kowalencyjnym końców sąsiadujących eksonów. Analizowano strukturę genów globinowych u ludzi z wrodzoną hemoglobinopatią. Ustalono, że zespół genów globinowych ulega rozległym uszkodzeniom, najczęściej typu delecji; w wielu przypadkach hemoglobino-patii obszar delecji został precyzyjnie określony.

Strukturę genu aktywny omawiali I. Sures (Genewa) i R. Firtel (La Jolla) a organizację genów histonowych M. Birnsteil (Zurich). Gen histonu H2A jeżowca wykazuje sekwencję TATAAATA, która w stosunku do polimerazy II determinuje pozycję końca 5'. Wydaje się, że sekwencja ta odpowiada zatem funkcji selektora transkrypcji. Dalej w lewo od sekwencji selektora znajduje się w obrębie przerywnika sekwencja modulatorowa określająca szybkość transkrypcji.

M. Jacob (Strasburg) przedstawiła analizę sekwencji na granicy intron-ekson wskazując na homologię sekwencji przygranicznych wielu pre-mRNA. Sekwencje te wykazują komplementarność do 16 nukleotydowej sekwencji drobnocząsteczkowego RNA (U1). Zdaniem niektórych autorów cząsteczka U1 może służyć jako element stabilizujący miejsca cięć i spojeń na granicy intron-ekson. Interesujące, że w hnRNA znaleziono znaczną ilość (40%) drobnocząsteczkowego RNA głównie frakcji U2, U1,



U3 i Ux (M. Jacob, T. Pederson, Worcester Foundation, Sirewsbury). H. Naora (Canberra) zaproponował model przetwarzania pre-mRNA, w którym elementem stabilizującym region cięcia i spajania na granicy ekson-intron-ekson są dwupas-mowe struktury wytwarzane w obrębie tej samej cząsteczki hnRNA.

Zupełnie nową koncepcję mechanizmu przetwarzania pre-mRNA cytochromu b w mitochondrialnym DNA drożdży zaproponował P. Słonimski (Gif sur Yvette). Grupa Słonimskiego stwierdziła, że niektóre sekwencje intronowe genu cytochromu b kodują białko („maturazę”) niezbędne dla usuwania intronów i spajania eksonów w pre-mRNA cytochromu b. Maturaza jest białkiem współdziałającym z innymi składnikami mechanizmu „*splicing*”. Niektóre mutanty w obrębie intronów uniemożliwiają pełną transkrypcję informacji dla maturazy są niezbędne do przetwarzania pre-mRNA, który gromadzi się w zwiększonych ilościach.

Sesję poświęconą organizacji ekspresji genów immunoglobuliny (Ig) otworzył świetny referat R. Perry'ego (Filadelfia). W obszernym wstępie referent podał podstawy biologii rozwoju komórek wytwarzających immunoglobuliny, omówił przydatność modelowych szpiczaków myszy dla badań nad strukturą genów Ig i naturą różnorodności przeciwciał. Na przykładzie analizy genów lekkiego łańcucha  $\lambda$  i  $\kappa$  wiadomo, że geny kodujące region zmienny (V lub wg obecnie proponowanej nomenklatury region CDR-*Complementarity Determining Region*) występują w liczbie kilkuset (ok. 300), natomiast gen regionu stałego (C) jest pojedynczy. Formowanie ostatecznej struktury genu po zadziałaniu antygeny następuje w trakcie różnicowania się limfocyty typu B i polega na przegrupowaniu i przybliżeniu jednego z genów V do jednego z pięciu segmentów J położonych w odległości ponad 1000 pz (sekwencja IVS) od początku genu C. Tak uformowany gen ulega transkrypcji a pre-mRNA przetworzeniu (wycięcie sekwencji IVS) w końcową cząsteczkę mRNA, w której region V/J przechodzi bezpośrednio w region C. Różnorodność przeciwciał warunkują mnogość genów V, możliwość doboru segmentu J i zmienność w rejonie spojenia V-J, a także mutacje w hiperzmiennych regionach genu V.

Molekularne podłoże zjawiska „przełączania” klas genów łańcucha H przeciwciał było przedmiotem dalszej części wykładu Perry'ego jak również oddzielnych referatów (T. H. Rabbitts, Cambridge; B. Mach, Genewa; U. Storb, Seattle; F. Alt, MTI-Cambridge, USA). Gen C jest położony u lewego końca zespołu genów łańcucha H i ulega ekspresji jako cząsteczka IgM, która jest pierwszym przeciwciałem syntetyzowanym w odpowiedzi na antygen. Uformowanie czynnego genu C polega — podobnie jak w przypadku genów łańcucha  $\lambda$  i  $\kappa$  — na przegrupowaniu odpowiedniego genu V-J w sąsiedztwo C. „Przełączenie” na syntezę następnych w czasie klas Ig (np. IgG) na poziomie molekularnym polega na następnej rekombinacji, w wyniku której region VJ zbliża się do odpowiedniego genu C (np. C  $\gamma_1$ ). Rekombinacja zachodzi w obrębie miejsc S, których struktura nie jest jeszcze bliżej poznana. W wyniku rekombinacji obszar DNA między genem VJ a genem danej klasy łańcucha H ulega delecji.

Interesujący proces ekspresji genów alfa-amylazy przedstawili O. Hagenbuechle, U. Schibler i wsp.<sup>a</sup> (Lozanna). mRNA alfa-amylazy ślinianki i wątroby myszy różni się niekodującym końcem 5'. Sekwencja poprzedzająca kodon AUG mRNA wątroby jest dłuższa o ok. 100 zasad od analogicznej sekwencji mRNA ślinianki. Ponadto sekwencja poprzedzająca kodon AUG w mRNA ślinianki jest transkryptem komplementarnym do regionu oddalonego w lewo o ok. 3000 zasad od regionu kodującego taką sekwencję w wątrobie. Być może odkrycie to przyczyni się do poznania różnic w funkcji genu w odmiennie wyspecjalizowanych komórkach. Odmienności narządowe w ekspresji genów amylazy i strukturę genów insuliny omawiał W. Rutter (San Francisco).

Tematyka sesji poświęconej wirusom onkogennym typu DNA obejmowała głów-

nie molekularną strukturę adenowirusa typ 2 i SV40 i koncentrowała się na charakterystyce promotorów, inicjacji transkrypcji oraz przetwarzaniu transkryptów pierwotnych. Analizę kompleksów transkrypcyjnych adenowirusa metodą mikroskopii elektronowej przedstawił O. Miller (Pasadena), a J. Blanchard (Montpelier) omówił badania nad cząsteczkami mRNA wirusa w zakażonych komórkach linii HeLa. Analizowano strukturę i funkcję wczesnych i późnych promotorów adenowirusa. Silny promotor TATAAA pasma r znajduje się w pozycji 16.3 mapy wirusa w odległości o ok. 30 nukleotydów w lewo od miejsca CAP (C. Kedinger, Strasburg; O. Hagenbuechle, Lozanna). Regulacja transkrypcji wczesnych regionów 2 i 4 podlega negatywnej kontroli. Transkrypcja tych regionów po osiągnięciu maksimum jest wyłączona przez białko wykazujące właściwość wiązania z DNA, a będące produktem wczesnego genu 2 (J. R. Nevins, Nowy Jork). Mechanizmy kontroli ekspresji genów adenowirusa 2, zależności między ekspresją wczesnych i późnych genów, proces przetwarzania pre-mRNA i funkcje regulatorowe przedstawił w postaci obszernego referatu przeglądowego L. Philipson (Uppsala).

„Późne” geny wirusa SV40 nie zawierają sekwencji typu TATA w odróżnieniu od wczesnego regionu, gdzie sekwencje typu „TATA-box” występują w regionie poprzedzającym początek genu kodującego antygen T, jednak nie należy przypisywać im znaczenia bezwzględnych sygnałów dla transkrypcji *in vivo* (R. Kamen, Londyn). Dane te potwierdzają badania laboratorium Fiersa wskazujące, że delekcje sekwencji poprzedzających późne geny SV40 (kodujące białka otoczki wirusa) nie wpływają na przebieg transkrypcji (G. Haegeman, Ghent). R. Weil (Genewa) wskazał na plejotropowe działanie antygeny T w komórkach zakażonych SV40.

Pięknym referatem o retrowirusach i odwrotnej transkryptazie D. Baltimore (Cambridge, USA) otworzył sesję poświęconą retrowirusom. RNA retrowirusów po skopiowaniu na dsDNA integruje się z genomem gospodarza dzięki strukturze sekwencji typu „directrepeat” na końcach transkryptu. Pierwszą fazą integracji jest utworzenie z dsDNA formy kolistej. Ciekawą hipotezę powstawania białaczek u ptaków pod wpływem wirusa ALV przedstawił W. S. Hayward (The Rockefeller University, Nowy Jork). Badania Haywarda oraz S. M. Astrin i B. C. Neela z Instytutu Badań nad Rakiem w Filadelfii wskazują, że indukcja białaczki może zajść poprzez insercję w genom gospodarza promotera pochodzącego z prowirusa ALV. Jest to jeden z ciekawszych kierunków badań nad rolą sekwencji niosących określone funkcje i włączanych w genom w procesie powstawania nowotworów. J. M. Verma (San Diego) analizował przykłady biogenezy retrowirusów. Wirus mięsaka myszy — *Moloney* (M-MSV) jest zdolny do włączenia we własny genom sekwencji genomu gospodarza. Te nabyte sekwencje mogą ulec ekspresji jako niezależny produkt wirusa lub jako dodatkowy fragment strukturalnych białek wirusowych.

W konferencji brało udział około 120 uczestników. Poziom konferencji był bardzo wysoki i nie mogłem oprzeć się uczuciu zażenowania jak bardzo pozostaliśmy w tyle. Organizatorzy konferencji: Robert Perry (Filadelfia), Klaus Scherrer (Paryż) i George Spohr (Genewa) oraz koledzy z Uniwersytetu Genewskiego, mogą mieć głęboką satysfakcję nie tylko z pozytywnej i stymulującej konferencji naukowej lecz także z faktu, że jej uczestnicy nigdy nie zapomną przyjaznej atmosfery jaką tam organizatorzy stworzyli. Wszyscy też zachowamy na zawsze w pamięci bajkowe scenerie z okolicy Arolla i alpejskiej wycieczki.

M. Chorąży



## Badania nad strukturą i funkcją czynnika elongacyjnego EFTu z bakterii *E.coli*

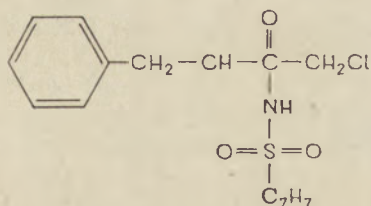
Czynnik elongacyjny EFTu z bakterii *Escherichia coli* jest białkiem składającym się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o ciężarze cząsteczkowym 43 225, w skład którego wchodzi 393 aminokwasu (1).

W procesie biosyntezy białka czynnik EFTu katalizuje wiązanie AA-tRNA do rybosomów w cyklu reakcji, których pierwszym etapem jest utworzenie kompleksu dwuskładnikowego z GTP (EFTu-GTP). Następnie, w interakcji z AA-tRNA powstaje kompleks trójskładnikowy: AA-tRNA-EFTu-GTP. W wyniku oddziaływania z właściwym kodonem mRNA na rybosomie następuje przyłączenie kompleksu trójskładnikowego do rybosomu, po czym zachodzi utworzenie wiązania peptydowego pomiędzy AA-tRNA (z kompleksu trójskładnikowego) a syntetyzowanym peptydylo-tRNA. Po hydrolizie GTP uwalniany jest z kompleksu rybosomalnego nowy kompleks dwuskładnikowy: EFTu-GDP. Dla kontynuacji procesu biosyntezy białka konieczne jest ponowne utworzenie kompleksu EFTu-GTP; uczestniczy w tej reakcji czynnik elongacyjny EFTs, który tworzy kompleks dwuskładnikowy EFTu-Ts. Czynnik elongacyjny EFTu nie występuje *in vivo* w stanie wolnym, a jedynie w formie kompleksów z GDP lub z czynnikiem Ts (EFTu-GDP lub też EFTu-Ts); oba te kompleksy dwuskładnikowe są zaangażowane również w etapach pośrednich procesu wydłużania łańcucha polipeptydowego (2, 3).

Jak wynika z powyższego schematycznego opisu czynnik Tu oddziałuje z wieloma makromolekułami aktywnymi w procesie biosyntezy białka a mianowicie: AA-tRNA, GDP, GTP, EFTs i składnikami rybosomalnymi (2,3 i literatura tam cytowana). Niezależnie od pokrótce scharakteryzowanych powyżej funkcji EFTu jest podjednostką Q $\beta$  RNA polimerazy (4); tworzy również kompleksy (być może funkcjonalne) z następującymi związkami czynnymi biologicznie: kirromycyną, aurodox i pulvomycyną (5, 6, 7).

Na szczegółową analizę procesu interakcji pomiędzy czynnikiem elongacyjnym EFTu a cząsteczką przenoszącego RNA (tRNA) pozwalają obecnie liczne dane eksperymentalne, a szczególnie:

- 1) określona struktura I-, II- i III-rzędowa tRNA; można przyjąć, iż model przenoszącego RNA jest powszechnie znany (8, 9) i aczkolwiek nie jest znana struktura trójwymiarowa cząsteczki aminoacylo-tRNA, należy jednakże przypuszczać, iż jest ona bardzo podobna;
- 2) znana sekwencja aminokwasów czynnika EFTu z bakterii *E.coli* (1), jak również opracowany na podstawie danych krystalograficznych model trójwymiarowy kompleksu EFTu-GDP (10-12);
- 3) czuła i wysoce specyficzna metoda detekcji oddziaływań pomiędzy czynnikiem elongacyjnym a jego ligandami (przede wszystkim AA-tRNA) oparta na kompetycji z L-1-chloro-4-fenilo-3-tolueno-p-sulfonamido-butan-2-onem (TPCK) (wzór 1) (13-16 i literatura tam cytowana).



Struktura chemiczna TPCK

Jednym z podstawowych pytań dotyczących EFTu jest problem regulowania jego aktywności. Prawdopodobnie jest ona determinowana allosterycznie poprzez zmiany konformacyjne, wywoływane przyłączeniem dwufosforanu i trójsforanu guanozyny (GDP i GTP). Istnieją co najmniej dwa sposoby sprawdzenia tej hipotezy: po pierwsze poprzez badania krystalograficzne (10) oraz po drugie poprzez badania nad inhibicją aktywności biologicznej (13).

W przypadku pierwszej alternatywy optymalna droga prowadzi do wydzielenia i wykrycia, a następnie do określenia parametrów krystalograficznych i stworzenia modelu przestrzennego kompleksów, w których występuje jednocześnie czynnik Tu oraz fosforan guanozyny, a więc w tym wypadku: dwóch kompleksów dwuskładnikowych (EFTu-GTP i EFTu-GDP) oraz kompleksu trójskładnikowego (AA-tRNA-EFTu-GTP).

Obecnie znany jest model trójwymiarowy kompleksu dwuskładnikowego EFTu-GDP opracowany na podstawie danych krystalograficznych dla czynnika wydzielonego z bakterii *E.coli* (10). Część kompleksu ma kształt owalny, nieco wydłużony (stosunek osi wynosi 2,5-3), z kilkoma nieregularnymi wybrzuszeniami.

Aczkolwiek autorzy bieżąco wprowadzają do swego modelu pewne korekty, jednakże może on już być w pełni przydatny w pracach i rozważaniach nad oddziaływaniami pomiędzy czynnikiem Tu a jego ligandami. Możliwe jest takie ułożenie obu struktur: kompleksu dwuskładnikowego EFTu-GDP oraz tRNA, że są one niejako komplementarne względem siebie, tworząc zwartą bryłę. Niestety, brak jest danych eksperymentalnych wskazujących na wzajemne ułożenie przestrzenne tych części, a przytoczony powyżej opis bazuje jedynie na dopasowaniu do siebie modeli wykonanych w tej samej skali (10). W przeciwieństwie do kompleksu EFTu-GDP nie mamy danych krystalograficznych kompleksu EFTu-GTP, ani też danych na temat kompleksu trójskładnikowego AA-tRNA-EFTu-GTP. Tak więc poglądy na temat wzajemnego ułożenia przestrzennego trzech części (GTP, AA-tRNA i EF) są tylko hipotezami.

Równoległe z pracami krystalograficznymi były prowadzone badania nad strukturą I-rzędową czynnika Tu. Czynnik wyizolowano z trzech różnych szczepów bakterii *E.coli* w formie kompleksu EFTu-GDP (1). Analizę sekwencyjną prowadzono w różnych laboratoriach techniką degradacji Edmana stosując bądź to manualną metodę dansylowania, bądź też sekwencjonowanie automatyczne na stałym podłożu.

Ponieważ czynnik elongacyjny EFTu jest kodowany przez dwa różne geny: *tuf A* i *tuf B* (17) było rzeczą niezwykle ciekawą porównanie sekwencji produktów obu genów. Nie stwierdzono różnic w strukturze I-rzędowej czynników kodowanych przez te dwa geny. Taki wynik analizy sekwencyjnej jest w ścisłej korelacji z pracami prowadzonymi nad mechanizmem aktywności biologicznej. Wykonane badania nie doprowadziły do wykrycia różnic funkcjonalnych. Istota występowania dwóch genów dla czynnika Tu nie jest w chwili obecnej zrozumiała. Jako jedyne różnice wykryto, iż gen *tuf B* nie jest istotny dla wzrostu bakterii oraz, że geny charakteryzują się różną opornością na antybiotyk — kirromycynę (20). Wyizolowanie czynnika EFTu jako produktu pojedynczego genu ze szczepu bakterii opornych na kirromycynę pozwoliło również stwierdzić, iż faktor taki (określony jako EFTu A) nie jest aktywny w Q $\beta$  RNA polimerazie, jak również wykazuje (dla produktu genu *tuf B*) niepełną aktywność faktora Tu w procesie biosyntezy białka (20). Jednakże zmiany te były indukowane pierwotną interakcją z antybiotykiem — kirromycyną.

Na podstawie znanej sekwencji próbowano określić strukturę II-rzędową. Ustalono, że ok. 30% łańcucha aminokwasowego Tu ma formę  $\alpha$ -spirali (ang.  *$\alpha$ -helix*), natomiast ok. 16% stanowi konformacja  $\beta$  (ang.  *$\beta$ -sheet*). Mimo czynionych prób nie stwierdzono korelacji pomiędzy II-rzędową strukturą EFTu a jego funkcją. Nato-



miast, co wydaje się bardzo interesujące, wykryto duże podobieństwo znacznych fragmentów strukturalnych czynnika EFTu oraz czynnika elongacyjnego EFG. Dla niektórych odcinków łańcucha polipeptydowego homologię sekwencyjną określono na 80%.

Przypuszcza się również na podstawie wstępnych danych, iż struktura I-rzędowa EF-1 może być bardzo podobna do struktury czynnika inicjującego 2 (IF2) oraz czynnika terminującego (RF). Wydaje się rzeczą bardzo istotną podkreślenie, że wymienione czynniki białkowe (EFTu, EFG, IF2, RF) są kodowane na chromosomie przez sąsiadujące ze sobą geny (1).

Znając strukturę I-rzędową czynnika EFTu można było zidentyfikować fragmenty łańcucha polipeptydowego oddziałujące z cząsteczką AA-tRNA w procesie biosyntezy białka. Badania prowadzono z zastosowaniem technik: znakowania powinowactwa (ang. *affinity labelling*) oraz wytwarzania wiązań krzyżowych (ang. *crosslinking*). Stwierdzono, iż w reakcji pomiędzy EFTu a AA-tRNA uczestniczy region pomiędzy 44 a 57 aminokwasem; fragment ten zawiera 2 odcinki  $\alpha$ -spiral (1).

Z cząsteczką AA-tRNA oddziałuje również bezpośrednio cysteina (pozycja 81 (1, 16) oraz znajdujące się w bezpośrednim sąsiedztwie reszty histydyny (18).

Drugą drogą badania mechanizmu oddziaływań pomiędzy czynnikiem EFTu a AA-tRNA, poprzez hamowania aktywności biologicznej czynnika, zastosowano w Czechosłowackiej Akademii Nauk w laboratorium J. Jonaka. Scharakteryzowano tam wysoce specyficzny inhibitor: TPCK (por. Ryc. 1), tworzący wiązanie kowalentne z grupami SH, pochodzącymi, np. z aminokwasu cysteiny. W procesie biosyntezy białka TPCK hamuje tylko reakcję tworzenia kompleksu trójskładnikowego: AA-tRNA-EFTu-GTP, a w konsekwencji uniemożliwia przyłączenie AA-tRNA do rybosomów, czyli blokuje cały proces biosyntezy białka. TPCK nie hamuje natomiast tworzenia kompleksów dwuskładnikowych pomiędzy Tu a GDP czy też GTP. Podobnie nie wykryto żadnego efektu TPCK na aktywność czynnika EFG, czy też faktora IF2 (czynniki te, jak wyżej wzmiankowano, wykazują pewne podobieństwo sekwencyjne do czynnika Tu (13-16).

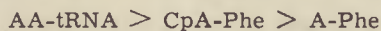
W wyniku utworzenia wiązania kowalentnego z grupami tiolowymi z cysteiny przez TPCK cząsteczka czynnika Tu jest niezdolna do tworzenia kompleksów z AA-tRNA. Jednocześnie stwierdzono, że czynnik Tu skompleksowany z AA-tRNA (np. w kompleksie trójskładnikowym) jest chroniony przed inaktywacją.

A zatem można postawić hipotezę, iż obie cząsteczki, tj. TPCK i AA-tRNA, oddziałują z tym samym elementem strukturalnym czynnika, a więc z grupami SH, pochodzącymi z reszty cysteiny znajdującej się w pozycji 81 jak to wynika z badań sekwencyjnych. W przeciwieństwie do AA-tRNA cząsteczka tRNA nie wykazuje praktycznie żadnego efektu ochronnego, względem czynnika Tu. Można więc przyjąć, że w procesie oddziaływania i rozpoznania bezpośrednio jest zaangażowany koniec 3' cząsteczki AA-tRNA. Dlatego też do badań użyto chemicznie zsyntetyzowanych analogów końca 3' cząsteczki AA-tRNA, a mianowicie:

— A-Phe (2',3',-O-L-fenylalanyloadenozyny),

— CpA-Phe (cytydylo-3'-5'(-2')3'(-O-L-fenylalanyloadenozyny).

W próbach kontrolnych zastosowano: fenylalaninę, cytydynę i adeninę (Phe, A i C). Efektu ochronnego nie stwierdzono. Natomiast w przypadku stosowania komponentów końca 3' efekt ochronny układał się w następującej kolejności:



Eksperyment został wykonany w ten sposób, iż czynnik Tu preinkubowano z określonym czynnikiem ochronnym, a następnie poddawano otrzymany kompleks inaktywacji za pomocą TPCK, po czym określano stopień zdeaktywowania, a więc pośrednio współczynnik ochronny danego czynnika (16). Jednoznacznym wnioskiem



z powyższego eksperymentu jest, że koniec 3' cząsteczki AA-tRNA jest bezpośrednio zaangażowany w procesie rozpoznania faktora (15, 16).

Kolejnym elementem strukturalnym cząsteczki AA-tRNA zaangażowanym w procesie interakcji pomiędzy faktorem Tu a cząsteczką AA-tRNA jest wiązanie estrowe występujące pomiędzy 3' końcową adenozyną a przyłączonym aminokwasem. Celem zbadania słuszności tego przypuszczenia zastosowano zamiast AA-tRNA inny analog końca 3' — a mianowicie antybiotyk puromycynę. Puromycyna jest pełnym analogiem strukturalnym układu adenozyna-aminokwas, z tym, że zamiast wiązania estrowego występuje w niej wiązanie amidowe.

Cząsteczka puromycyny w analogicznym doświadczeniu jak poprzednio nie wykazała żadnej ochrony faktora Tu przed inaktywacją za pomocą TPCK. Jednoznacznie konkluzją jest, że czynnik elongacyjny EFTu rozpoznaje oraz rozróżnia wiązanie amidowe i estrowe (15). Reasumując można stwierdzić, że aby czynnik EFTu mógł rozpoznawać AA-tRNA muszą być spełniane następujące warunki:

- cząsteczka tRNA winna być aminoacylowana,
- aminokwas musi być połączony poprzez wiązanie estrowe,
- grupa  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> aminokwasu nie może być modyfikowana.

Specyficzność rozpoznania czynnika EFTu jest warunkowana przez:

- cysteinę w pozycji 81 oraz sąsiadujące histydyny, a
- EFTu winien mieć formę kompleksu dwuskładnikowego z GTP (a nie z GDP).

Z różnicy w reaktywności i specyficzności rozpoznania ligandów przez EFTu-GTP i EFTu-GDP wynika, iż nukleotyd guanozyny powoduje zmiany we własnościach funkcjonalnych faktora. Przyłączenie GTP do faktora powoduje uaktywnienie miejsca rozpoznania końca 3' cząsteczki AA-tRNA. Tak więc GTP lub GDP pełnią funkcje allosterycznych regulatorów aktywności biologicznej czynnika Tu, bowiem decydują o przyłączeniu AA-tRNA, czyli formowaniu kompleksu trójskładnikowego (19).

Określenie struktury I-rzędowej czynnika EFTu- oraz opracowanie modelu przestrzennego kompleksu EFTu-GDP stanowią bardzo duże osiągnięcia. Jednakże jak dotąd nie doprowadziły one do zaproponowania modelu interakcji z cząsteczką AA-tRNA. Stosunkowo proste badania mechanizmu kompetycji, pozwoliły już jednak na określenie uczestniczących w procesie rozpoznania miejsc aktywnych obu cząsteczek.

T. Twardowski, J. Pulikowska, K. Gulewicz  
Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Zaakceptowano do druku 10.1.1981

#### PIŚMIENNICTWO:

1. Arai, K., Clark, B. F. C., Duffy, L., Jones, M. D., Kaziro, Y., Laursen, R. A., L'Italien, J., Miller, D. L., Nagarkatti, S., Nakamura, S., Nielsen, K. M., Petersen, T. E., Takahashi, K., Wade, M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 1326—1330.
2. Pulikowska, J., Twardowski, T., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 183—208.
3. Twardowski, T., Pulikowska, J., (1980), *Post. Biochem.*, w druku.
4. Blumenthal, T., Carmichael, G. G., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 525—548.
5. Wolf, H., Chinali, G., Parmeggiani, A., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71**, 4910—4914.
6. Wilson, G. E., Cohn, M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2004—2009.
7. Wolf, H., Assman, D., Fisher, E., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 5324—5328.
8. Rich, A., Kim, S. H., (1978), *Sci. Amer.*, **238**, 52—54.
9. Wrede, P., Woo, N. H., Rich, A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 3289—3293.
10. Clark, B. F. C., referat wygłoszony w ramach „EMBO — FEBS tRNA Workshop”, Strasbourg, Francja, lipiec 1980 r.

11. Jornak, F., Miller, D. L., Rich, A., (1977), *J. Mol. Biol.*, 115, 103—109.
12. Morikowa, K., LaCour, F. F. M., Nyborg, J., Rasmussen, K. M., Miller, D. L., Clark, B. F. C., (1978), *J. Mol. Biol.*, 125, 325—333.
13. Jonak, J., komunikat wygłoszony w ramach „EMBO — FEBS tRNA Workshop”, Strasbourg, Francja, lipiec 1980.
14. Rychlik, I., Jonak, J., Sedlacek, J., (1974), *Acta Biol. Med. Germ.*, 33, 867—876.
15. Jonak, J., Rychlik, I., Smrt, J., Holy, A., (1979), *FEBS Lett.*, 98, 329—332.
16. Jonak, J., Smrt, J., Holy, A., Rychlik, I., (1980), *Eur. J. Biochem.*, 105, 315—320.
17. Jaskunas, S. R., Lindahl, L., Nomura, M., Burgess, R. R., (1975), *Nature (London)*, 257, 458—462.
18. Jonak, J., Rychlik, I., (1980), *FEBS Lett.*, 117, 167—171.
19. Van der Meide, P. H., Borman, T. H., Van Kimmenade, A. M. A., Van de Putte, P., Bosch, L., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 3922—3926.

### Kaskada kwasu arachidonowego \*

W ciągu dwóch dni (26 i 27.IX.1980) ponad dwudziestu uczonych z Belgii, Finlandii, Francji, Italii, Japonii, Polski, Szwajcarii, U.S.A., Wielkiej Brytanii i ZSRR prowadziło ożywioną dyskusję nad zagadnieniami chemii, biochemii, fizjologicznym znaczeniem i klinicznym zastosowaniem produktów przemiany kwasu cis-eikoz-5,8,11,14-tetraenowego, czyli kwasu arachidonowego. Kwas ten jest biologicznie najważniejszym nienasyconym kwasem tłuszczowym, stanowiącym szczególnie istotny składnik fosfolipidów błon komórkowych, skąd uwalniany jest przez fosfolipazę  $A_2$ , aby z budulca komórkowego stać się substratem wewnątrzkomórkowych enzymów oksydacyjnych. Enzymy te przetwarzają go na wysoce aktywne mediatory reakcji biologicznych, takie jak prostaglandyny, prostacyklina, tromboksan i leukotrieny.

Dr Rodric Flower (W. Brytania) przypomniał, że zjawisko hamowania uwalniania kwasu arachidonowego z fosfolipidów komórkowych przez glukokortykosterydy zostało po raz pierwszy odkryte w Polsce w 1975 roku. I chociaż do dzisiaj mechanizm unieczynniania przez hormony nadnercza fosfolipazy  $A_2$  nie został wyjaśniony, to jednak coraz więcej gromadzi się danych świadczących, że totalne zahamowanie przemian kwasu arachidonowego przez hydrokortyzon i sterydowe leki przeciwzapalne może leżeć u podłoża ich skuteczności leczniczej w odczynach uczuleniowych i zapalnych. Glukokortykosterydy hamują bowiem nie tylko tworzenie się odczynu zapalnego — prostaglandyn (podobnie, jak aspiryna), lecz również mediatorów odczynu anafilaktycznego, leukotrienów C i D, czynnika chemotaktycznego dla leukocytów, leukotrienu B oraz cytotoksycznych lizolecytyn i tromboksanów. Dr R. Flower przedstawił własną koncepcję działania glukokortykosterydów na kaskadę kwasu arachidonowego. Według niego sterydy łącząc się z właściwymi im receptorami komórkowymi, drogą transkrypcji i translacji, zapoczątkowują w komórce biosyntezę specjalnego białka — makrokortyny, która jest endogennym inhibitorem fosfolipazy  $A_2$ . Farmakologiczna koncepcja Flowera indukowania endogennego inhibitora fosfolipazy  $A_2$  przez glukokortykosterydy zyskała silne poparcie w badaniach nad zależnością pomiędzy populacją receptorów sterydowych, a biosyntetyczną zdolnością prostaglandyn w hodowlach komórkowych (Dr Francoise Russo-Marie, Francja), oraz w badaniach nad wydzielaniem makrokortyny przez leukocyty stymulowane deksametazonem (Dr Massimo di Rosa, Italia). Uwolniony kwas arachidonowy jest substratem cyklooksygenazy przetwarzającej go na cykliczny nadtlenek prostaglandynowy ( $PGG_2$ ). W pewnych komórkach kwas arachidonowy ulega lipooksydacji

\* Podsumowanie sympozjum, które odbyło się w Poznaniu w dniach 26-27.IX.1980 pod patronatem Europejskiego Towarzystwa Biochemicznej Farmakologii i Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego.



tworząc odpowiednie hydroperoksykwasy, z których szczególnie ciekawym biologicznym jest kwas 5-hydroperoksy-eikozatetraenowy (5-HPETE).

Dr Kay Brune (Szwajcaria) przedstawił swój nieortodoksyjny punkt widzenia działania tzw. niesterydowych leków przeciwzapalnych (np. aspiryny lub indometacyny) na przemiany kwasu arachidonowego. Otóż od 1971 roku tj. od chwili odkrycia przez Dr J. Vane'a (W. Brytania) hamowanie cyklooksygenazy przez aspirynę, przyjmuje się powszechnie, że ten biochemiczny efekt wywoływany przez niesterydowe leki przeciwzapalne leży u podłoża ich skuteczności leczniczej, a także działań ubocznych (np. nadżerki śluzówki żołądka, działanie nefrotoksyczne). Ten pogląd podważył Dr K. Brune wykazując, że usunięcie prostaglandyn z ogniska zapalnego przez niesterydowe leki przeciwzapalne nie jest wystarczającym wytłumaczeniem ich działania przeciwzapalnego. Ponadto nie zawsze można skorelować siłę działania przeciwzapalnego leku z jego siłą hamowania biosyntezy prostaglandyn via cyklooksygenaza. Trudno się oprzeć refleksji, że w nauce obserwujemy nieustanną tendencję do uzupełniania zastanego stanu wiedzy. Zwykle początkowo wynajduje się luki w istniejącej koncepcji, a dopiero potem przychodzi czas na wypełnienie ich nowymi hipotezami, które z kolei są również korygowane.

Dr Kenneth Eakins (W. Brytania) przedstawił odkrycie, które w pewnym sensie wypełnia lukę zauważoną przez Dr K. Brune w klasycznej „prostaglandynowej” koncepcji działania niesterydowych leków przeciwzapalnych. Jak wiadomo, prostaglandyny (a głównie wśród nich prostaglandyna  $E_2$ ) zwiększają przepuszczalność naczyń włosowatych, wywołują zaczerwienienia i obrzęki, mogą powodować nasilanie się bólu wywołanego podrażnieniem zakończeń nerwowych przez histaminę i bradykininę, ale nie jest to jeszcze pełny obraz odczynu zapalnego. Prostaglandyny nie mają działania chemotaktycznego ani chemokinetycznego na leukocyty, a przecież nacieki komórkowe są ważną częścią składową odczynu zapalnego. Dr K. Eakins odkrył, że prawdziwym czynnikiem chemotaktycznym dla leukocytów jest produkt lipooksydacji kwasu arachidonowego, kwas 5,12-dwuhydroksyeikozatetraenowy (5,12-di-HETE, leukotrien B) działający chemotaktycznie 100—1000 razy silniej, niż jakikolwiek monohydroksy kwas wywodzący się z kwasu arachidonowego. Aby więc uzyskać silne działanie przeciwzapalne należy zahamować obie drogi przemian kwasu arachidonowego: 1) cyklooksygenację prowadzącą do prostaglandyn i 2) lipooksydację prowadzącą do powstania leukotrienu B. Tak działają np. sterydowe leki przeciwzapalne. Znane jest jednak ich niebezpieczne działanie uboczne związane z zasadniczym działaniem hormonalnym i z działaniem immunosupresyjnym. Należałoby więc zsyntetyzować związek o podobnym działaniu, który nie byłby sterydem. Jedną z dróg rozwiązania tej kwadratury koła byłoby stosowanie czystej makrokortyny Flowera. Inna możliwość polega na znalezieniu syntetycznego leku, który byłby jednocześnie inhibitorem cyklooksygenazy i lipooksydazy kwasu arachidonowego. Taką substancją ma być związek BW 755C, nad którym prowadzi badania Dr K. Eakins.

Powróćmy jednak do zasadniczej drogi cyklooksygenacji kwasu arachidonowego. Pierwszymi produktami tej enzymatycznej reakcji są nietrwałe cykliczne nadtlutki prostaglandynowe ( $PGG_2$  i  $PGH_2$ ), które najprawdopodobniej bez udziału enzymów mogą przekształcić się do różnorodnych prostaglandyn ( $E_2$ ,  $F_2$ ,  $D_2$ ). Jednak w układzie krążenia z  $PGH_2$  powstają na drodze enzymatycznej dwie nietrwałe, lecz bardzo aktywne substancje. W płytkach krwi synteza tromboksanu wytwarza z  $PGH_2$  tromboksan  $A_2$  ( $TXA_2$ ), zaś w śródbłonku tętnic, płuc i nerek z  $PGH_2$  syntetaza prostacykliny tworzy prostacyklinę ( $PGI_2$ ).  $TXA_2$  wywołuje zlepianie się płytek krwi i skurcz tętnic.  $PGI_2$  hamuje zlepianie się płytek krwi i rozszerza naczynia krwionośne. A więc jeszcze jeden układ „yin-yang”, jak pary c-AMP/c-GMP, acetylocholina/adrenalina i wiele innych w ustroju. Temu układowi poświęcono dużo miejsca podczas sympozjum.



Jednym z pierwszych uczonych, który zwrócił uwagę na znaczenie płytek krwi i ich współdziałanie ze śródbłonkiem tętnic w celu utrzymania homeostazy w układzie krążenia był Dr Gustav Born (W. Brytania). On też był pierwszym, który opracował aparat do badania zlepiania się płytek (agregometr). Prostacyklinowo-tromboksanowa hipoteza powstawania zakrzepów wewnątrznaczyniowych, a także miażdżycy, była szeroko dyskutowana podczas sympozjum.

Dobrze się złożyło, że Dr G. Born przedstawił swoją odmienną koncepcję powstawania zakrzepów wewnątrznaczyniowych. Jego zdaniem, na pierwszy plan w tym procesie wysuwa się interakcja pomiędzy krwinkami czerwonymi, a krwinkami płytkowymi. Śródbłonek naczyniowy wraz z jego prostacykliną wg Dr G. Borna odgrywa drugoplanową rolę. „Skaleczenie” skalpelem polietylenowego przewodu, w którym przepływa krew, wywołuje powstawanie zakrzepu, podobnie jak gdyby skaleczono tętnicę. Zakrzep nie powstanie jednak, gdy zamiast krwi przez polietylenowy przewód przepływa bogatopłytkowe osocze. Wg Dr G. Borna biochemiczną podstawą tego zjawiska jest uwolnienie z czerwonych ciałek krwi kwasu adenylozynodwufosforowego, który wywołuje zlepianie się płytek krwi.

Dwa referaty: Dr A. Klimova (ZSRR) i Dr L. Samochowca (Polska) pozwoliły na zrozumienie roli metabolizmu lipidów dla rozwoju miażdżycy. W szczególności przedstawiono sposoby penetracji lipoproteidów do ściany tętnicy, z ich następczym katabolizmem, aktywacją biosyntezy glicerydów i fosfolipidów, oraz akumulacją estrów cholesterolu w ścianie tętnicy. Z drugiej strony przedstawiono ochronną rolę fosfolipidów w przeciwdziałaniu rozwojowi miażdżycy.

Z referatem Dr Fujio Numano zapoznaliśmy się, niestety, jedynie na podstawie streszczenia. Badania tego Autora wskazują na znaczne obniżenie zawartości cyklicznego AMP w miażdżycowo zmienionych tętnicach, zwiększonej wrażliwości tych naczyń na kurczące działania tromboksanu  $A_2$  i wzrost jego metabolitów w osoczu ludzi i zwierząt z miażdżycą.

Dr Ryszard Gryglewski (Polska) i Dr Andrzej Szczeklik (Polska) wysunęli koncepcję, że miażdżycą jest chorobą z niedoboru prostacykliny. Niedobór ten powstaje wskutek zatrucia tętniczej i płucnej syntetazy prostacykliny przez nadmierną lipoproteidów zamieszkujące w lipoproteidach o niskiej gęstości (LDL). Niedobór prostacykliny wiąże się z nadmierną aktywacją płytek krwi i nadmierną produkcją tromboksanu  $A_2$  przez płytki. Na podstawie tej koncepcji dokonuje się klinicznych prób stosowania prostacykliny w miażdżycy tętnic kończyn dolnych, w dusznicy bolesnej i w zakrzepie żyły środkowej siatkówki (Dr H. Żygulska-Machowa i Dr E. Kostka-Trąbkowa, Polska).

Podobne próby terapeutyczne były podejmowane w miażdżycy tętnic kończyn dolnych przy użyciu prostaglandyny  $E_1$ , o czym między innymi mówił w swoim przeglądowym referacie Dr Heikki Vapaatalo (Finlandia). Prostaglandyna  $E_1$  ma działanie zbliżone do prostacykliny, chociaż przeciwplytkowo działa 20-40 razy słabiej.

Również syntetyczne analogi prostacykliny i prostaglandyny  $E_1$  a także inne struktury chemiczne o działaniu przeciwagregacyjnym na płytkach krwi hamują tworzenie się zakrzepów *in vivo* (Dr Makoto Katori, Japonia). O drogach poszukiwania tych analogów metodą syntezy chemicznej mówili Dr N. Whittaker (W. Brytania) i Dr U. Axen (USA).

Inne kliniczne wykorzystanie przeciwagregacyjnych właściwości prostacykliny polega na zastosowaniu jej w krążeniu pozaustrojowym (sztuczna nerka, sztuczna wątroba, oboczne krążenie sercowo-płucne), co umożliwiłoby zmniejszenie dawki heparyny i zapobiega niektórym skutkom ubocznym długotrwałego krążenia pozaustrojowego jak np. zwiększone zużycie płytek krwi. O badaniach na psach i pierwszych próbach klinicznych mówił Dr S. Bunting (W. Brytania). On też po-

dał pierwsze wyniki wskazujące na fakt, że terapia prostacyklinowa hamuje odrzut przeszczepionej nerki u psów, co wiąże się również z anty-agregacyjnym działaniem prostacykliny.

Inną teoretyczną możliwość użytkowania prostacykliny przez ustrój przedstawił Dr C. Pace-Asciak (Kanada). Według niego, prostacyklina tworzona zarówno miejscowo w tętnicach, jak również w korowej części nerki może odgrywać rolę czynnika regulującego ciśnienie krwi, bądź na drodze lokalnego rozszerzania naczyń krwionośnych, bądź jako stymulator wydzielania reniny przez nerkę.

Dr A. G. Herman (Belgia) przedstawił swoje ostatnie odkrycie, dotyczące różnic gatunkowych w wytwarzaniu prostacykliny i odczynowości płytek na prostacyklinę. Okazało się, że tętnice kurczą nie tworzą prostacykliny, a ich trombocyty nie są wrażliwe na prostacyklinę. Rolę prostacykliny u ptaków wydaje się spełniać prostaglandyna E<sub>2</sub>.

Wreszcie Dr J. Salmon (W. Brytania) i Dr C. Patrono (Italia) przedstawili zasób technik współcześnie dostępnych, które umożliwiają oznaczanie metabolitów kwasu arachidonowego w płynach ustrojowych. Najwyżej cenioną, jednak najtrudniejszą i najbardziej kosztowną jest technika spektrometrii masowej sprzężonej z chromatografią gazową lub z wysokociśnieniową chromatografią cieczą. Użycie kolumn kapilarnych w chromatografii gazowej zwiększa rozdzielczość metody już w pierwszym etapie w stosunku do rozlicznych metabolitów kwasu arachidonowego zawartych w płynach biologicznych. Zalecane jest wstępne oczyszczanie materiału biologicznego przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej lub kolumnowej. Powszechną trudność w stosowaniu tej metody stanowi brak na rynku deuterowanych wewnętrznych standardów poszczególnych metabolitów.

Technika radioimmunologiczna jest łatwiejsza tylko z pozoru. Pozorna jej łatwość wypływa stąd, że na rynku są dostępne zestawy przeciwciał dla wielu metabolitów kwasu arachidonowego. Przed oznaczeniem metabolitu należy jednak dokonać jego właściwego wyboru (np. w moczu głównym metabolitem tromboksanu A<sub>2</sub> jest 2,3-dinor-TXB<sub>2</sub>, a nie TXB<sub>2</sub>), znać jego stabilność (np. 13,14-dwuhydro-15-keto-PGE<sub>2</sub>, główny metabolit w surowicy jest nietrwały w środowisku wodnym), decydować się na wstępne oczyszczenie materiału biologicznego, lub zaniechać tej procedury, który może „zanieczyścić” próbkę immunologicznie. Przykładem trudności, jakie stwarza ta technika jest fakt, że w wielu pracowniach wykryto metodą radioimmunologiczną znaczne ilości 6-keto-PGF<sub>1</sub> w próbkach z krwi żyłnej, chociaż nie udało się potwierdzić tam obecności tego metabolitu metodą spektrometrii masowej. Dr C. Patrono zwrócił uwagę, że metoda radioimmunologiczna jest odgałęzieniem metody biologicznej oznaczania metabolitów kwasu arachidonowego i jest obciążona jej niedoskonałościami.

Sumując, z referatów i dyskusji poznańskiego sympozjum wyłonił się następujący obraz kaskady kwasu arachidonowego. W odczynach zapalnych i uczuleniowych odgrywają rolę mediatorów lub modulatorów takie metabolity kwasu arachidonowego, jak prostaglandyny, cykliczne nadtenki prostaglandynowe i leukotrieny. Głukokortykosterydy, prawdopodobnie przez indukcję biosyntezy makrokortyny (endogennego inhibitora fosfolipazy A<sub>2</sub>) hamują tworzenie się tych mediatorów. Być może dlatego sterydowe leki działają tak silnie przeciwzapalnie i przeciwuczuleniowo. Niesterydowe leki przeciwzapalne (np. aspiryna lub indometacyna) hamują tylko tworzenie się produktów cyklo-oksigenacji, a więc cyklicznych nadtenków prostaglandynowych i prostaglandyn. Leki te mogą nawet stymulować metabolizm kwasu arachidonowego w kierunku lipooksydacji, a więc tworzenia się leukotrienów. Dlatego aspiryna i inne leki aspiryno-podobne działają przeciwzapalnie, lecz nie przeciwuczuleniowo. Odkrycie leukotrienów B, C i D stawia nowe zadania przed chemikami i farmakologami znalezienia nowego typu



leków przeciwzapalnych i przeciwuczuleniowych, które będą jednocześnie inhibitorami cykloogsygenazy i lipooksydazy kwasu arachidonowego.

W układzie krążenia antagonistyczną rolę pełnią dwa inne metabolity kwasu arachidonowego: prostacyklina i tromboksan A<sub>2</sub>. Prostacyklina wytwarzana jest przez śródbłonek tętnic, płuc i nerek, natomiast tromboksan A<sub>2</sub> przez płytki krwi. Prostacyklina hamuje agregację płytek i rozszerza naczynia krwionośne. Tromboksan wywołuje zlepianie się płytek i kurczy tętnice. Stwierdzono, że w miażdżycy doświadczalnej spada zdolność tkanek do wytwarzania prostacykliny i wzrasta zdolność płytek do tworzenia tromboksanu A<sub>2</sub>. Przyczyną tego stanu rzeczy jest prawdopodobnie wybiórcze hamowanie czynności syntetazy prostacykliny przez alifatyczne nadtlenki lipidów nagromadzone w lipoproteidach o niskiej gęstości (LDL). Wysłano hipotezę, że miażdżycą jest chorobą z niedoboru prostacykliny. Zgodnie z tą hipotezą istnieją następujące możliwości powstrzymania rozwoju choroby:

- a) zahamowanie tworzenia się alifatycznych nadtlenków lipidów i odpowiadających im wolnych rodników (np. przez witaminę E, zmiatacze wolnych rodników, przeciwutleniacze),
- b) zahamowanie syntetazy tromboksanu (np. przez pochodne imidazolu),
- c) stymulacja biosyntezy prostacykliny (np. przez almitrynę),
- d) podawanie syntetycznej prostacykliny lub jej analogów.

Tak więc rozpatrzenie patofizjologicznej roli dwóch par metabolitów kwasu arachidonowego tj. prostaglandyn/leukotrienów oraz prostacykliny/tromboksanu pobudziło uczestników sympozjum do dalszych badań nad taką farmakologiczną ingerencją w kaskadę kwasu arachidonowego, która mogłaby się okazać skuteczna w leczeniu odczynów zapalnych i uczuleniowych, oraz zakrzepów i miażdżycy.

R. Gryglewski

Instytut Farmakologii, Akademia Medyczna,  
Grzegórzecka 16, 31-531 Kraków

Zaakceptowano do druku 6.2.1981

## Udział wirusowej kinazy białkowej w procesie nowotworzenia

W ciągu ostatnich dziesięciu lat odkryto regulacyjne znaczenie fosforylacji białek w wielu procesach. Są to synteza i degradacja glikogenu, przemiany tłuszczów i niektórych aminokwasów, transport jonów, skurcz mięśni, pobudzenie nerwowe, transkrypcja i translacja. Ostatnio zaś uzyskano dane dotyczące udziału kinaz białkowych w procesie nowotworzenia. Rozpatrzmy proces nowotworzenia indukowany przez mały wirus RNA — RSV (*Rous Sarcoma Virus*). Posiada on pojedynczy gen *src* odpowiedzialny za transformację. Jego produktem jest fosfoproteina o ciężarze cząsteczkowym 60 000 (oznaczana symbolem pp60<sup>src</sup>) i aktywności kinazy białkowej. Zdumiewający jest fakt, iż kinaza ta katalizuje przeniesienie fosforanu z cząsteczki ATP nie na treoninowe bądź serynowe, lecz na reszty tyrozynowe białka. Zaobserwowano ponadto, że fosforyluje ona ciężki łańcuch IgG w immunoprecypitatach białek wirusowych. Jakkolwiek wydaje się, że reakcja ta nie ma fizjologicznego znaczenia, jest to właściwość wyróżniająca wirusową kinazę i może być wykorzystywana do jej detekcji. Białko pp60<sup>src</sup> przeprowadza także reakcję autofosforylacji, produktem której jest ufosforylowana reszta tyrozynowa. Autofosforylacja pp60<sup>src</sup> u mutantów termowrażliwych jest zależna od temperatury. W temperaturze niepermissyjnej proces ten nie zachodzi i jednocześnie nie obserwuje



się transformacji nowotworowej. W komórce gospodarza białko pp60<sup>src</sup> może być także fosforylowane w reszcie serynowej przez kinazę zależną od cAMP.

Powstaje teraz pytanie, czy wirusowa kinaza jest zdolna do ufosforylowania białek komórki gospodarza i czy reakcja ta jest związana z indukcją procesu powstawania mięsaka? Otóż stwierdzono, iż zawartość reszt fosfotyrozynowych z zainfekowanej wirusem komórce wzrasta dziesięciokrotnie. Gdy transformacja przeprowadza się przy udziale termowrażliwego mutantu, ilość ufosforylowanego aminokwasu zależy od temperatury, w jakiej następowała infekcja. W komórce gospodarza wykazano obecność białka o ciężarze cząsteczkowym 34 000 (34K); białko to jest fosforylowane przez pp60<sup>src</sup> zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co obserwowano i w materiale ptasim i ssaczym. Naturalnie fosforylowana jest reszta tyrozynowa i także kinaza z mutantów termowrażliwych jest zdolna do ufosforylowania 34K w wąskim przedziale temperatury. Gdy transformacja wywołana jest wirusami mięsaka zawierającymi inny gen transformujący, także obserwowano podwyższoną fosforylację białka 34K.

Ostatnio zakłada się, że gen *src* jest produktem rekombinacji genomu wirusa i komórki gospodarza. Sekwencje DNA ściśle zbliżone do wirusowego genu *src* są obecne w prawidłowych komórkach kręgowców. Znalezione także białko o masie cząsteczkowej 60 000 dające podobne odczyny immunologiczne co pp60<sup>src</sup>. Wykazuje ono również aktywność kinazy fosforylującej reszty tyrozyny. Ilość tego białka w prawidłowej komórce jest 30–50-krotnie mniejsza niż pp60<sup>src</sup> w komórkach zrakovaciących.

Najnowsze doniesienia wskazują na udział pp60<sup>src</sup> w fosforylacji białek błony komórkowej. Stwierdzono iż 30 minut po infekcji aktywność wirusowej kinazy pojawia się na powierzchni komórek, czemu towarzyszy fosforylacja białek błony. Znaczenie tego procesu jest jeszcze nieznanne.

Nie wiemy wiele o roli wirusowej kinazy w procesie indukcji nowotworu. Obecnie jesteśmy w stanie stwierdzić jedynie skutek aktywności pp60<sup>src</sup> w komórce gospodarza, tzn. fosforylację białka 34K i związane z tym wywołanie transformacji. Nie znamy roli ufosforylowanych substratów w metabolizmie komórki i mechanizmów regulujących ekspresję genu kodującego białko odpowiadające pp60<sup>src</sup> w komórkach kręgowców. Należy sądzić, że nadchodzące lata przyniosą szybki rozwój badań nad udziałem kinaz białkowych w procesie transformacji nowotworowej.

K. S. Famulski

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Zaakceptowano do druku 12.06.1981

## Obecne poglądy na wewnątrzkomórkowy katabolizm białek

Scharakteryzowanie większości znanych obecnie proteaz wewnątrzkomórkowych nastąpiło dopiero w ostatnich latach. W związku z tym poszerzył się też znacznie zakres wiedzy o procesach wewnątrzkomórkowej degradacji białka. W chwili obecnej uwaga bardziej koncentruje się na procesach regulacji katabolizmu białek, zwłaszcza w aspektach funkcjonalnych i w powiązaniu z morfologią tkanek.

Skomplikowany przebieg katabolizmu białek w żywym organizmie podlega różnego rodzaju regulacji ogólnoustrojowej, takiej na przykład jak regulacja hormonalna, czy też wywołana niedoborem lub nadmiarem pokarmu (Ballard i wsp.,

Bohley i wsp., Garlick, Millward i wsp., Simon i wsp.), przy czym w różnych narządach regulacja katabolizmu białek zachodzi inaczej. Procesy kataboliczne białek regulowane są także już w komórkach hodowanych *in vitro*. Na przykład w hodowlach fibroblastów Amenta i Brocher zaobserwowali cykliczne okresy wzmoczonej proteolizy znacznej części białek cytoplazmy, po czym komórki powracały do stanu w którym dominują procesy anaboliczne i w konsekwencji następują podziały mitotyczne.

Procesy degradacji białek w żywym organizmie przebiegają równocześnie z procesami syntezy; w zależności od tego, które z nich przeważają obserwuje się w tkance stan kataboliczny, bądź anaboliczny. Z uwagi na powyższe, aktywność enzymów proteolitycznych i ilości degradowanych białek nie są wystarczające dla oceny katabolizmu tkanki. Jak stwierdził Millward i wsp., wzmocnionym procesom anabolicznym tkanki, na przykład w mięśni ulegającym hipertrofii, może towarzyszyć wzmocnienie katabolizmu. W niektórych stanach katabolicznych z kolei następuje zmniejszenie degradacji białka, na przykład przy niedoborach energetycznych, lub w organizmach starzejących się. Coraz częściej też znajduje się powiązania intensywności procesów degradacji ze stanem funkcjonalnym tkanki. Jako przykład niech posłuży mięsień szkieletowy, w którym może nastąpić wzmocnienie katabolizmu podczas zarówno nadmiernego skurczu, jak i rozciągnięcia (Etlinger, Sohar i wsp.). Na jakiej drodze na poziomie molekularnym regulowane są wymienione procesy nie jest na razie wiadomo.

Poszczególne białka charakteryzują się znacznymi różnicami w szybkości metabolizmu: okres półtrwania białek w komórce waha się od minut do tygodni, a nawet miesięcy. Duże znaczenie w regulacji katabolizmu wewnątrzkomórkowego mają inhibitory enzymów proteolitycznych, stosunkowo mniejszą wagę przypisuje się obecnie ilości samych enzymów proteolitycznych w tkance, chociaż wydaje się, że jest ona skorelowana z szybkością metabolizmu. O wejściu na drogę katabolizmu decydują przede wszystkim właściwości samych białek, od których wychodzi sygnał do degradacji. Podatności białka na proteolizę sprzyja obecność na jego powierzchni miejsc hydrofobowych, które ułatwiają reakcję z proteazami, jak również wzajemną agregację cząsteczek białka, czy też łączenia się ich z błonami komórkowymi. Agregację cząsteczek oraz połączenie ich z błonami uważa się za procesy wstępne do wejścia białka na drogę degradacji (Bond i Offermann, Goldberg i wsp.). Obecność miejsc hydrofobowych na powierzchni cząsteczki białka, albo też ich przemieszczenie do środka wynika ze zmian stanu konformacyjnego cząsteczki. Białka o wysokiej stabilności konformacyjnej są na ogół odporniejsze na działanie proteaz, jak też mają dłuższy okres półtrwania niż białka o niskiej stabilności konformacyjnej (Pace i wsp.). Odstanianie się miejsc hydrofobowych może też być spowodowane takimi czynnikami jak denaturacja, czy też modyfikacja białka poprzez fosforylację lub częściową proteolizę. Wydaje się, że za ten ostatni proces często odpowiedzialna jest tiolowa proteaza — katepsyna L (Kirschke, Kargal i wsp.). Dużą rolę w zwiększaniu podatności na proteolizę przypisuje się obecnie utlenianiu grup -SH. W związku z tym bardzo ważnym dla regulacji katabolizmu wewnątrzkomórkowego jest potencjał oksydo-redukcyjny komórki (Khairallah, Bond i Offermann). Podatności na proteolizę sprzyja też zwykle rozdysocjowanie białka na podjednostki, lub pozbawienie ligandów (Bohley i wsp.). Z reguły znacznie łatwiej wchodzi na drogę degradacji tak zwane „białka nie-normalne”, powstałe w wyniku mutacji, nieprawidłowości transkrypcji lub translacji lub wbudowania analogów aminokwasów itp. Podatność na proteolizę natomiast, jak obecnie uważa się, nie zależy od takich cech białek jak wielkość cząsteczki czy punkt izoelektryczny (Russell i wsp.).

Proteazy występują nie tylko w lizosomach i cytosolu, o czym wiemy od daw-



na, ale także w licznych organelach komórkowych, jak mitochondria, jądro, rybosomy, systemy błon wewnątrzkomórkowych czy błona komórki. Rola tych proteaz i drogi ich regulacji nie są dotąd w pełni poznane. Ciągłe też odkrywane są nowe proteazy wewnątrzkomórkowe.

W komórce funkcjonuje kilka układów degradujących białka. Najlepiej poznany, i być może głównym z nich, jest układ lizosomalny. Działa on poprzez tworzenie autofagosomowych wakuoli, które powstają z wyodrębnionej przez otaczanie błonami części cytoplazmy wraz ze znajdującymi się w niej organelami. Degradacja białek następuje po połączeniu autofagosomów z właściwymi lizosomami, zawierającymi enzymy proteolityczne, w tym endopeptydazy — katepsyny B, D, H i S (Pfeifer, Seglen i wsp.). Istotne znaczenie w regulacji powstawania autofagosomów ma zawartość składników cytoplazmy, na przykład wzrost stężenia niektórych aminokwasów hamuje powstawanie autofagosomów (Seglen i wsp.). Układ lizosomalny podlega też wpływom różnych środków farmakologicznych i warunków toksycznych: inhibitory katepsyn lizosomalnych, niektóre związki hamujące syntezę białka, niektóre hormony, związki dezagregujące mikrotubule jak kolchicina i vinblastyna, czy też niedotlenienie, działają hamująco na degradację białka przez układ lizosomalny (Kovács i wsp., Seglen i wsp.). Istota działania poszczególnych czynników nie jest znana.

Układ lizosomalny, jak sądzono do niedawna, jest stosunkowo mało wybiórczy wobec białek. Przez niektórych uważany był za główny układ katabolizujący białka komórkowe „krótko-żyjące”. Ostatnio przeważają jednak poglądy, iż układ ten bierze także udział w selektywnej, regulowanej przez inhibitory, degradacji białek „długo-żyjących” — w tak zwanej „indukowanej degradacji” (Baccino i wsp., Seglen i wsp., Van der Westhuyzen i wsp.). Układ lizosomalny nabiera jeszcze większego znaczenia w wielu stanach patologicznych, zwłaszcza związanych ze wzrostem katabolizmu. W układzie lizosomalnym degradowane są także białka egzogenne, które dostały się do komórki poprzez fagocytozę lub pinocytozę. W różnych komórkach ustroju degradowane są tą drogą białka osocza krwi (Bouma).

Liczne białka i organele komórkowe degradowane są poza lizosomami. Jednym ze znanych układów pozalizosomalnych jest układ działający w cytosolu, który jak się zdaje, selektywnie degraduje białka, zwłaszcza „długo-żyjące”. Występujące w cytoplazmie proteazy neutralne serynowe i tiolowe, o wysokiej specyficzności substratowej, są prawdopodobnie bardzo precyzyjnie regulowane przez inhibitory, hormony, związki drobnocząsteczkowe, jony  $Ca^{++}$  i tym podobne. Kilka proteaz, które zaliczyć można do tego układu opisano m.in. w mięśniu (Afting, Dahlmann i wsp., Kay i wsp.).

Szczególnie intensywnie badane w ostatnim czasie są enzymy proteolizy wewnątrzkomórkowej zależne od ATP. Są to zarówno proteazy cytosolowe, jak i związane z błonami, w tym również proteazy mitochondrialne. Jedną z poznanych proteaz tego typu jest serynowa endopeptydaza (Goldberg i wsp.). W niektórych tylko przypadkach do działania zależnego od ATP układu proteolitycznego niezbędna jest aktywność ATP-azowa (Goldberg i wsp.). Jak się uważa, drogą proteolizy zależnej od ATP ulegają degradacji peptydy o masie cząsteczkowej kilkanaście tysięcy i większej, uprzednio zmodyfikowane, bądź białka „nienormalne”, oraz część białek „krótko-żyjących” (Goldberg i wsp., Hipkiss i wsp.). Enzymy proteolityczne zależne od ATP są odpowiedzialne także za degradację mitochondriów, która zachodzi w cytosolu (Rappaport).

Wielu autorów obserwuje współzależność procesów katabolicznych z syntezą białka w komórce. Jaki jest jednak związek regulacji wymienionych systemów katabolicznych z procesem syntezy białka nie jest wiadomo.

Zasygnalizowane powyżej w wielkim skrócie problemy były głównymi temata-



mi IV Sympozjum „Intracellular Protein Catabolism”, które odbyło się w Reinhardsbrunn k/Gotha (NRD), w okresie 21–27 maja 1981 r. Streszczenia referatów zawarte są w Materiałach Zjazdowych. Pełne teksty wszystkich referatów, w tym i cytowanych wyżej autorów, zostaną zamieszczone w Acta Biol. Med. Germ.

A. Jakubiec-Puka  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Zaakceptowano do druku 15.06.1981



## ARTYKUŁY

EWA KUREK \*

### Prokariotyczne i wirusowe fosfokinazy białkowe i ich biologiczna rola

### Procariotic and Viral Protein Kinases and Their Biological Role

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Prokariotyczne fosfokinazy białkowe
- III. Wirusowe fosfokinazy białkowe
  - 1. Fosfokinazy białkowe bakteriofagów
  - 2. Fosfokinazy białkowe wirusów zwierzęcych
- IV. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Protein kinases in *Procaryotes*
- III. Protein kinases in *Viruses*
  - 1. Protein kinases in bacteriophages
  - 2. Protein kinases in animal cell viruses
- IV. Final remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

ATP — adenzyno-trójfosforan, CTP — cytydino-trójfosforan, GTP — guanozyno-trójfosforan, UTP — urydino-trójfosforan, [ $\gamma$   $^{32}$ P]ATP — adenzyno-trójfosforan znakowany w pozycji  $\gamma$ , cAMP — cykliczny adenzyno-3':5'-monofosforan, cGMP — cykliczny guanozyno-3':5'-monofosforan, SDS — sodowy siarczan dodecylu, NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego, IF-3 — bakteryjny czynnik inicjujący 3.

#### I. Wstęp

Fosfokinazy białkowe katalizują procesy fosforylacji białek w komórce z udziałem ATP lub GTP lub obu tych trójfosfonukleotydów. Akceptorami grup fosforanowych są reszty serynowe lub treoninowe białka, z którymi fosforan jest związany estrowo.

\* Dr, Zakład Biologii Molekularnej, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet im. M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin



Fosfokinazy białkowe występują w komórce zarówno w postaci wolnej jak też w formie związanej z licznymi strukturami komórkowymi takimi jak mitochondria, rybosomy, jądro, frakcja membran. W warunkach *in vivo* właściwymi ich substratami są prawdopodobnie białka charakterystyczne dla danej struktury lub frakcji komórkowej. W warunkach *in vitro* substratami są histony, protamina, kazeina i fosfityna. Szczegółowe informacje dotyczące tego zagadnienia znaleźć można w artykule przeglądowym Walsh'a i Krebs'a (1).

Mechanizm regulacji aktywności fosfokinaz białkowych jest różnorodny. Wyróżniamy dwie grupy kinaz. Jedną stanowią kinazy, których aktywność jest regulowana przez cykliczne nukleotydy, do drugiej grupy należą enzymy, których aktywność jest niezależna od obecności tych nukleotydów.

Kinazy, których aktywność jest regulowana przez cAMP są zbudowane z dwóch podjednostek: podjednostki regulatorowej R i katalitycznej C. Obie tworzą nieaktywny kompleks  $R_2C_2$ . W obecności cAMP zachodzi dysocjacja tego kompleksu i odszczepienie podjednostki katalitycznej. Dla kinaz białkowych zależnych od cGMP związanie cyklicznego nukleotydu jest konieczne dla aktywacji enzymu, lecz nie prowadzi do dysocjacji na podjednostkę regulatorową i katalityczną. Oprócz cyklicznych nukleotydów na aktywność tej grupy kinaz wpływa wiele białek modulatorowych.

Mechanizm regulacji aktywności kinaz niezależnych od cyklicznych nukleotydów jest ciągle niejasny. Wydaje się, że aktywność regulowana jest przy udziale niskocząsteczkowych modulatorów białkowych posiadających wspólne cechy takie jak charakter kwaśny i termostabilność.

Klasyfikację fosfokinaz białkowych przedstawiła Traugh i inni (2) a szczegółowe informacje na ten temat zamieścili w artykule przeglądowym Krebs i Beavo (3).

Eukariotyczne fosfokinazy białkowe są przedmiotem zainteresowań biochemików od kilkunastu lat. Dysponujemy ogromną ilością informacji dotyczących ich budowy i możliwej ich regulacyjnej roli w wielu procesach komórkowych. Badania nad metabolizmem glikogenu, wykazały, że uczestniczą one w regulacji tego procesu (3). Ponadto jest wiele danych o ich udziale w regulacji procesów translacji (4), transkrypcji (5, 6) oraz aktywnego transportu (7).

## II. Prokariotyczne kinazy białkowe

Występowanie fosfokinaz białkowych u organizmów prokariotycznych nie było w pełni udowodnione przez długi czas. W latach 1969—1973 ukazały się prace Kuo i Greengard'a (8) oraz Khandelwala

i innych (9) opisujące obecność u bakterii kinaz zależnych od cAMP. W tym samym okresie czasu Gordon (10) opublikował wyniki badań zaprzeczające istnieniu tych enzymów u *Prokaryota*. Dzisiaj wydaje się, że chociaż prace te obarczone były wieloma błędami przez co prowadziły do nieprawidłowych wniosków, to jednak odegrały inspirującą rolę w poszukiwaniu kinaz białkowych u organizmów prokariotycznych.

W roku 1972 Kurek i inni (11, 12) przedstawili badania stwierdzające fosforylację rybosomów *E.coli* zarówno w układzie *in vitro* jak i *in vivo*. Wykazano elektroforetycznie na żelu poliakryloamidowym obecność jednego ufosforylowanego pasma białkowego we frakcji kwaśnych białek rybosomowych, izolowanych z rybosomów *E.coli* znakowanych *in vivo* [<sup>32</sup>P] ortofosforanem. Fosforan związany był estrowo z resztami serynowymi białka. Ponadto wykazano, że z frakcją rybosomową związana jest kinaza, która w warunkach *in vitro* z udziałem ATP powoduje fosforylację białek rybosomowych. Poziom tej fosforylacji nie ulegał zmianie po dodaniu cAMP. Sugeruje to, że komórka prokariotyczna dysponuje aktywnością kinazową niezależną od cAMP.

Rezultaty Kurek i innych (11, 12) zostały potwierdzone w laboratorium Cozzone w 1979 r. (13). Podczas znakowania *in vivo* komórek *E.coli* [<sup>32</sup>P]ortofosforanem, stwierdzono pojawienie się przynajmniej 4-ech ufosforylowanych białek we frakcji rozpuszczalnej, 5-ciu w nieoczyszczonych preparatach rybosomowych i jednego w oczyszczonych rybosomach. We wszystkich wypadkach fosforylacji ulegały reszty treoninowe i serynowe białka. Autorzy nie identyfikowali fosforylowanych białek. Określili tylko ciężary cząsteczkowe niektórych z nich. Fosforylowane białko w oczyszczonych rybosomach charakteryzuje się ciężarem cząsteczkowym 68 000, który odpowiada białku rybosomowemu S1 wg nomenklatury Wittmanna (14) lub białku A opisanemu przez Subramanian'a i innych (15).

Wang i Koshland (16), badając fosforylację u *S.typhimurium* wykazali obecność fosfokinazy białkowej i udział tego enzymu w fosforylacji białek rozpuszczalnych. Autorzy ci na podstawie elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS i autoradiografii lizatów komórkowych *S.typhimurium* znakowanych [<sup>32</sup>P]ortofosforanem *in vivo*, stwierdzili, że przynajmniej 4 białka o ciężarze cząsteczkowym 88 000, 53 000, 48 000 i 45 000 ulegały fosforylacji. Akceptorami grup fosforanowych były reszty serynowe i treoninowe białka. Te same białka i dodatkowe białko o ciężarze 63 000 były fosforylowane w układzie *in vitro*, gdy substratem i źródłem enzymu był supernatant 100 000×g. Dawcami grup fosforanowych mogły być ATP, GTP a nawet pirofosforan. Chromatografia supernatantu 100 000×g na Sefadeksie G-100 umożliwiła oddzielenie frakcji zawierających substrat od frakcji zawierających aktywność kinazową. W wyniku połączenia obydwu frakcji obserwowano fosforylację białek w obecności trójfosfonukleotydów. Frakcja enzymatyczna wykazy-



wała dużą specyficzność substratową, gdyż nie fosforylowała w warunkach *in vitro* egzogennych substratów takich jak histon, kazeina czy fosfityna.

W badaniach nad NADP — specyficzną dehydrogenazą izocytrynianową (EC.1.1.1.42) u *E.coli* (17, 18) został po raz pierwszy zidentyfikowany u *Prokariota* endogenny substrat fosfokinazy białkowej. Izocytrynian spełnia specyficzną rolę w metabolizmie drobnoustrojów. U większości bakterii jest on substratem dwóch enzymów: liazy izocytrynianowej (EC.4.1.31) i NADP-specyficznej dehydrogenazy izocytrynianowej. Liaza izocytrynianowa jest pierwszym enzymem cyklu glioksalowego, natomiast dehydrogenaza izocytrynianowa jest kluczowym enzymem cyklu Krebsa. Od aktualnej aktywności obu tych enzymów w komórce zależy czy izocytrynian będzie metabolizowany w cyklu kwasów trójkarboxylowych czy w cyklu glioksalowym. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej spada w komórce, gdy następuje uruchomienie cyklu glioksalowego, a więc np. wtedy gdy zamiast glukozy octan staje się jedynym źródłem węgla i energii. I odwrotnie, gdy metabolizm izocytrynianu w cyklu glioksalowym zmniejsza się, aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej powraca bez uruchomienia syntezy białka *de novo* (19). G a r n a k i R e e v e s (18) wykazali, że dodanie octanu i [<sup>32</sup>P]ortofosforanu do hodowli *E.coli* rosnącej na glukozie do osiągnięcia stacjonarnej fazy wzrostu, powoduje gwałtowny spadek aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej i towarzyszy temu fosforylacja tego białka w resztach serynowych. Izolowane w takich warunkach białko dehydrogenazy izocytrynianowej zostało oczyszczone do stanu homogenności i wykazano jego fizykochemiczną i immunologiczną identyczność z enzymem izolowanym z hodowli rosnącej na glukozie. Autorzy sugerują, że obserwowana fosforylacja powoduje inaktywację NADP-specyficznej dehydrogenazy izocytrynianowej (17).

Ostatnio S p u d i c h i S t o e c k e n i u s wykazali odwracalną fosforylację dwóch białek o ciężarze cząsteczkowym 80 000 i 100 000 u halofilnej bakterii *Halobacterium halobium*. Fosforylacja ta podlega fotoregulacji z udziałem światła zaabsorbowanego na bakteryjnych barwnikach retinalowych (20).

Przedstawione tutaj dane pozwalają stwierdzić, że komórka prokariotyczna, podobnie jak eukariotyczna, posiada aktywność fosfokinazową. Nie udało się do chwili obecnej uzyskać bakteryjnej kinazy białkowej w stanie czystym. Dysponowanie oczyszczonym preparatem enzymatycznym pozwoliłoby wyjaśnić wiele pytań takich jak: czy wykorzystywanie pirofosforanu jako donora grup fosforanowych jest rzeczywiście unikalną cechą fosfokinaz bakteryjnych? Jaka jest fizjologiczna rola fosforylacji białek u *Prokariota*?

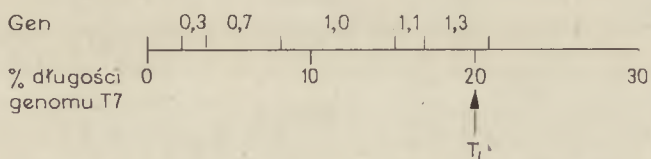


### III. Wirusowe fosfokinazy białkowe

#### III-1. Fosfokinazy białkowe bakteriofagów

W pierwszej połowie lat 70-tych zespół R a h m s d o r f a wyizolował, oczyścił i scharakteryzował kinazę białkową kodowaną przez genom faga T7 (21, 22). Wykazano fosforylację białek gospodarza przez tę kinazę *in vivo* i w układzie *in vitro*. Ponadto podjęto próby wykazania regulacyjnej roli fosforylacji białek gospodarza w przebiegu infekcji fagowej (23, 24, 25).

Fosfokinazę białkową oczyszczono z popłuczyn rybosomowych *E.coli* B<sub>s-1</sub> zebranych w 5 min. po zakażeniu fagiem T7, zmutowanym w genie 1, kodującym fagową polimerazę RNA (mapę genetyczną wczesnego regionu transkrypcji faga T7 przedstawia Ryc. 1). Aktywność kinazy zmienia się w przebiegu cyklu infekcyjnego. Maksymalną aktywność obserwowano w 5 min. po zakażeniu i po tym czasie następował spadek aktywności. Istnieje wiele danych wskazujących, że autofosforylacja prowadzi do inaktywacji enzymu (21). Wyjaśnienie tego problemu wymaga dalszych badań. Fosfokinaza białkowa faga T7 jest monomerem o ciężarze cząsteczkowym 37 000. Aktywność enzymu nie jest stymulowana przez cAMP lub cGMP. W doświadczeniach *in vitro* dawcą grup fosforanowych jest ATP a akceptorem reszty serynowe i treoninowe lizozymu, histonów, protaminy, cytochromu c. Używając jako matrycy DNA faga T7 w układzie *in vitro*, uzyskano dowód, że syntetyzowany enzym jest produktem fagowym. Gen dla tego enzymu znajduje się we wczesnym regionie z lewej strony genu 1 (Ryc. 1).



**Ryc. 1.** Rekombinacyjna mapa genetyczna wczesnego regionu transkrypcji DNA faga T7 (połączone dane wg 26, 27, 28).

0,3 — koduje białko zaangażowane w hamowanie enzymów restrykcyjnych gospodarza (29), 0,7 — koduje fosfokinazę białkową (25), 1,0 — koduje polimerazę RNA (26), 1,1 — funkcja produktu tego genu nie jest wyjaśniona (30), 1,3 — koduje DNA ligazę (26), T<sub>L</sub> — sygnał terminacji wczesnego regionu DNA.

Stwierdzono (22), że nie tylko genom faga T7 lecz także genom faga T3 zawiera informacje dla syntezy kinazy białkowej. Oba fagowe enzymy wykazują podobne właściwości fizyko-chemiczne.

Po infekcji T7 około 40 białek gospodarza ulega fosforylacji w resztach serynowych i treoninowych. Wśród nich są białka rybosomowe (31),

czynnik inicjujący IF-3 (32) oraz podjednostki  $\beta$  i  $\beta'$  RNA polimerazy *E.coli* (23, 24).

Białka rybosomowe mogą być substratem zarówno *in vivo* jak i w układach *in vitro* podczas inkubacji przemytych wysokim stężeniem (1.0 M)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  rybosomów z oczyszczoną kinazą (25). Ufosforylowane *in vitro* rybosomy mogą zastępować rybosomy kontrolne (nieufosforylowane z niezakażonych komórek) w procesie translacji po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej czynników inicjujących (31). Ufosforylowany *in vitro* IF-3 *E.coli* nie wykazuje różnicy w stosunku do kontrolnego czynnika inicjującego w reakcji wiązania do podjednostki 30 S rybosomów (32). Wydaje się więc, że fosforylacja składników układu syntetyzującego białko, nie ma wpływu na przebieg tego procesu w warunkach *in vitro*. Być może taka modyfikacja jest efektywna tylko *in vivo* i jest wymagana dla adaptacji komórki do warunków infekcji. Faktem skłaniającym do takiego rozumowania jest obserwacja, że fosforylacja białek rybosomowych *in vivo* jest specyficzna dla infekcji T7. Zakażenie komórek fagiem T4 nie powoduje fosforylacji białek rybosomowych gospodarza (31).

Wiele wskazuje, że modyfikacja RNA polimerazy *E.coli* na drodze fosforylacji może odgrywać zasadniczą rolę w regulacji transkrypcji genomu T7. Transkrypcja T7 jest podzielona na dwie fazy (Rys. 1). Wczesna transkrypcja pierwszych 20% genomu jest katalizowana przez polimerazę RNA gospodarza zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Transkrypcja późnego regionu DNA jest przeprowadzana z udziałem T7 specyficznej RNA polimerazy, produktu wczesnego genomu 1. Faza transkrypcji z udziałem polimerazy RNA gospodarza jest kontrolowana przez dwa mechanizmy: wczesną kontrolę i wczesno-późną kontrolę. Defekt we wczesnej kontroli prowadzi do nadprodukcji RNA gospodarza i wczesnych RNA faga (23, 27, 28, 33). Dokładna analiza transkrypcji w komórkach zakażonych mutantami T7 o zmienionym procesie wczesnej kontroli wykazała, że mutanty te były także uszkodzone w produkcji kinazy białkowej (23). Sugerowało to, że aktywność kinazy białkowej może być włączona we wczesnej transkrypcji. Podczas infekcji T7 ulega fosforylacji wiele białek gospodarza a wśród nich  $\beta'$  i w mniejszym stopniu  $\beta$  podjednostki RNA polimerazy *E.coli*. Fosforylacja zachodzi w resztach treoninowych. Poziom fosforylacji jest wysoki około 8 moli [ $^{32}\text{P}$ ]fosforanu/mol holoenzymu (24). Pojawieniu się aktywności kinazowej i ufosforylowaniu podjednostek polimerazy towarzyszy wyłączenie syntezy RNA gospodarza (23). Wskazywałoby to, że fosforylacja tych podjednostek może być molekularną podstawą wczesnej kontroli transkrypcji. Stwierdzono, (23) że *in vivo* aktywność kinazy ma wpływ nie na wydłużanie syntetyzowanego łańcucha RNA lecz na jego inicjację i terminację. W nieobecności kinazy sygnał terminacji wczesnego regionu (rys. 1) nie jest efektywnie odczytywany.

Prace zespołu R a h m s d o r f a udokumentowały obecność i działanie fagowych kinaz białkowych i fosforylację białek prokariotycznych, jakkolwiek w bardzo specyficznych warunkach. Wiele danych wskazuje, chociaż nie przedstawiono bezpośredniego dowodu, że taka fosforylacja jest zaangażowana w modyfikację metabolizmu zakażonej komórki.

### III-2. Fosfokinazy białkowe wirusów zwierzęcych

Jeszcze kilka lat temu nierozstrzygniętym było występowanie fosfokinaz białkowych u wirusów. Zebrane informacje nie udzieliły odpowiedzi na pytanie: 1. czy obecność fosfobiałek w oczyszczonych wirusach jest wynikiem fosforylacji z udziałem kinaz komórkowych czy też wirusy posiadają własny kompletny system fosforylacyjny; 2. Jaka jest biologiczna rola fosforylacji (7)?

Dzisiaj nie ulega wątpliwości, że większość wirusów zawiera własne kinazy białkowe. Enzym wyizolowano i oczyszczono z takich wirusów jak ospy (34) i tzw. zabiego 3 (wirus zawierający DNA, replikujący się w cytoplazmie — 35). Ogólnie można je scharakteryzować jako fosfokinazy białkowe niezależne od cyklicznych nukleotydów, fosforylujące *in vivo* specyficzne białka wirusowe i białka gospodarza głównie w resztach serynowych i w mniejszym stopniu treoninowych. W warunkach *in vitro* akceptorami reszt fosforanowych są histony, protamina i fosfityna.

Pozostaje w dalszym ciągu sprawą otwartą biologiczna rola tej fosforylacji. Istnieją liczne dane dotyczące fosforylacji białek rybosomowych gospodarza po infekcji wirusowej. Dotychczas (36, 37) zidentyfikowano trzy fosfobiałka w podjednostce rybosomowej 40 S. Dwa z nich S2 i S16 ulegają fosforylacji w wyniku infekcji. Białko S6, które posiada kilka miejsc akceptorowych dla grup fosforanowych (38, 39) fosforylowane jest zarówno przez kinazy zależne od cyklicznych nukleotydów jak i niezależne (40). Podczas infekcji wirusowej, obserwowano podwyższenie jego fosforylacji, co prawdopodobnie jest wynikiem dofosforylowania przez kinazy wirusowe niezależne od cyklicznych nukleotydów (nomenklatura białek rybosomowych wg Sherton i Woola — 41). Brak jest bezpośredniego dowodu na funkcjonalną rolę indukowanej wirusem modyfikacji rybosomów gospodarza. Za możliwością udziału fosforylacji tych białek w blokowaniu syntezy białek komórkowych przemawia obserwowana przez Kaerlein i Horak (37) zbieżność w czasie fosforylacji białek rybosomowych i wyłączenie syntezy białek gospodarza.

Grupa Beau d'a (42—44) rozpatruje możliwość udziału ufosforylowanych białek wirusowych w obserwowanym zahamowaniu inicjacji syntezy łańcucha polipeptydowego gospodarza, po zakażeniu wirusem ospy. Autorzy ci stwierdzili, że strukturalne białko wirusa ospy VP I Ib,



które stanowi 11% białek strukturalnych wirusa, ulega fosforylacji w reztach serynowych. Proces ten nie jest skorelowany z ekspresją genomu wirusa. Białko to jest specyficznie zasocjowane z rybosomami i poli-rybosomami i daje się oddysocjować po przemyciu 0.5 M KCl. *In vitro* ulega ono fosforylacji przy udziale kinazy wirusa. Za możliwością udziału białka wirusowego w wyłączeniu syntezy białek gospodarza przemawiają następujące fakty: 1. Zarówno wyłączenie syntezy białka gospodarza jak i fosforylacja i wiązanie ufosforylowanego VP IIB do rybosomów zachodzą w nieobecności ekspresji genomu wirusa, w okresie gdy nie są syntetyzowane nowe białka wirusa. 2. Wyłączenie syntezy białka następuje wcześniej w przebiegu infekcji podobnie jak fosforylacja VP IIB. 3. Przy dużej wielokrotności zakażenia (więcej niż 10 cząstek wirusa przypada na jedną zakażoną komórkę) zostaje wprowadzony do komórki duży nadmiar białka VP IIB w stosunku do rybosomów i wtedy obserwuje się zahamowanie syntezy białek komórkowych. 4. Biosynteza białka *in vitro* jest hamowana w obecności rdzeni wirusów ospy, które zawierają VP IIB i kinazę.

Nie można więc wykluczyć, że do zahamowania biosyntezy białek gospodarza w wyniku infekcji wirusowej niezbędna jest zarówno fosforylacja białek komórkowego systemu syntetyzującego białko jak i białek samego wirusa mających powinowactwo do rybosomów.

Przeprowadzone w ostatnim czasie badania nad wirusami onkogennymi przyniosły bardzo interesujące dane wskazujące na udział fosforylacji i fosfokinaz białkowych w procesie transformacji komórek. Zespół Segawa (45, 46) wykazał, że w komórkach ssaków transformowanych wirusami zawierającymi RNA jak i DNA ma miejsce endogenna fosforylacja białka o ciężarze cząsteczkowym 90 000 (90 K), niezależna od cyklicznych nukleotydów. Białko to ma zdolność asocjacji z rybosomami i chromatyną gospodarza. W organellach komórek nietransformowanych brak jest takiej fosforylacji. Stwierdzono, że w przypadku transformacji wirusem SV 40 występowanie białka 90 K jest zależne od obecności genomu wirusa. Trudno jednak, przy obecnym stanie badań, ocenić jakie jest znaczenie takiej fosforylacji w przebiegu transformacji.

Więcej wiadomo na temat transformacji wywoływanej onkogennymi wirusami RNA — ASV (ang. — *Avian Sarcoma Virus*) i RSV (ang. — *Rous Sarcoma Virus*). Wirusy te indukują guzy u różnych zwierząt a także powodują transformację komórek ptasich i ssaków w hodowli. Za transformację odpowiedzialny jest wirusowy gen *src*. W lizatach komórek zarodków kurczęcia transformowanych tymi wirusami zidentyfikowano produkt genu *src* (47). Otrzymane wyniki potwierdzone w badania *in vitro*. Produkt genu *src* otrzymał nazwę pp60<sup>src</sup> co oznacza fosfoproteid (pp) o ciężarze cząsteczkowym 60 000 (60) produkt wirusowego genu *src* (48, 49, 50). Nietransformowane komórki kręgowców zawierają białko pp60<sup>src</sup> nazywane także pp60<sup>proto-src</sup>, ściśle spokrewnione z wirusowym białkiem

pp60<sup>src</sup>. Zarówno pp60<sup>src</sup> jak i pp60<sup>sarc</sup> są fosfobiałkami o ciężarze 60 000. Wirusy z częściową delecją w genie *src* mogą odzyskiwać pełny funkcjonalnie gen podczas pasażu przez zarodek kurczęcia. Mechanizm włączenia genomu gospodarza do genomu wirusa nie jest bliżej znany (51, 54, 56). Immunoprecypitaty tych białek wykazują aktywność kinazową (52, 56). Nie udało się dotychczas otrzymać oczyszczonych preparatów pp60<sup>src</sup> i pp60<sup>proto-src</sup>. Z tego względu nie dysponujemy bezpośrednim dowodem na identyczność fosfoproteidów pp60<sup>src</sup> i pp60<sup>proto-src</sup> i aktywności kinazowej. Faktem przemawiającym na korzyść tożsamości pp60<sup>src</sup> z kinazą, jest obserwacja że te mutanty ASV (ang. *temperature sensitive*) w transformacji wykazują także podwyższoną termolabilność aktywności kinazowej w porównaniu do szczepu dzikiego (53). Immunoprecypitowana z pp60<sup>src</sup> aktywność kinazowa charakteryzuje się unikalnymi właściwościami. Enzym fosforyluje użyty do precypitacji ciężki łańcuch immunoglobuliny w resztach tyrozynowych (54), a dawcą grup fosforanowych mogą być trójfosforany nukleotydów zarówno purynowych jak i pirymidynowych (ATP, GTP, UTP, CTP) (55). Fosfotyrozyna jest dominującym ufosforylowanym aminokwasem w obu białkach pp60<sup>src</sup> i pp60<sup>sarc</sup>. Transformowane komórki zawierają 8-krotnie więcej fosfotyrozyny w porównaniu z komórkami nietransformowanymi lub zakazonych mutantami z delecją w genie *src* (54). Frakcjonowanie lizatów transformowanych komórek wykazało, że aktywność kinazowa i pp60<sup>src</sup> podobnie jak pp60<sup>proto-src</sup> są zlokalizowane głównie we frakcji membran komórkowych. Rozdzielając frakcję membranową poprzez wirowanie w skokowym gradiencie sacharozy stwierdzono, że aktywność kinazowa immunoprecypitatu pp60<sup>src</sup> jak również pp60<sup>proto-src</sup> związane są z frakcją gładkich membran. Na podstawie obrazu w mikroskopie elektronowym i zawartości markerowego enzymu 5'-nukleotyduazy, membrany te zidentyfikowano jako plazmatyczne. W wiązaniu aktywności kinazowej pp60<sup>src</sup> z membraną plazmatyczną nie pośredniczy żaden kompleks białkowy (55, 56). Fosfoproteid pp60<sup>src</sup> jest integralnym białkiem membrany połączonym bezpośrednio z jej lipidami. Za wiązanie pp60<sup>src</sup> z lipidami membranowymi odpowiedzialny jest hydrofobowy fragment o ciężarze cząsteczkowym 8000 umieszczony na końcu NH<sub>2</sub>. Fragment ten może być odszczepiany w wyniku działania proteaz komórkowych lub wirusowych obecnych w lizatach komórkowych. Uzyskiwany po proteolizie pp60<sup>src</sup> ma postać polipeptydu o ciężarze cząsteczkowym 52 000 z zachowaną aktywnością kinazową i występuje we frakcji rozpuszczalnej (57). W wyniku inkubacji immunoprecypitatów pp60<sup>src</sup> z ATP i lizatami transformowanych komórek obserwowano oprócz ufosforylowanego pp60<sup>src</sup>, fosforylację innych polipeptydów o ciężarze cząsteczkowym 35 000, 23 000 i 50 000. Polipeptydy o ciężarze 23 000 i 50 000 są precypitowane przez surowice specyficzne dla pp60<sup>src</sup>, a więc są spokrewnione z tym białkiem. Polipeptyd o ciężarze 50 000 zawiera ponadto, podobnie



jak pp60<sup>src</sup>, fosfotyrozynę. Nie badano zawartości fosfotyrozyny w polipeptydzie 23 000 (54, 53). Wydaje się słuszną propozycja Hunter'a i Sefton'a (54) aby endogenny substrat dla kinazy pp60<sup>src</sup> identyczność na podstawie zawartości fosfotyrozyny.

Jest chyba zbyt wcześnie, aby wyciągnąć jednoznaczne wnioski z przedstawionych badań o roli fosforylacji białek w procesie transformacji nowotworowej komórek. Wydaje się jednak bardzo prawdopodobne, że onkogenne wirusy mogą transformować komórki poprzez nadprodukcję polipeptydu funkcjonalnie równoważnego do białka komórkowego (pp60<sup>src</sup> — pp60<sup>src</sup>) lub przez fosforylację specyficznych białek gospodarza. Białko pp60<sup>src</sup> zasocjowane z membraną plazmatyczną transformowanej komórki a więc w regionie kontaktu komórka-komórka może zakłócać hamowanie kontaktowe komórek.

#### IV. Uwagi końcowe

Poprzednie dwa lata i rok bieżący przyniosły prace, które pozwalają na stwierdzenie, że modyfikacja białek na drodze fosforylacji jest zjawiskiem uniwersalnym. Występuje ona od wirusów poprzez *Prokaryota* do *Eukaryota*. Wydaje się, że jest to powszechny mechanizm modulujący szereg zasadniczych procesów fizjologicznych. U *Eukaryota* regulacyjna rola takiej modyfikacji została już wykazana. Na podstawie wielu danych można przypuszczać, że także w przypadku prokariotycznych i wirusowych fosfokinaz białkowych taka rola jest możliwa, chociaż na obecnym etapie badań brakuje bezpośrednich dowodów.

W tabeli 1 przedstawiono sumarycznie właściwości prokariotycznych i wirusowych fosfokinaz oraz sugerowaną ich biologiczną rolę.

Trudności z przedstawieniem przekonujących dowodów na istnienie fosfokinaz białkowych u *Prokaryota* wynikały prawdopodobnie z wielu powodów. Jednym z czynników był z pewnością brak fosforylacji egzogennych substratów, rutynowo używanych przy identyfikacji kinaz eukariotycznych. Niski na ogół poziom fosforylacji w układach prokariotycznych jest chyba następnym powodem, który nie ułatwia śledzenia procesu.

Autor składa serdeczne podziękowania Panu Prof. dr Eugeniuszowi Gąsiorowi i Panu Dr Nikodemowi Grankowskiemu za przeczytanie rękopisu i cenne uwagi oraz Pani Krystynie Rusinek i Panu Mgr Ryszardowi Szyszce za pomoc techniczną podczas przygotowywania artykułu.

Zaakceptowano do druku 10.3.1981



Tabela 1.

Charakterystyka prokariotycznych i wirusowych fosfokinaz białkowych

źródło	aminokwas akceptorowy dla fosforanu	białka fosforylowane <i>in vivo</i>	dawca reszt fosforanowych	substrat <i>in vitro</i>	wpływ cyklicznych nukleotydów	sugerowana rola biologiczna	literatura
<i>Prokaryota</i>	seryna treonina	frakcja rozpuszczalna, rybosomy, NADP-specyficzna dehydrogenaza izocytrynianowa	ATP GTP pirofosforan	rybosomy, białka rozpuszczalne, brak fosforylacji egzogennych substratów	niezależne od cAMP	Regulacja aktywności NADP-specyficznej dehydrogenazy izocytrynianowej	11, 12, 13, 16, 17, 18.
Bakteriofagi	seryna treonina	$\beta$ . i $\beta'$ podjednostki DNA zależnej RNA polimerazy <i>E. coli</i> , białka rybosomowe, białka frakcji rozpuszczalnej	ATP	lizozym, histony, protamina, cytochrom $c$ , rybosomy IF-3	niezależne od cyklicznych nukleotydów	1. Modyfikacja translacji w zakazonych komórkach, 2. Wyłączenie syntezy RNA gospodarza	21, 22, 23, 24, 25, 31, 32.
wirusy zwierzęce	seryna treonina	białka rybosomowe S2, S6, S16, białko wirusa ospy VP IIb	ATP	kazeina, fosfityna, histony, protamina, białko 90K	niezależne od cyklicznych nukleotydów	Wyłączenie syntezy białka gospodarza	34, 35, 36, 37, 42, 47, 44, 45, 46.
wirusy onkogenne	tyrozyna	pp60 <sup>src</sup> pp60 <sup>src</sup>	ATP GTP UTP CTP	ciężki łańcuch immunoglobuliny 50K, 23K, 35K	niezależne od cyklicznych nukleotydów.	Udział w transformacji nowotworowej komórek	53, 54, 55, 56, 57.

## PIŚMIENICTWO

1. Walsh D. A., Krebs E. G. (1973) w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 8, str. 555—581, Academic Press, New York, London.
2. Traugh J. A., Ashby C. D., Walsh D. A. (1974) w: *Methods in Enzymology*, red. Hardman J. G., O'Malley B. W., t. 37, str. 290—299. Academic Press, New York, San Francisco, London.
3. Krebs E. G., Beavo J. A. (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 923—959.
4. Grankowski N. (1980), *Post. Bioch.* (w druku).
5. Kłyszajko-Stefanowicz L. (1979) *Post. Bioch.*, **25**, 287—330.
6. Famulski K. S. (1977) *Post. Bioch.*, **23**, 379—398.
7. Rubin C. S., Rosen O. M. (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 831—887.
8. Kuo J. F., Greengard P. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3417—3419.
9. Khandelwal R. L., Spearman T. N., Hamilton I. R. (1973) *FEBS Lett.*, **31**, 246—250.
10. Gordon J. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 579—586.
11. Kurek E., Grankowski N., Gąsior E. (1972) *Acta Microb. Polon.*, **4** (21), 171—176.
12. Kurek E., Grankowski N., Gąsior E. (1972) *Acta Microbiol. Polon.* **4** (21), 177—183.
13. Manai M., Cozzzone A. J. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 819—826.
14. Wittmann H. G. (1974) w: *Ribosomes* red. Nomura M., Tissieres A., Lengyel P., str. 93—115, Cold Spring Harbor Laboratory, Monograph Series.
15. Subramanian A. R., Wittmann-Liebold B., Geissler A. W., Stöffler G., Giesen M. (1979), *FEBS Lett.*, **99**, 357—360.
16. Wang J. Y. J., Koshland D. E. (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7605—7608.
17. Garnak M., Reeves H. C. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 7915—7920.
18. Garnak M., Reeves H. C. (1979), *Science* **203**, 1111—1112.
19. Bennett P. M., Holms W. H. (1975), *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 37—51.
20. Spudich J. L., Stoeckenius W. (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5501—5503.
21. Pai S. H., Ponta H., Rahmsdorf H. J., Hirsch-Kauffmann M., Herrlich P., Schweiger M., (1975) *Eur. J. Biochem.*, **55**, 299—304.
22. Pai S. H., Rahmsdorf H. J., Ponta H., Hirsch-Kauffmann M., Herrlich P., Schweiger M. (1975) *Eur. J. Biochem.*, **55**, 305—314.
23. Ponta H., Rahmsdorf H. J., Pai S. H., Hirsch-Kauffmann M., Herrlich P., Schweiger M. (1974) *Mol. Gen. Genet.*, **134**, 281—287.
24. Zillig W., Fujiki H., Blum W., Janekowic D., Schweiger M., Rahmsdorf H. J., Ponta H., Hirsch-Kauffmann M. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2506—2510.
25. Rahmsdorf H. J., Pai S. H., Ponta H., Herrlich P., Roskoski R., Schweiger M., Studier F. W. (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 586—589.
26. Simon M. N., Studier F. W. (1973) *J. Mol. Biol.*, **79**, 249—265.
27. Siegel R. B., Summers W. C. (1970) *J. Mol. Biol.*, **49**, 115—123.
28. Skare J., Niles E. G., Summers W. C. (1974) *Biochemistry*, **13**, 3912—3916.
29. Studier F. W. (1975) *J. Mol. Biol.*, **94**, 283—295.
30. Rabussay D., Geiduschek E. P. (1977) w: *Comprehensive Virology*, red. Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R., t. 8, str. 27—43, Plenum Press. New York, London.
31. Rahmsdorf H. J., Herrlich P., Pai S. H., Schweiger M., Wittmann H. G., (1973) *Mol. Gen. Genet.*, **127**, 259—271.

32. Ewald R., Gualerzi C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1517—1524.
33. Niles E. G., Conlon W., Summers W. C. (1974), *Biochemistry* **13**, 3904—3912.
34. Kleimman J. H., Moss D. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 2420—2429.
35. Silberstein H., August J. T. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 3176—3184.
36. Rosnitschek I., Traub M., Traub P. (1978) *Z. Physiol., Chem.*, **359**, 593—600.
37. Kaerlein M., Horak I. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **90**, 463—469.
38. Gressner A. M., Wool I. G. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 6917—6925.
39. Gressner A. M., Wool I. G. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1482—1490.
40. Traugh J. A. (1980) w: FMI-EMBO Workshop on Protein Phosphorylation and Bioregulation, red. Gordon J., Thomas G., Karger Basel, Switzerland.
41. Sherton C. C., Wool I. G. (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4460—4467.
42. Person A., Beaud G. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **103**, 85—93.
43. Sagot J., Beaud G. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **98**, 131—140.
44. Ben-Hamida F., Beaud G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 175—179.
45. Segawa K., Yamaguchi N. Oda K. (1977), *J. Virol.* **22**, 679—693.
46. Segawa K., Oda K., Yuasa Y., Shiroki K., Shimojo H. (1978) *J. Virol.*, **27**, 800—808.
47. Hanafusa H. (1977) w: Comprehensive Virology, red. Fraenkel-Conrat H., Wagner R. R., t. 5, str. 401—483, Plenum New York.
48. Purchio A. F., Erikson E., Brugge J., Erikson R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1567—1571.
49. Collett M. S., Erikson R. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2021—2025.
50. Brugge J. S., Erikson R. L. (1977) *Nature* **269**, 346—348.
51. Wang L. H., Halpern C. C., Nadel M., Hanafuse H., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5812—5816.
52. Collett M. S., Erikson E., Purchio A. F., Brugge J. S., Erikson R. L. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3159—3163.
53. Owada M., Moelling K. (1980), *Virology* **101**, 157—168.
54. Hunter T., Sefton B. M. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311—1315.
55. Krueger J. G., Wang E., Goldberg A. R. (1980), *Virology*, **101**, 25—40.
56. Courtneidge S. A., Levinson A. D., Bishop J. M. (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3783—3787.
57. Krueger J. G., Wang E., Garber E. A., Goldberg A. R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 4142—4146.



## KOMUNIKAT

**VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej  
odbędzie się w Krakowie w dniach 16—18 września 1983 r.**

### **Temat Zjazdu:**

„Diagnostyka laboratoryjna w rozpoznawaniu, leczeniu i zapobieganiu metabolicznych chorób cywilizacyjnych (miażdżyca i jej następstwa oraz powikłania, hiperlipoproteidemia, cukrzyca, otyłość, dna)”.

W ramach tego tematu wstępnie przewiduje się wykłady plenarne, konferencje okrągłego stołu oraz w miarę możliwości sympozja i pokazy.

W związku z trudną sytuacją ekonomiczną organizacja i oprawa Zjazdu oraz przebieg obrad i imprez towarzyszących będą miały skromny charakter, dostosowany do aktualnych możliwości. Koszta Zjazdu pokryte zostaną z wpisowego Uczestników.

Organizatorzy zapewnią Uczestnikom i Osobom towarzyszącym zakwaterowanie (wybór wg kolejności zgłoszeń) i w miarę możliwości posiłki. Organizacja imprez towarzyszących zależna będzie od liczby zgłoszeń.

Ceny zakwaterowania za jedną osobę aktualnie kształtują się następująco:

Hotele: pokój jednoosobowy 500—700 zł, pokój dwuosobowy 800—1200 zł,  
pokój trzyosobowy 1600—1800 zł.

Dom akademicki: pokój dwuosobowy 300 zł.

Warunkiem udziału w Zjeździe jest zgłoszenie uczestnictwa i wniesienie opłaty zjazdowej. Opłata zjazdowa wniesiona do 31 stycznia 1982 wynosi 900 zł a po tym terminie 1200 zł.

Sposób zgłoszenia pracy, uczestnictwa oraz wniesienia opłaty zjazdowej i zamówienie zakwaterowania podany zostanie w następnym komunikacie.

Wszelkich informacji dotyczących Zjazdu udziela Komitet Organizacyjny: Katedra Diagnostyki Biochemicznej i Klinika Chorób Metabolicznych, 31-501 Kraków, ul. Kopernika 15, telefony: 11-33-12, 11-13-84.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego  
Prof. dr hab. Jan Sznajd

KRYSTYNA WANDA KASMAN \*

## Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kręgowców

### Structure, Protein Composition and Function of M-line of the Vertebrate Skeletal Muscle.

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie — położenie linii M w sarkómerze
- II. Modele linii M
  - II-1. Model Pepe
  - II-2. Model Knappeisa i Carlsena
  - II-3. Model Luthera i Squire'a
- III. Skład białkowy linii M
- IV. Własności biochemiczne białek linii M
  - IV-1. Wzajemna interakcja składników linii M oraz zdolność do tworzenia kompleksów z miozyną i jej fragmentami
  - IV-2. Własności kompleksu białek linii M z miozyną pozbawioną obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub>

#### Contents

- I. Introduction — site of M-line in the sarcomer
- II. Models of the M-line
  - II-1. Pepe's model
  - II-2. Knappeis and Carlsen's model
  - II-3. Luther's and Squire's model
- III. Protein composition of the M-line
- IV. Biochemical properties of the M-line
  - IV-1. Interaction between M-line components and their ability to form complexes with myosin and or its fragments
  - IV-2. Properties of the complex formed from the M-line proteins and myosin devoided of both LC<sub>2</sub> light chains.

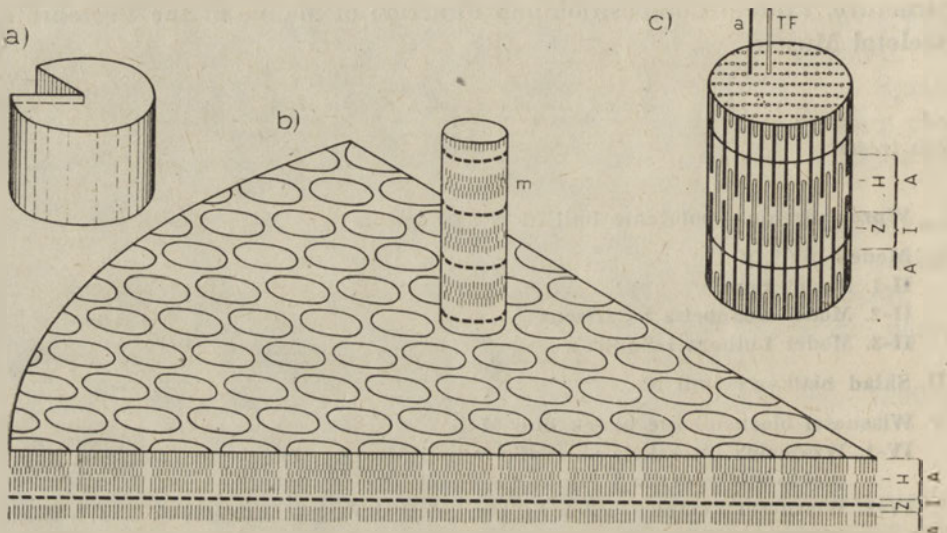
---

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

## I. Wprowadzenie — położenie linii M w sarkomerze

Zastosowanie mikroskopii elektronowej umożliwiło dokładniejsze poznanie ultrastrukturalnej organizacji aparatu kurczliwego komórki mięśniowej.

Podstawowym elementem kurczliwym mięśnia szkieletowego jest miofibryla (Ryc. 1), której obraz uzyskany w mikroskopie polaryzacyjnym ukazuje charakterystyczne poprzeczne prążkowanie, czyli występowanie na przemian jaśniejszych prążków izotropowych (prążki I) i ciemniejszych anizotropowych (prążki A). Prążek I stanowi wiązka równoległe



**Ryc. 1.** Przekrój przez włókno mięśnia prążkowanego (według Hayashi T., 1962, *Sci. Americ.*, 3, 184—204). Schemat przedstawia miofibryle i miofilamenty, które układają się w charakterystyczne prążki.

A — włókno mięśniowe, z którego wycięto fragment, B — wycięty fragment w powiększeniu, C — powiększona miofibryla, m — miofibryla, Z — Linia Z, I — prążek I, A — prążek A, H — prążek Hensena, TF — filament miozynowy, a — filament aktynowy

ułożonych filamentów aktynowych, prążek A zbudowany jest z leżących równoległe do długiej osi włókna mięśniowego filamentów miozynowych. Wzajemna interakcja obu typów filamentów jest podstawą skurczu mięśnia. W połowie prążki I przecina optycznie gęste pasmo tzw. linia Z. Jednostka strukturalna zawarta pomiędzy dwiema liniami Z nazwana została sarkomerem.

Przez środek sarkomeru, a więc i przez centralny rejon każdego grubego filamentu przechodzi elektronowo gęstsze pasmo, szerokości 750 Å do 860 Å (1, 2), tak zwana linia M. Na podstawie obrazów uzyskanych w mikroskopie elektronowym przyjmuje się, iż filament miozynowy w swej środkowej strefie nie zawiera główek miozynowych (budowa



filamentów miozynowych oraz linii M była już przedmiotem artykułu zamieszczonego na łamach Postępów Biochemii (3).

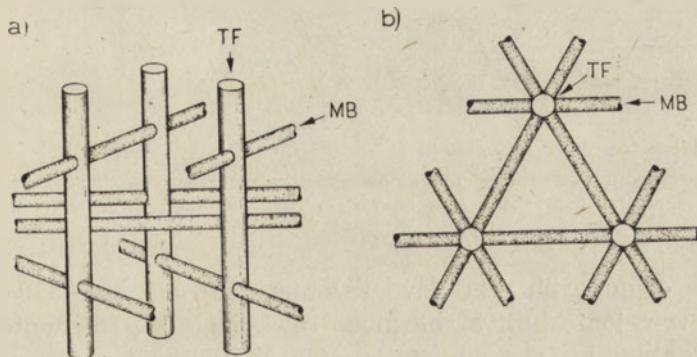
Elektronogramy podłużnych przekrojów mięśni szkieletowych wykazują, że pasmo linii M składa się z szeregu oddzielnych prążków (Ryc. 2). Zastosowanie krioultramikrotomii i powiększeń w mikroskopie elektronowym powyżej  $100\,000\times$  pozwoliło zaobserwować, że ilość pasm linii M i ich grubość jest różna i że zależy od typu włókna mięśniowego (4-7), a także od gatunku zwierzęcia (8). Przekroje poprzeczne przez pasmo linii M (Ryc. 3) ujawniły, iż prążki widoczne na podłużnych przekrojach miofibryli odchodzą promieniście od każdego grubego filamentu tworząc usieciowanie z sześcioma sąsiadującymi filamentami miozynowymi (Ryc. 3) (1, 2, 9-11).

Podczas skurczu odległość między filamentami wzrasta i wówczas konieczna jest elastyczna struktura, dzięki której wzajemny układ filamentów pozostaje bez zmian. Z badań morfologicznych wynika, że rolę tę pełni układ zwany linią M.

## II. Modele linii M

### II-1. Model Pepe

Analiza obrazów elektronomikroskopowych poprzecznych i podłużnych przekrojów włókien mięśniowych doprowadziła do zaproponowania pierwszego modelu linii M (Ryc. 4), którego autorem jest Pepe (2, 12, 13). Jest to najprostszy z zaproponowanych modeli. Zakłada on bowiem istnienie tylko jednego rodzaju elementów strukturalnych, jakimi są mostki poprzeczne linii M, wiążące każdy miozynowy filament z sześcioma sąsiednimi grubymi filamentami. Jak należy wnioskować



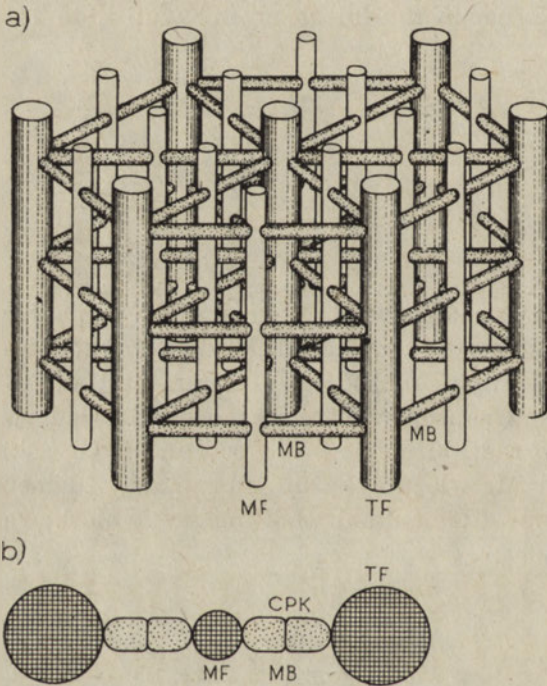
Ryc. 4. Model Pepe

a) Schemat przekroju podłużnego, b) Schemat przekroju poprzecznego, TF — filamenty miozynowe, MB — mostki poprzeczne linii M.

z położenia prążków linii M widocznych na przekrojach podłużnych, leżą one na różnych poziomach środkowej strefy grubego filamentu. Kierunek mostków na kolejnych poziomach ulega przesunięciu o  $60^\circ$ . Maksymalna ilość tych poziomów wynosi 5 a odległość między nimi równa jest 200—220 Å.

## II-2. Model Knappeisa i Carlsena

Do układu zaproponowanego przez Pepe, Knappeis i Carlsen (1) dodali nowy składnik — tzw. filament linii M (Ryc. 5). Element ten widać na zdjęciach mikroskopowo-elektronowych zarówno poprzecznych jak i podłużnych przekrojów włókien mięśniowych. Na przekrojach



Ryc. 5. Model Knappeisa i Carlsena

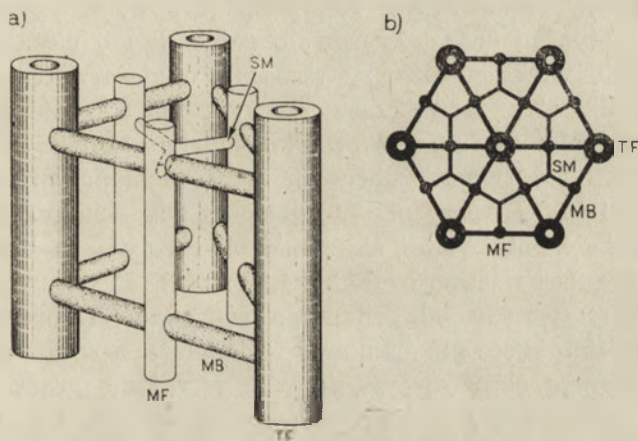
a) Schemat przekroju podłużnego, b) Budowa mostka poprzecznego, TF — filamenty miozynowe, MB — mostki poprzeczne linii M, MF — filamenty linii M, CPK — kinaza kreatynowa

podłużnych oglądanych przy powiększeniach  $150\,000\times$  —  $220\,000\times$  widoczne są w rejonie linii M biegnące równoległe do filamentów miozynowych cienkie, bo o średnicy 50—60 Å, filamenty. Na przekrojach poprzecznych dokonanych przez pasmo linii M widoczne są okrągłe zgrubienia w samym środku mostków poprzecznych. Ich średnica wyno-

si 50—60 Å. Zastosowane w tym przypadku powiększenia były rzędu 250 000—500 000 ×.

### II-3. Model Luthera i Squire'a

Wprowadzenie do badań techniki otrzymywania bardzo cienkich skrawków, których grubość wynosi około 200 Å, a więc nie przekracza wymiaru odległości, w jakiej znajdują się dwa kolejne poziomy mostków poprzecznych linii M, umożliwiło Lutherowi i Squire'owi (4, 14) zauważenie nowego elementu linii M tzw. mostków poprzecznych drugiego rzędu (*secondary M-bridges*) (Ryc. 6). Mostki te są strukturami o kształcie drukowanej litery Y, spinające w takim właśnie układzie



Ryc. 6. Model Luthera i Squire'a

a) Schemat przekroju podłużnego, b) Schemat przekroju poprzecznego, TF — filamenty miozynowe, MB — mostki poprzeczne linii M, MF — filamenty linii M, SM — mostki poprzeczne drugorzędowe

trzy filamenty linii M. Ponadto badacze ci zauważyli w centrum szkieletu każdego filamentu miozynowego wgłębienie o kształcie mniej lub bardziej cylindrycznym i średnicy około 30—50 Å (Ryc. 6).

I to jest prawie wszystko, co wiadomo na temat morfologii układu zwanego linią M.

### III. Skład białkowy linii M

Znacznie trudniejsza jest interpretacja wyników badań nad składem białkowym omawianego systemu. Zastosowanie znakowanych przeciwciał (15) wykazało, że w skład białek linii M nie wchodzi ani miozyna ani też żadne ze znanych białek filamentu aktynowego.



Izolowanie białek linii M może odbywać się dwojako, albo przez zastosowanie roztworów o wysokiej sile jonowej — wówczas rozpuszczeniu ulega cały prążek A, bądź na drodze ekstrakcji roztworem o niskiej sile jonowej (5 mM bufor tris o pH 8), która, jak wykazały badania Samosudowej (16), powoduje całkowity zanik prążków linii M (mikroskopia elektronowa).

Pierwszą metodę stosowali Masaki i Takaiti (8, 17, 18). Ekstrahowali oni mianowicie miofibryle mięśni szkieletowych roztworem Hasselbacha — Schneidera (0,6 M KCl, 0,1 M bufor fosforanowy pH 6,4, 10 mM pirofosforan sodu i 1 mM MgCl<sub>2</sub>) i wysalali białka linii M siarczanem amonu w nasyceniu 16% przy pH 8,3. Uzyskali tą metodą dwa peptydowe składniki: Składnik I i Składnik II.

Stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS oznaczono ciężary cząsteczkowe obu polipeptydów. Mniejszą ruchliwością elektroforetyczną charakteryzowało się białko o ciężarze cząsteczkowym 165 000, większą — lżejszy składnik o ciężarze cząsteczkowym 94 000. Składnik o ciężarze cząsteczkowym 165 000 autorzy nazwali „prawdziwym białkiem linii M”. Białko to charakteryzowało się dość znacznym powinowactwem wobec miozyny (badania przeprowadzono w roztworze 0,1 M KCl przy pH 7,0), podczas gdy składnik II (w takich samych warunkach) nie wiązał się z miozyną. To drugie białko okazało się glikogenową fosforylazą b (EC 2.4.1.1) (19). Zastosowanie metody immunologicznej (przeciwciała znaczone związkami fluorescencyjnymi) pozwoliło znaleźć miejsce glikogenowej fosforylazy b w aparacie kurczliwym. Fluorescencję obserwowano głównie w rejonie prążka I, ale obserwowano również świecenie w rejonie linii M (19, 20). Dlatego też autorzy trzeciego omawianego tu modelu budowy linii M sugerują, iż być może mostki drugiego rzędu zbudowane są z białka będącego glikogenową fosforylazą b (4).

W wyniku ekstrakcji miofibryli mięśni piersiowych kurczaków roztworami o niskiej sile jonowej, Eaton i Pepe (21) uzyskali również dwa składniki, pierwszy o ciężarze cząsteczkowym 43 000, drugi — 100 000. Białko o ciężarze cząsteczkowym 100 000 miało własności glikogenowej fosforylazy b (19). Natomiast drugi, lżejszy składnik, niemal równocześnie wykryty przez Morimoto i Harringtona (22) występował w formie dimeru o ciężarze cząsteczkowym 88 000. Obie podjednostki łączy wiązanie niekowalecyjne. Białko to ma bardzo duże powinowactwo zarówno do monomerów miozyny (23) jak i do miozynowych filamentów (22). Szczegółowa charakterystyka białka pozwoliła ustalić, że jest to kinaza kreatynowa (EC 2.7.3.2). Zastosowanie metody pośredniej fluorescencji ze znakowanymi przeciwciałami (24) doprowadziło do wykrycia położenia tego białka w rejonie prążka A i znalezienia miejsca wiązania z filamentami miozynowymi. Zbadano ruchliwość elektroforetyczną białka, zanalizowano jego kształt i wymiary, a także ustalono

Białka izolowane przez różnych autorów podczas ekstrakcji białek linii M z miofibryli

Tabela I.

Ciężar cząsteczkowy	Właściwości	Pismienictwo
ok. 170 000	Białko agreguje w roztworach o niskiej sile jonowej. Wchodzi w interakcję z subfragmentem S-2 cząsteczki miozyny (czyli najbardziej elastycznym rejonem cząsteczki miozyny), łączy się również z polipeptydem o ciężarze cząsteczkowym 88 000 hamując jego aktywność.	2, 28, 29
ok. 100 000	Przypuszcza się, iż jest to glikogenowa fosforylaza b	19, 20
ok. 88 000	Kinaza kreatynowa (katalizująca reakcję Lehmana) białko jest dimerem o c.c.z. podjednostki 44 000	22—27
ok. 38 000	?	30
ok. 20 000	?	30—33

ilość podjednostek i ich skład aminokwasowy (24-27). I w ten sposób model Knappeisa i Carlse na został udoskonolony, gdyż przyjęto, że mostek poprzeczny linii M zbudowany jest z kinazy kreatynowej (24) (Ryc. 5b).

Białko o ciężarze cząsteczkowym 165 000 (8) zostało również bardzo dokładnie opisane (28, 29). Obecnie wiadomo, że ma ono nieco większy ciężar cząsteczkowy, bo 170 000 i przypuszcza się, iż jest materiałem, z którego zbudowane są filamenty linii M. Dodatkową przesłanką dla takiej hipotezy jest zdolność tego białka do agregacji w filamenty (8).

Stosując roztwór o niskiej sile jonowej (5 mM bufor tris o pH 8) używa się tzw. „surowy” ekstrakt białek linii M (30-33). Analiza elektroforetyczna „surowych” ekstraktów wskazuje na obecność jeszcze dodatkowych lżejszych, polipeptydowych składników o ciężarach cząsteczkowych około 38 000 i 20 000-22 000 (Ryc. 7, Tabela 1). Dodanie tego ekstraktu do miofibryli, z których wyizolowano omawiane białka, pozwala na rekonstrukcję prążka M, co zostało stwierdzone przy użyciu mikroskopu elektronowego (34). Warunkiem koniecznym rekonstrukcji jest obecność wszystkich białek „surowego” ekstraktu (30).

Dodanie takiego ekstraktu do roztworu miozyny zarówno monomerycznej\* jak i będącej już w formie syntetycznych filamentów (3) powoduje powstanie wiązek równoległe względem siebie ułożonych filamentów miozynowych (31-33, 35) (Ryc. 8).

#### IV. Własności biochemiczne białek linii M

##### IV-1. Własności enzymatyczne, wzajemna interakcja składników linii M oraz zdolność do tworzenia kompleksów z miozyną i jej fragmentami

Obecność takich białek jak kinaza kreatynowa i glikogenowa fosforylaza b w aparacie linii M sugeruje, iż oprócz funkcji strukturalnych układ ten jest zdolny do regulacji poziomu ATP i glikogenu w czasie skurczu.

Z szeregu badań przeprowadzonych nad układem dwuenzymatycznym, w skład którego wchodziły kinaza kreatynowa i miozyna (36-38) wynikało, iż reakcje katalizowane przez oba enzymy są ujemnie sprzężone. Obecność kinazy hamuje aktywność ATPazy miozynowej oznaczanej w obecności jonów  $Ca^{2+}$  zarówno w środowisku o niskiej (0,1 M roztwór KCl) jak i wysokiej (0,5 M roztwór KCl) sile jonowej. Ponieważ jony magnezu aktywują kinazę kreatynową a hamują ATPazę miozynową i są endogennie związane z kinazą, być może, iż łączą się one wy-

\* Po obniżeniu siły jonowej roztworu z miozyny monomerycznej powstają filamenty miozynowe.



biórczo z miozyną i w ten sposób powodują inhibicję miozynowej ATPazy (38). Jest to zjawisko o tyle interesujące, że charakterystyka własności kinazy kreatynowej uzyskanej z ekstraktów linii M i jej interakcja z miozyną i fragmentami miozyny\*\* (39, 40) świadczą, iż maksimum inhibicji ATPazy miozynowej oznaczanej w obecności jonów  $Ca^{2+}$  następuje wówczas, gdy w roztworze są nienaruszone cząsteczki miozyny. Słabszy efekt hamowania zaobserwowano w przypadku H-meromiozyny, a najslabszy w przypadku subfragmentów S-1. Tak więc najsilniejsza interakcja obu białek następuje wówczas, gdy mamy do czynienia z całą nienaruszoną cząsteczką miozyny. Wyniki tych badań potwierdzono przy zastosowaniu różnych metod, jak oznaczenie widm dichroizmu kołowego (39), pomiar elektronowego rezonansu paramagnetycznego i za pomocą techniki nanosekundowej depolaryzacji fluorescencji (41).

Z drugiej strony, badając zachowanie się kompleksu: kinaza kreatynowa-białko o ciężarze cząsteczkowym 170 000 stwierdzono, iż białko to hamuje kompetytywnie aktywność kinazy kreatynowej, a widma dichroizmu kołowego oraz wyniki uzyskane z wirowania analitycznego obu białek świadczą o tym, że białka te tworzą kompleks (42). Wiadomo również, że miejscem kontaktu tzw. prawdziwego białka linii M z cząsteczką miozyny jest rejon tzw. subfragmentu S-2\*\* (43). Jest to obszar cząsteczki miozyny, w którym znajduje się elastyczny zawias (*hinge*) pozwalający globularnym wypustkom miozynowym (tzw. główkom lub subfragmentom S-1) na odsunięcie się od trzonu cząsteczki i tworzenie mostków poprzecznych (*cross-bridges*) z filamentem aktynowym — reakcja ta jest podstawą skurczu mięśnia (44—46).

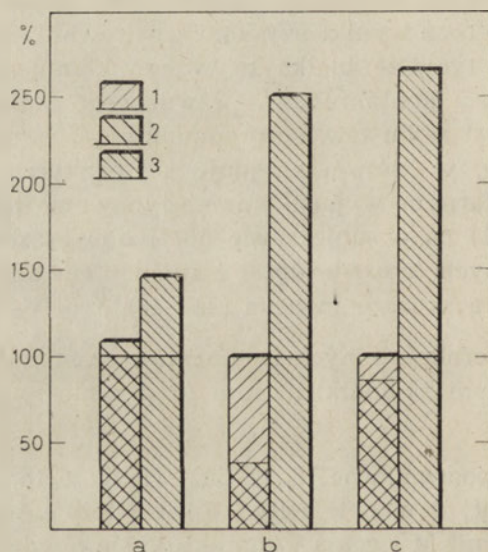
Badania nad interakcją innych fragmentów cząsteczki miozyny z tym wysokocząsteczkowym składnikiem linii M przyniosły wyniki negatywne (43).

Tak więc, aby podsumować to, co już wiemy o topografii białek linii M trzeba przyjąć, iż modele z Ryc. 5 i 6 należy interpretować następująco: filanty linii M sięgają i kontaktują się obydwooma swymi końcami z rejonami subfragmentów S-2 cząsteczek miozynowych z dwóch poziomów grubych filamentów, przenikając przez środki mostków poprzecznych linii M (Ryc. 5b). Mostki poprzeczne linii M łączą ze sobą cząsteczki miozynowe dwóch sąsiednich filamentów też gdzieś blisko połączenia subfragmentów S-1 i S-2; świadczy o tym wpływ kinazy kreatynowej na ATPazę miozynową. Pozornie przeczy temu inny fakt, a mianowicie to, że powinowactwo kinazy jest większe wobec miozyny niż wobec jej krótszego fragmentu H-meromiozyny.

\*\* O budowie cząsteczki miozyny i o jej fragmentacji pisano na łamach Postępów Biochemii (3).

#### IV-2. Własności kompleksu białek linii M z miozyną pozbawioną obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub>.

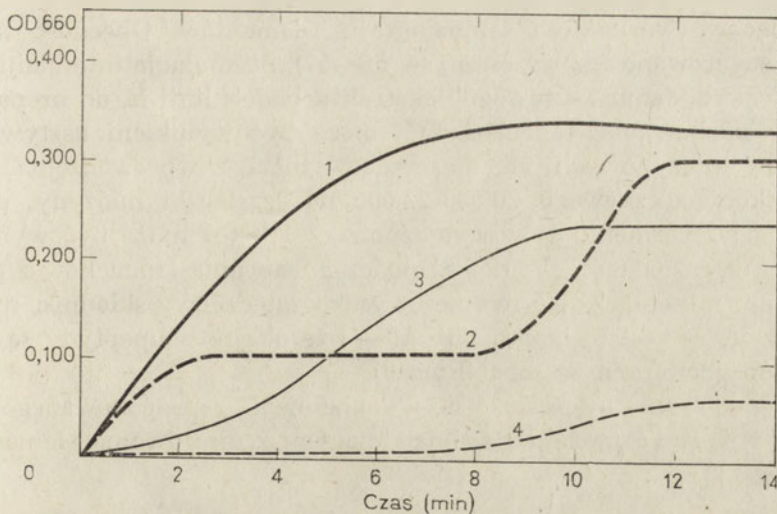
Zaobserwowaną różnicę między powinowactwem kinazy kreatynowej do miozyny i do H-meromiozyny można wytłumaczyć na podstawie innego oddziaływania „surowego” ekstraktu białek linii M (31—33) na preparaty miozynowe charakteryzujące się różną ilością lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub> (47—50) (Ryc. 9) (łańcuchy te, jak się obecnie przypuszcza, znajdują się w rejonie zawiasu subfragment S-1 / subfragment S-2). Jak wykazano, aktywność ATPazy miozynowej aktywowanej jonami Ca<sup>2+</sup> ulega obniżeniu w obecności „surowego” ekstraktu białek linii M w przypadku miozyny natywnej. Jest natomiast silnie stymulowana przez „surowy” ekstrakt białek linii M wówczas, gdy mamy do czynienia z preparatem miozyny pozbawionej obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub> (Ryc. 10). Taki sam efekt stymulacji uzyskano badając wpływ „surowego” eks-



**Ryc. 10.** Wpływ białek linii M na własności enzymatyczne miozyny natywnej i pozbawionej obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub>. Wartości aktywności ATPazy podano w procentach wartości aktywności ATPazy preparatów miozynowych przed dodaniem białek linii M. Słupki zakreskowane w/g wzoru 1 obrazują aktywność ATPazy miozyny natywnej. Aktywność ATPazy miozyny natywnej oraz miozyny pozbawionej obu łańcuchów LC<sub>2</sub> po dodaniu do preparatów miozyny „surowego” ekstraktu białek linii M obrazują słupki zakreskowane odpowiednio w/g wzorów 2 oraz 3.

a — ATPaza miozynowa stymulowana jonami K<sup>+</sup>, b — ATPaza miozynowa stymulowana jonami Ca<sup>2+</sup>, c — ATPaza aktomiozynowa stymulowana jonami Mg<sup>2+</sup>

traktu białek linii M na interakcję różnych preparatów miozyny z aktywną (Ryc. 10, 11). Mamy więc przesłanki do zastanowienia się, czy kinaza kreatynowa nie łączy się z miozyną tylko wówczas, gdy miozyna jest



**Ryc. 11.** Wpływ „surowego” ekstraktu białek linii M na superprecypitację żeli aktomiozynowych utworzonych z aktyny i miozyny natywnej oraz aktyny i miozyny pozbawionej obu łańcuchów LC<sub>2</sub>. Krzywe przedstawiają zmianę zmętnienia żelu aktomiozynowego po dodaniu ATP. Kompleksy aktomiozynowe utworzone z aktyny i miozyny natywnej (2), miozyny pozbawionej obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub> (4), miozyny natywnej z dodanym „surowym” ekstraktem białek linii M (1), miozyny pozbawionej obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub> z dodanym „surowym” ekstraktem białek linii M (3).

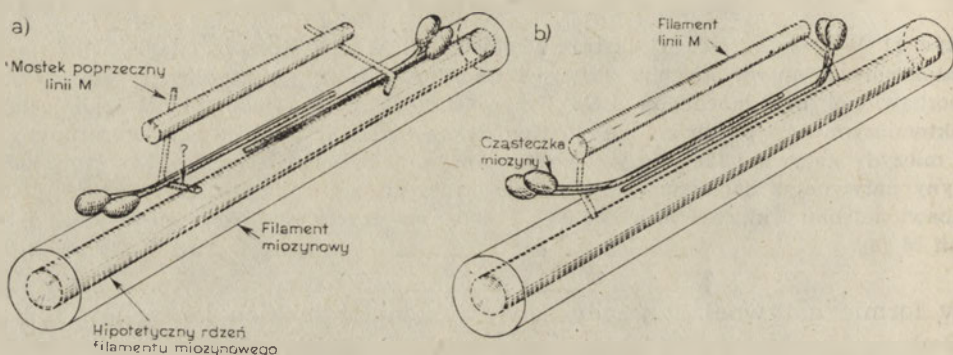
w formie natywnej, tzn. gdy zawiera komplet lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub>. Podczas otrzymywania H-meromiozyny łańcuch ten bywa często nadtrawiony bądź strawiony całkowicie. Innymi słowy, wydaje się, że łańcuchy LC<sub>2</sub> gwarantują sprawny mechanizm elastycznego ruchu główki cząsteczki miozyny. Utrata łańcuchów wydaje się powodować utratę tej elastyczności i zmianę ułożenia miozynowych główek (31, 50).

Poruszę jeszcze jeden aspekt tej sprawy. Otóż ostatnio dzięki zastosowaniu udoskonalonych metod immunologicznych pojawiają się prace z różnych laboratoriów donoszące o wykryciu w coraz to innych tkankach niewidocznej morfologicznie linii M (51, 52). Obecność białek linii M w mięśniu pobranym w dwunastym dniu miogenezy wykazano posługując się metodami immunofluorescencyjnymi (53, 54). Autorzy powyższych badań sugerują, że białka linii M mogą pełnić rolę w montowaniu grubych filamentów i stabilizować miofibrylarną strukturę podczas rozwoju. Poparciem tej tezy są wyniki badań uzyskane w naszej pracowni (31—33). Jeżeli do preparatów miozyny pozbawionej obu łańcuchów LC<sub>2</sub> dodać „surowy” ekstrakt białek linii M, to po obniżeniu siły jonowej roztworu uzyskuje się agregaty miozynowe skupione wokół niewidocznego walca (Ryc. 12 — porównaj z agregatami uzyskanymi z samej miozyny pozbawionej obu łańcuchów LC<sub>2</sub>). Być może któryś ze składników „surowego” ekstraktu białek linii M stanowi rdzeń grubego filamentu,



rdzeń będący warunkiem samomontażu filamentów. Obecność takiego rdzenia sugerowano już wcześniej (4, 55—57). Stymulacja interakcji aktomiozyny po dodaniu „surowego” ekstraktu białek linii M do preparatów miozyny pozbawionej łańcucha  $LC_2$  może być wynikiem usztywnienia agregatów miozynowych, ale może też wynikać z wprowadzenia składnika niskocząsteczkowego 20 000–22 000 do cząsteczki miozyny, co powoduje uelastycznienie główki miozynowej lub też może być wynikiem obu tych ewentualności. Ponieważ podczas usuwania łańcuchów z preparatów miozyny odłącza się również wysokocząsteczkowy składnik, nie jest wykluczone, że jest to białko linii M — i że oba te polipeptydy są w jakiś sposób powiązane ze sobą (Ryc. 9).

Tak więc można by pokusić się o uzupełnienie zaproponowanego przez Luthera i Squire'a modelu współdziałającymi z nim dwoma elementami,



**Ryc. 13.** Proponowany model struktury linii M. Pozbawione obu lekkich łańcuchów  $LC_2$  cząsteczki miozyny tracą swą elastyczność, co znajduje odbicie w utrudnionej interakcji aktyny z miozyną (a); przywrócenie prawidłowej interakcji należałoby tłumaczyć usztywnieniem główek miozynowych (b). Usztywnienie to nastąpiło po połączeniu „surowego” ekstraktu białek linii M z miozyną pozbawioną obu lekkich łańcuchów  $LC_2$ .

a mianowicie hipotetycznym rdzeniem filamentu miozynowego i lekkim łańcuchem  $LC_2$  (Ryc. 13). Przyjmując założenie, że istnieje rdzeń filamentu miozynowego, współdziałanie pomiędzy składnikami białek linii M a tym rdzeniem byłoby możliwe poprzez lekkie łańcuchy  $LC_2$  miozyny, tak jak to przedstawiono na Ryc. 13.

Zaakceptowano do druku 30.3.1981

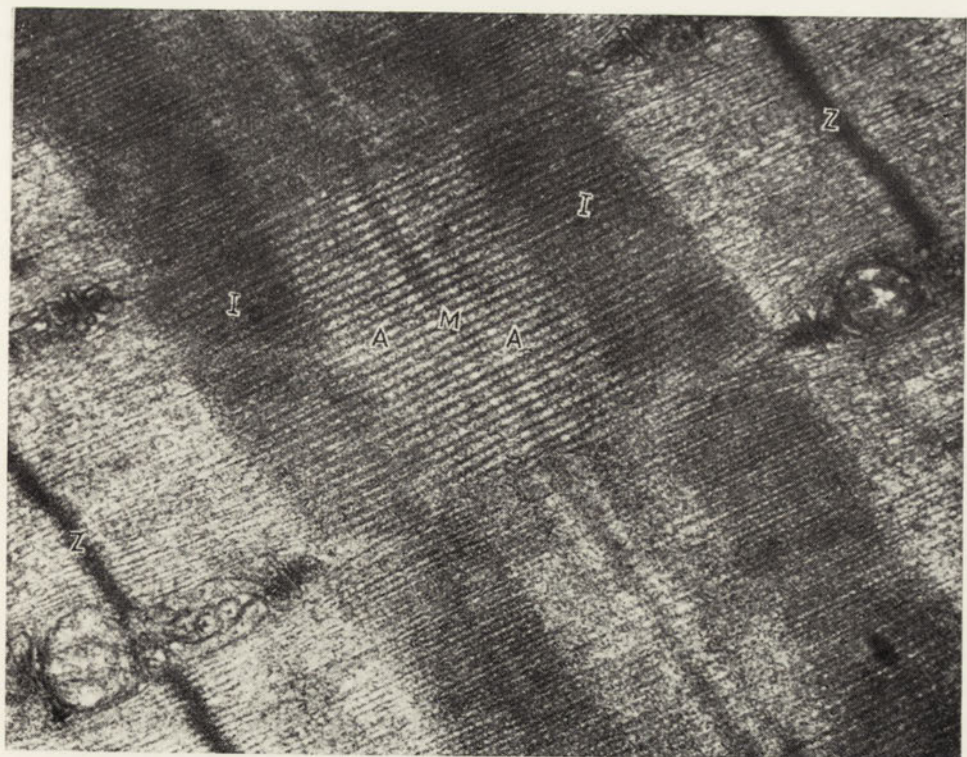
Wyrażam szczerą podziękowanie Pani doc. dr hab. Irenie Kąkol za cenne rady i uwagi natury merytorycznej oraz Pani dr Annie Jakubiec-Puka za udostępnienie mi dwóch zdjęć elektronowomikroskopowych.

## PIŚMIENNICTWO

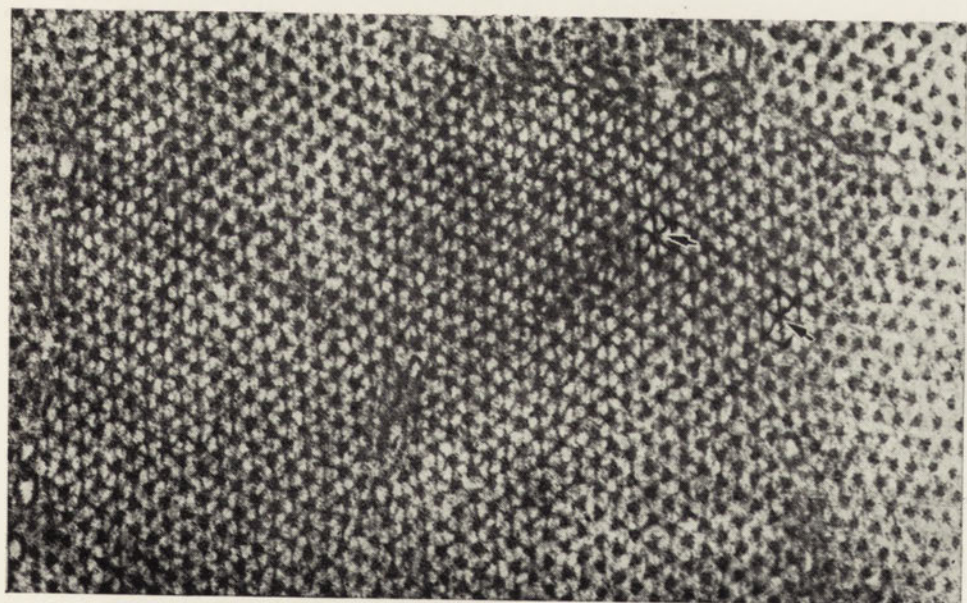
1. Knappeis G. C., Carlsen F., (1968), *J. Cell Biol.*, **38**, 202—211.
2. Pepe F., (1967), *J. Med. Biol.*, **27**, 203—225.
3. Kasman K., (1978), *Post. Bioch.*, **24**, 77—91.
4. Luther P., Squire J., (1978), *J. Mol. Biol.*, **125**, 313—324.
5. Sjöström M., Ångquist K-A., Kidman S., Larsen K., (1978), Praca doktorska, Wydział Medyczny Uniwersytetu w Umea I:1—I:26.
6. Sjöström M., Squire J. M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **109**, 49—68.
7. Sjöström M., Squire J. M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 239—278.
8. Masaki T., Takaiti O., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 367—380.
9. Spiro D., (1962), *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **24**, 879—885.
10. Franzini-Armstrong C., Porter K. R., (1964), *J. Cell Biol.*, **22**, 675—696.
11. Page S. G., (1965), *J. Cell Biol.*, **26**, 477—497.
12. Pepe F. A., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 97—108.
13. Pepe F. A., (1975), *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 543—562.
14. Squire J., (1977), *Proc. 6th Meeting of Eur. Musc. Club*, 95—97.
15. Pepe F. A., (1966), *J. Cell Biol.*, **28**, 505—525.
16. Samosudowa N. V., Ogievetskaya M. M., Kalanikavova M. B., Frank G. M., (1968), *Biofizyka* **13**, 877—887.
17. Masaki T., Takaiti O., Ebashi S., (1968), *J. Biochem.*, **64**, 909—910.
18. Masaki T., Takaiti O., (1972), *J. Biochem.*, **71**, 355—357.
19. Heizmann C. W., Eppenberger H. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 270—277.
20. Heizmann C. W., Bläuenstein I. E., Eppenberger H. M., (1978), *Experientia* **34**, 38—40.
21. Eaton B. L., Pepe F. A., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 681—695.
22. Morimoto K., Harrington W. F., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3052—3061.
23. Houk T. W., Putnam S. V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1271—1277.
24. Wallimann T., Turner D. C., Eppenberger H. M., (1974), *Proc. 9th FEBS Meeting, Budapest*, 119—124.
25. Turner D. C., Wallimann T., Eppenberger H. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 202—205.
26. Eaton B. L., Mochan B. S., (1973), *J. Cell Biol.*, **59**, 86a.
27. Wallimann T., Turner D. C., Eppenberger H. M., (1977), *J. Cell Biol.*, **75**, 297—317.
28. Trinnick J., Lowey S., (1977), *J. Mol. Biol.*, **113**, 343—363.
29. Strehler E. E., Pelloni G., Heizmann C. W., Eppenberger H. M., (1980), *J. Cell Biol.*, **86**, 775—783.
30. Chowrashi P. K., Pepe F. A., (1979), *Proc. I Marshall Symp. Cell Biol.*, **419—422**.
31. Kasman K., (1978), Praca doktorska, Inst. Biol. Dośw. im. Nenckiego PAN, Warszawa.
32. Kasman K., Michnicka M., Kąkol I., (1979), *Proc. 8th Eur. Conf. Musc. and Motil., Heidelberg*, 16—17.
33. Kasman K., Michnicka M., Kąkol I., (1980), *XVII Zjazd Pol. Tow. Bioch.*, Warszawa, Streszczenia, str. 106.
34. Stromer M. H., Hartshorne D. J., Mueller H., Rice R. V., (1969), *J. Cell Biol.*, **40**, 167—178.
35. Swanidze E. S., Mindadze H. R., Furman W. J., Gamkrelidze

- C. D., Stefanienko G. A., Zaliszwili H. M., (1976), *Biofizika i Biochimika Mysiecznowo Sokraszczenia* Wyd. Nauka, Moskwa, 134—137.
36. Yagi K., Mase R., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 397—403.
  37. Yagi K., Nakata T., Yazawa Y., Sakakibara I., (1965), *J. Biochem.*, **57**, 766—772.
  38. Botts J., Stone M. J., (1968), *Biochemistry* **7**, 2688—2696.
  39. Mani R. S., Kay C. M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 391—399.
  40. Herasymovych O. S., Mani R. S., Kay C. M., Bradley R. D., Scra-ba D. G., (1980), *J. Mol. Biol.*, **136**, 193—198.
  41. Botts J., Stone D. B., Wang A. T. I., Mendelson R. A., (1975), *J. Supramol. Struct.*, **3**, 141—145.
  42. Mani R. S., Kay C. M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **533**, 248—256.
  43. Mani R. S., Kay C. M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **536**, 134—141.
  44. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—425.
  45. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
  46. Strzelecka-Gołaszewska H., Piwowar U., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 517—558.
  47. Kąkol I., Kasman K., (1977), Proc. 6th Meeting of Eur. Musc. Club, Saclay, 44—45.
  48. Kasman K., Mészáros-Guba M., Kąkol I., (1977), Proc. 6th Meeting of Eur. Musc. Club, Saclay, 93—94.
  49. Kąkol I., Kasman K., Michnicka M., (1980), *Acta Biochim. Biophys Acad. Sci. Hung.* (w druku).
  50. Guba F., Mészáros-Guba M., Kasman K., Michnicka M., Kąkol I., (1980), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, (w druku).
  51. Herasymovych O. S., Mani R. S., Kay C. M., (1978), **534**, 38—47.
  52. Strehler E. E., Pelloni G., Heizmann C. W., Eppenberger H. M. (1979), *Exp. Cell Res.*, **124**, 39—45.
  53. Eppenberger H. M., Strehler E. E., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, D1191.
  54. Strehler E. E., Eppenberger H. M., (1980), Proc. 9th Eur. Congr. Musc. Motil., Salzburg, Nr 103.
  55. Guba F., (1965), *Biol. közl.*, **13**, 95—109.
  56. Squire J. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 291—323.
  57. Tregear R. T., Squire J. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 279—290.

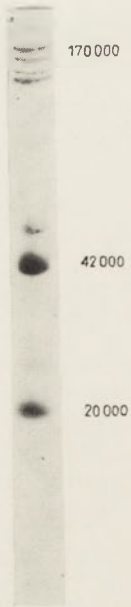




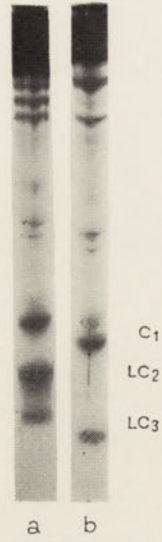
Ryc. 2



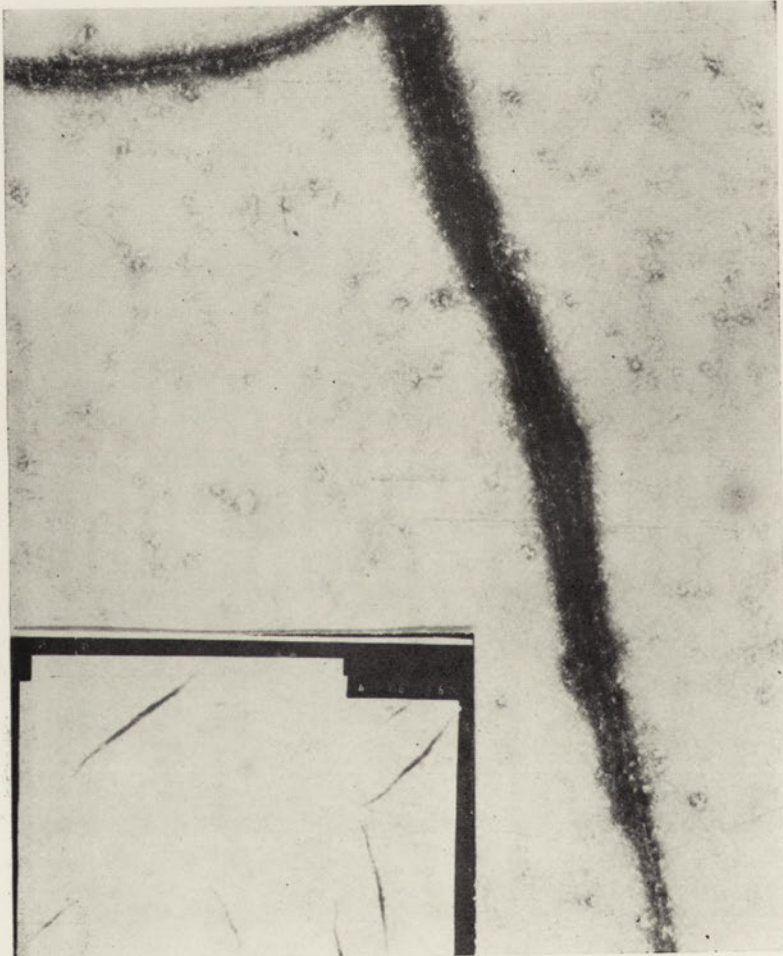
Ryc. 3



Ryc. 7



Ryc. 9



Ryc. 8

**Ryc. 2.** Podłużny przekrój sarkomeru

Z — linia Z, I — prążek I, A — prążek A, M — linia M. Powiększenie negatywu 12 000  $\times$ . Zdjęcie udostępniła dr Anna Jakubiec-Puka (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

**Ryc. 3.** Poprzeczny przekrój przez miofibryłę

Strzałkami zaznaczono mostki poprzeczne linii M. Powiększenie negatywu 12 000  $\times$ . Zdjęcie udostępniła dr Anna Jakubiec-Puka (Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN).

**Ryc. 7.** Obraz elektroforetyczny „surowego” ekstraktu białek linii M. Elektroforezę przeprowadzono w żelu poliakryloamidowym 7,5% w obecności SDS.

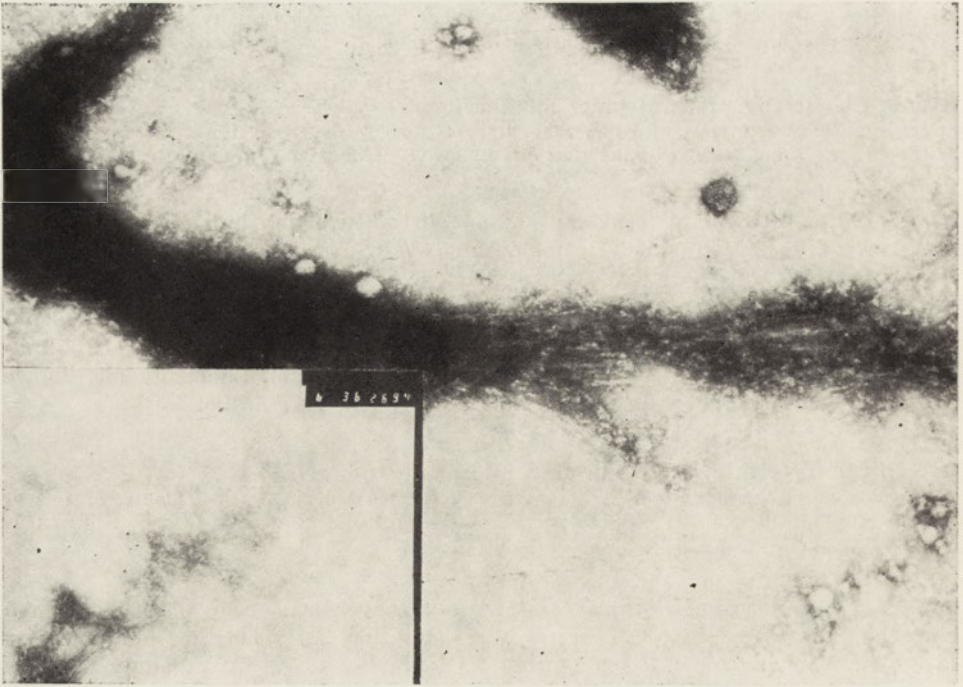
**Ryc. 8.** Elektronogram wiązki filamentów miozyny natywnej uzyskanej po dodaniu „surowego” ekstraktu białek linii M. Powiększenie negatywu 18 000  $\times$ . Wstawka (powiększenie 9000  $\times$ ) filamenty uzyskane z miozyny natywnej. Filamenty miozynowe przedstawiono w dwukrotnie mniejszym powiększeniu niż wiązkę.

**Ryc. 9.** Obrazy elektroforetyczne preparatów miozynowych

a) miozyna natywna, b) miozyna pozbawiona obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub>. Elektroforezę wykonano w 8% żelu poliakryloamidowym w obecności SDS. LC<sub>1</sub>, LC<sub>2</sub>, LC<sub>3</sub> — lekkie łańcuchy miozyny.

**Ryc. 12.** Elektronogram wiązki agregatów utworzonych z miozyny pozbawionej obu łańcuchów LC<sub>2</sub> po dodaniu „surowego” ekstraktu białek linii M. Powiększenie 18 000  $\times$ . Wstawka (powiększenie 36 000  $\times$ ) — małe agregaty uzyskane z miozyny pozbawionej obu lekkich łańcuchów LC<sub>2</sub> niezdolne do formowania prawidłowych bipolarnych filamentów. Agregaty miozynowe przedstawiono w dwukrotnie większym powiększeniu niż wiązkę.





Ryc. 12

ANNA JAKUBIEC-PUKA \*

## Filamenty pośrednie (10 nm) komórek zwierzęcych

### Intermediate Filaments (10 nm) of Animal Cells.

Po zastosowaniu mikroskopii elektronowej do badań morfologicznych wykryto w komórkach zwierząt wyższych filamenty białkowe o średnicy pośredniej pomiędzy filamentami aktynowymi a miozynowymi i mikrotubulami. Filamenty takie nazwano więc pośrednimi. Początkowo traktowano je często jako fragmenty mikrotubul lub filamentów miozynowych.

Po raz pierwszy filamenty pośrednie opisano w końcu lat 60-tych w mięśni prążkowanym (1, 2), następnie w komórkach układu nerwowego (3, 4), a w ciągu kolejnych kilku lat w komórkach większości narządów. Filamenty pośrednie są obecnie przedmiotem intensywnych badań, wiele kwestii dotyczących tych filamentów pozostaje jednak jeszcze niejasnych. Z tego względu przedstawiony poniżej obraz filamentów pośrednich jest niekompletny i często dyskusyjny, będzie on zapewne ulegać korekcjom w miarę dalszych badań.

Cechy morfologiczne i fizykochemiczne filamentów pośrednich pochodzących z różnych tkanek są bardzo zbliżone (1, 2, 3, 5, 6). Bardzo podobny również jest skład aminokwasowy izolowanych białek filamentów (4, 7, 8, 9, 10) i ich struktura II rzędowa, której 40—50% stanowi  $\alpha$ -heliks (6, 11, 12). Z tego względu poznanie budowy białek filamentów pośrednich oraz wyjaśnienie roli i umiejscowienie filamentów w komórce, jak również zbadanie różnic właściwości filamentów otrzymanych z różnych tkanek stało się możliwe dopiero obecnie, dzięki rozpowszechnieniu badań komórek z hodowli *in vitro* oraz dzięki rozwojowi nowych technik badania białek, szczególnie immunologicznych i elektroforezy dwukierunkowej (13), jak też badania produktów organicznej proteolizy.

Średnica filamentów pośrednich wynosi najczęściej około 10 nm, w niektórych przypadkach może wahać się od 7 do 14 nm, powierzchnia

\* Dr med, Pracownia Metabolizmu Białek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

filamentów jest gładka, kształt cylindryczny. Białka filamentów pośrednich są hydrofobowe oraz nierozpuszczalne w roztworach o pH i o sile jonowej występujących w komórkach. Solubilizacji sprzyjają czynniki denaturujące białka oraz rozrywające ich wiązania hydrofobowe. Filamenty pośrednie ulegają solubilizacji w roztworach o niskiej sile jonowej, o niskim i o wysokim pH (5, 8, 14). Długotrwała ekstrakcja jednak roztworami o niskiej a także o wysokiej sile jonowej i pH fizjologicznym może prowadzić jednak do solubilizacji niektórych filamentów pośrednich. W tych warunkach może też nastąpić dezagregacja filamentów na fragmenty o mniejszej średnicy i długości (6, 15, 16, 17, 18). Białka filamentów pośrednich mogą po rozpuszczeniu kopolimeryzować, jeśli zmienione zostaną siła jonowa lub pH roztworu (8, 18, 19). Tworzą się wówczas filamente o cechach morfologicznych zbliżonych do naturalnych, jednak o większej różnorodności kształtu i średnicy (8, 10, 17). Kolejna wielokrotna solubilizacja i wytrącanie filamentów jest jedną z technik rozdziału i oczyszczania białek wchodzących w ich skład. Uzyskuje się wówczas jedno lub więcej, do kilkunastu, białek z jednego rodzaju filamentów pośrednich (8, 12, 17). Białka te występują często w dwóch lub więcej formach, które uważane są za produkty tych samych genów. Nieznaczne różnice w ciężarach cząsteczkowych i punkcie izoelektrycznym poszczególnych form powstają przypuszczalnie w wyniku ich modyfikacji (12, 20). Białka filamentów pośrednich są kwaśne, zawierają około 20% kwasu glutaminowego i około 10% kwasu asparaginowego. Należą one do białek stosunkowo konserwatywnych. Homologiczne białka filamentów pochodzących z różnych tkanek wykazują znaczne podobieństwa lub nawet identyczność (4, 7, 8, 9, 10). Odnosi się to także często do białek pochodzących z takich samych tkanek zwierząt różnych gatunków (21, 22). Najbardziej podobne lub identyczne są odcinki łańcucha peptydowego o strukturze  $\alpha$ -heliksu (23). Pomimo tych daleko idących podobieństw, różnice struktury poszczególnych białek i ich wzajemnych proporcji są na tyle istotne, że pozwoliły na wyróżnienie kilku klas filamentów pośrednich (Tabela I).

Jako kryteria klasyfikacji filamentów przyjęto: tkankę z której filamente pochodzą, właściwości ich białek składowych (jak: skład aminokwasowy, ciężar cząsteczkowy, punkt izoelektryczny itp. oraz stosunek ilościowy białek), specyficzność immunologiczną, reakcję na kolcemid i inne związki antymitotyczne, a także pewne różnice w rozpuszczalności. Jak dotąd wyróżniono następujące klasy filamentów pośrednich: filamente keratynowe i tonofilamenty, wytwarzane przez komórki nabłonkowe i pochodzenia nabłonkowego (21, 24), neurofilamenty obecne w neuronach (15), filamente glejowe w komórkach gleju (25), filamente wimentynowe w komórkach tkanki łącznej i pochodzenia łącznotkankowego (14, 21), filamente pośrednie w komórkach mięśniowych (1, 2, 19, 26), oraz filamente występujące w soczewce oka (10, 27). Uważa się, że w każdej komórce wystę-



Filamenty pośrednie różnych tkanek

Tabela 1.

Tkanka	Nazwa filamentów	Średnica nm	Główne składniki białkowe i ich przybliżone ciężary cząsteczkowe	Główne funkcje w komórce	Źródło informacji
Nabłonkowa	Keratynowe	8	Keratyny 40 000—70 000 55 000	Utrzymanie kształtu i sprężystości komórki.	11, 16, 20, 24, 29, 35, 36, 37
	Tonofilamenty	8—10			
Nerwowa neurony astrocyty	Neurofilamenty	10	68 000 150 000 200 000	Sprężystość i wytrzymałość aksonów	3, 4, 15, 41, 43, 44
	Glejowe	7—9	Kwaśne włókniste białko gleju 51 000	Blżej nieokreślona	3, 15, 25, 46, 47
Łączna	Wimentynowe	10	Wimentyna (dekamina) 52 000—58 000	Rozmieszczenie organeli w komórce. Udział w mitozie.	6, 14, 21, 29, 32, 34, 50, 51
Mięsień prążkowany	Desminowe	10	Desmina (skeletyna) 50 000—55 000	Integracja ruchu	1, 2, 12, 26, 54, 55
Mięsień gładki	Desminowe	10	Desmina (skeletyna) 50 000—55 000	Integracja przestrzeni. Wytrzymałość komórki.	8, 19, 53, 59
	Wimentynowe		Wimentyna	Ewentualna integracja ruchu	
Soczewka oka	Lentynowe	11—12	Lentyna 54 000 Wimentyna	„Skieletowa”. Ewentualny związek z akomodacją.	9, 10, 27, 34, 60

pują filamenty pośrednie co najmniej dwóch klas, najczęściej jedną z nich są filamenty wimentynowe (20, 21, 28, 29, 30).

Rolę filamentów pośrednich w komórce najogólniej można, jak się obecnie uważa, sprowadzić do tworzenia przez nie „szkieletu” organizującego przestrzeń komórkową (8, 14, 19, 26) oraz rozmieszczenie organeli takich jak jądro (6, 31, 32), czy mitochondria (14, 33). Biorą one także udział w ruchach i przegrupowaniach organeli komórkowych (34). Filamenty pośrednie każdej z klas mają na ogół charakterystyczne ułożenie i odrębną rolę w komórce (Tablica 1).

Filamentem keratynowym i tonofilamentem obecnym w komórkach nabłonkowych i pochodzenia nabłonkowego, przypisuje się głównie rolę „szkieletową” — nadawania komórce kształtu i sprężystości (16, 29, 35). Średnica ich bywa różna, najczęściej wynosi około 8 nm. Występują pojedynczo albo w pęczkach czy agregatach (36). Umiejscowione są przede wszystkim w częściach obwodowych komórki (20, 29, 35); najliczniej filamenty keratynowe występują w tych okolicach błony komórkowej, które stykają się z sąsiednią komórką (37). Wydaje się, że filamenty te mają jakiś udział w łączeniu sąsiednich komórek a więc i utrzymaniu kształtu i sprężystości tkanek (35). Filamenty keratynowe składają się z wielu białek o charakterze keratyn i ciężarach rzędu 40 000 do 70 000 (11, 24), których zawartość i wielkość zmienia się w miarę dojrzewania komórek. Komórki leżące w głębszych warstwach naskórka syntetyzują na ogół krótsze łańcuchy peptydowe (46 000-58 000), podczas gdy komórki powierzchniowych warstw syntetyzują dłuższe łańcuchy (63 000-67 000) (38), ulegające dalszej modyfikacji w komórce (39). Wielkie agregaty filamentów keratynowych występują w komórkach zmienionych patologicznie np. w wątrobie alkoholików. Agregaty takie identyfikuje się obecnie ze strukturami znanymi z okresu przed badaniami ultrastruktury jako „ciałka Mallory” lub hialinowe (37, 40).

Neurofilamenty obecne w neuronach (3, 4) utrzymują sprężystość i wytrzymałość aksonów, tworząc w okolicy neurolemy siatkę przestrzenną połączoną z mikrotubulami (41). Wykazano, że fragmenty neurofilamentów, jak również wchodzące w ich skład jednostki białkowe przesuwają się wraz z aksoplazmą wzdłuż osi podłużnej aksonów (41, 42). Neurofilamenty różnią się od filamentów pośrednich pozostałych klas łatwością solubilizacji w roztworach o niskiej sile jonowej i pH fizjologicznym (15) oraz w roztworach o wysokiej sile jonowej (18), mogą także dysocjować na protofilamenty o średnicy około 2 nm. Białka neurofilamentów charakteryzują się znacznie większymi ciężarami cząsteczkowymi od białek filamentów innych klas, oraz występowaniem kilku różnych białek w podobnej ilości. Główne białka neurofilamentów o ciężarach cząsteczkowych około: 68 000, 145-150 000 i 200 000 (15, 43, 44), są niezależnie syntetyzowane (43) i różnią się strukturą pierwszorzędową (44). Neurofilamenty charakteryzują się znaczną zmiennością gatun-

kową zarówno właściwości biochemicznych, jak i stosunków ilościowych poszczególnych białek. (44). Białka neurofilamentów gromadzą się w nadmiernej ilości w aksonach u osób cierpiących na niektóre neuropatie (45).

Filamenty glejowe, o średnicy około 7 nm (3) zbudowane są z tzw. kwaśnego włóknistego białka gleju o ciężarze cząsteczkowym około 51 000 (15,25), występują w wypustkach komórek gleju, astrocytów (25, 46, 47) oraz prawdopodobnie niektórych komórkach ependymalnych (47). Rola tych filamentów nie jest dotychczas określona. Zwiększenie ilości kwaśnego włóknistego białka gleju obserwowano w różnych stanach patologicznych tkanki mózgowej, jak procesy zwyrodnieniowe czy nowotworowe (7, 48, 49); wydaje się, że jego obecność może stanowić kryterium diagnostyczne świadczące o rodzaju nowotworu (47).

Filamenty, których głównym składnikiem jest wimentyna (ang. *vimentin* lub *decamin*) występują we wszystkich komórkach tkanki łącznej i pochodzenia łącznotkankowego, jak też w wielu innych komórkach. Wimentyna, białko o ciężarze cząsteczkowym 57 000-58 000, jest stosunkowo mało specyficzna gatunkowo (14, 21, 50). Największa ilość filamentów wimentynowych gromadzi się w okolicy jądra komórkowego, powodując jego „zakotwiczenie”, przy czym wydaje się, że filamente te nie łączą się z błoną jądrową, a przenikają do wnętrza jądra (6, 32). Część filamentów wimentynowych układa się promieniście ku obwodowi komórki (32, 37). Filamenty wimentynowe tworzą połączenia pomiędzy sobą i z mikrotubulami (34, 51), jak również prawdopodobnie z filamentami innych klas (30). Filamenty wimentynowe występują we wszystkich dzielących się komórkach, niezależnie od tkanki, z której komórki pochodzą (21, 28, 34, 50, 52), ich układ zmienia się w czasie podziału komórki (14, 29); tworzą się agregaty otaczające wrzeciono mitotyczne i chromosomy (29). Podczas podziału komórki filamente wimentynowe prawdopodobnie biorą udział w oddzielaniu wrzeciona mitotycznego i chromosomów od reszty organeli komórkowych, a być może również w ukierunkowaniu wrzeciona mitotycznego (29). Wydaje się, że filamente wimentynowe w fibroblastach decydują o ruchach organeli i ich przegrupowaniu w czasie poruszania się komórki, jak też o przepływie cytoplazmy, ponieważ zagregowanie filamentów wimentynowych powoduje zmianę charakteru ruchu organeli i upodabnia przepływ cytoplazmy do spotykanego u ameb (51). Kolcemid i inne związki antymitotyczne powodują agregację filamentów wimentynowych i gromadzenie się agregatów w postaci otaczającej jądro „zapeczki” lub siatki (1, 14, 21, 28, 37), przypominającej agregaty tworzące się w czasie mitozy (29). Odpowiedź komórki na kolcemid stała się jednym z ogólnie stosowanych kryteriów pozwalających na odróżnienie filamentów wimentynowych od innych rodzajów filamentów pośrednich (14, 21).



Filamenty pośrednie mięśnia szkieletowego, sercowego i niektórych rodzajów mięśnia gładkiego, zbudowane są głównie z desminy (skeletaliny — ang. *sceletin*) (8, 12, 26), a filamenty pośrednie mięśni gładkich naczyń krwionośnych zbudowane są z wimentyny (53). Prócz desminy w skład filamentów pośrednich mięśnia prążkowanego wchodzi jeszcze inne białka, w tym aktyna (8, 19, 50).

Filamenty pośrednie włókna mięśnia prążkowanego (1, 2), utrzymują we właściwym położeniu organele ruchu — miofibryle (26, 54, 55). Tworzą one połączenia miofibryli pomiędzy sobą oraz z błoną włókna mięśniowego. Połączenia te występują głównie pomiędzy liniami Z sąsiadujących miofibryli, powodując ich uporządkowany układ, manifestujący się na przekroju mięśnia poprzecznym prążkowaniem \*. Dzięki temu układowi wszystkie miofibryle położone są równolegle wzdłuż osi długiej włókna mięśniowego, a synchroniczny skurcz sarkomerów w miofibrylach powoduje skrócenie całego włókna, co umożliwia wykonanie przez włókno mięśniowe pracy mechanicznej. Filamenty pośrednie w mięśniu prążkowanym więc oprócz roli „szkieletowej” grają też rolę integratora ruchu (26, 54, 55). W przypadkach niektórych schorzeń mięśniowych, jak też w mięśniu regenerującym obserwowano wzrost ilości filamentów pośrednich oraz ilości desminy (56, 57, 58). Rola natomiast filamentów pośrednich w mięśniu gładkim jest nadal niewyjaśniona. Nie ma zgodności wyników i poglądów w kwestii czy mają one jakiś udział w integracji ruchu (59), jak w mięśniu prążkowanym, czy też grają tylko rolę „szkieletową” (8, 19), podobnie jak ma to miejsce w komórkach niemięśniowych.

Filamenty pośrednie soczewki oka mają średnicę około 10, 12 nm i długość do 2  $\mu\text{m}$ , są przezroczyste. Filamenty te występują w komórkach powierzchniowej części soczewki, tworząc prawdopodobnie „szkielet” (9, 10, 27), nie wykluczone też, że mają jakieś znaczenie dla akomodacji soczewki (60). W skład filamentów pośrednich soczewki wchodzi trzy bardzo nieznacznie różniące się białka, o ciężarach cząsteczkowych około 54 000 (10). W komórkach soczewki oka znajduje się również wimentyna (34), która jest związana z błonami komórkowymi (61). Komórki soczewki, mimo iż są pochodzenia nabłonkowego, nie zawierają ani keratyny, ani tonofilamentów (34).

Obserwacje filamentów pośrednich w czasie podziału komórek (29), lub poruszania się fibroblastów (51, 62) upoważniają do wniosku, że filamenty te mogą się w stosunkowo krótkim czasie przegrupowywać albo odwracalnie agregować. Nie wiadomo jak dotąd w jaki sposób procesy te zachodzą i jakie warunki im sprzyjają. Brane są pod uwagę trzy możliwości: dezagregacja filamentów na fragmenty i ponowne ich agregowanie (16, 63), modyfikacja białek filamentów pośrednich przez ich

\* por. następny artykuł (str. 317).

fosforylację (59, 64), oraz rozkład proteolityczny białek filamentów pośrednich, charakteryzujących się znaczną podatnością na działanie proteaz (22, 54, 63). W niektórych komórkach występują proteazy o dużej specyficzności wobec białek filamentów pośrednich (65). *In vitro* białka filamentów pośrednich mogą ulegać modyfikacji w drodze proteolizy lub fosforylacji (66).

Na podstawie przedstawionych powyżej danych, można uważać filamenty pośrednie za jedną z podstawowych struktur komórkowych. Wydaje się również, że zmiany ich ilości i zaburzenia składu oraz rozmieszczenia w komórce są istotnym czynnikiem wielu procesów patologicznych.

Zaakceptowano do druku 30.3.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H., (1968), *J. Cell Biol.*, **38**, 538—555.
2. Kelly D. E., (1969), *Anat. Rec.*, **163**, 403—426.
3. Wuerker R. B., (1970), *Tissue Cell*, **2**, 1—9.
4. Huneus F. C., Davison P. F., (1970), *J. Mol. Biol.*, **52**, 415—428.
5. Cooke P. H., Chase R. H., (1971), *Exp. Cell Res.*, **66**, 417—425.
6. Woodcock C. L. F., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 881—889.
7. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B., (1971), *Brain Res.*, **28**, 351—354.
8. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *J. Cell Sci.*, **23**, 243—268.
9. Kibbelaar M. A., Selten-Versteegen A-M. E., Dunia J., Benedetti E. L., Bloemendal H., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 543—549.
10. Lieske N., Chen J., Maisel H., Romero-Herrera A. E., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **626**, 136—153.
11. Steinert P. M., Idler W. W., (1975), *Biochem. J.*, **151**, 603—614.
12. Huiatt T. W., Robson R. M., Arakawa N., Stromer M. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6981—6989.
13. O'Farrell P. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007—4021.
14. Hynes R. O., Destree A. T., (1978), *Cell*, **13**, 151—163.
15. Liem R. K. H., Yen S. H., Salomon G. D., Shelanski M. L., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 637—645.
16. Zackroff R. V., Goldman R. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6226—6230.
17. Hubbard B. D., Lazarides E., (1979), *J. Cell Biol.*, **80**, 166—182.
18. Zackroff R., Goldman A., Goldman R., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 370.
19. Cooke P., (1976), *J. Cell Biol.*, **68**, 539—556.
20. Gard D. L., Bell P. B., Lazarides E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3894—3898.
21. Franke W. W., Schmid E., Osborn M., Weber K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5034—5038.
22. O'Shea J. M., Robson R. M., Huiatt T. W., Hartzler M. K., Stromer M. H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 972—980.
23. Steinert P. M., Idler W. W., Goldman R. D., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4534—4538.

24. Gipson I. K., Anderson R. A., (1980), *Exp. Cell Res.*, **128**, 395—406.
25. Schachner M., Hedley-Whyte E. T., Hsu D. W., Schoonmaker G., Bignami A., (1977), *J. Cell Biol.*, **75**, 67—73.
26. Lazarides E., Hubbard B. D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4344—4348.
27. Maisel H., (1977), *Experientia*, **33**, 525.
28. Bennett G. S., Fellini S. A., Croop J. M., Otto J. J., Bryan J., Holtzer H., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4364—4368.
29. Aubin J. E., Osborn M., Franke W. W., Weber K., (1980), *Exp. Cell Res.*, **129**, 149—165.
30. Eckert B. S., Daley R. A., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 379.
31. Small J. V., Celis J. E., (1978), *J. Cell Sci.*, **31**, 393—409.
32. Henderson D., Weber K., (1980), *Exp. Cell Res.*, **129**, 441—454.
66. Eagles P. A. M., Gilbert D. S., Hopkins J. M., Maggs A., Wais C., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 731.
33. Toh B. H., Lolait S. J., Mathy J. P., Baum R., (1980), *Cell Tissue Res.*, **211**, 163—169.
34. Ramaekers F. C. S., Osborn M., Schmid E., Weber K., Bloemendal H., Franke W. W., (1980), *Exp. Cell Res.*, **127**, 309—327.
35. Edwards J. G., J. Mck. Dysart., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 729.
36. Franke W. W., Grund Ch., Osborn M., Weber K., (1978), *Cytobiol.*, **17**, 365—391.
37. Borenfreund E., Schmid E., Bendich A., Franke W. W., (1980), *Exp. Cell Res.*, **127**, 215—235.
38. Fuchs E. V., Green H., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 370.
39. Winter S., Jarasch E-D., Schmid E., Franke W. W., Denk H., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 371.
40. Denk H., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 377.
41. Endo S., Sakai H., Matsumoto G., (1979), *Cell Struct. Funct.*, **4**, 285—293.
42. Hoffman P. N., Lasek R. L., (1975), *J. Cell Biol.*, **66**, 351—366.
43. Czosnek H., Soifer D., Wiśniewski H. M., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 726—734.
44. Chiu F-C., Korey B., Norton W. T., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 1149—1159.
45. Shelanski M., Leterrier J-F., Markovich V., Liem R. K. H., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 379.
46. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F., (1976), *J. Comp. Neur.*, **165**, 197—208.
47. Duffy P. E., Graf L., Huang Y.-Y., Rapport M. M., (1970), *J. Neurol. Sci.*, **40**, 133—146.
48. Allt G., (1980), *Trends in Neuro-Sci.*, **3**, 72—73.
49. Palfreyman J. W., Thomas D. G. T., Ratcliffe J. G., Graham D. J., (1979), *J. Neurol. Sci.*, **41**, 101—113.
50. Franke W. W., Schmidt E., Winter S., Osborn M., Weber K., (1979), *Exp. Cell Res.*, **123**, 25—46.
51. Wang E., Goldman R. D., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 708—726.
52. Gard D. L., Lazarides E., (1980), *Cell*, **19**, 263—275.
53. Gabbiani G., Schmid E., Chaponnier C., Winter S., De Chastonay C., Franke W. W., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 374.
54. Granger B. L., Lazarides E., (1979), *Cell*, **18**, 1053—1063.
55. Bennett P., (1979), *Nature*, **278**, 602—603.
56. Edström L., Thornell L-E., Eriksson A., (1980), *J. Neurol. Sci.*, **47**, 171—190.



57. Thornell L-E., Edström L., Eriksson A., Henriksson K-G., Ångqvist K-A., (1980), *J. Neurol. Sci.*, **47**, 153—170.
58. Jakubiec-Puka A., Kulesza-Lipka D., Krajewski K., (1981), *Adv. Physiol. Sci.*, **24**, 333—339.
59. Lazarides E., (1980), *Nature*, **283**, 249—256.
60. Bradley R. H., Lo K., Kuszak J., Maisel H., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 313a.
61. Ramaekers F. C. S., Dunia I., Benedetti E. L., Bloemendal H., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 373.
62. Badley R. A., Couchman J. R., Rees D. A., (1980), *J. Muscle Res. Cell Motility*, **1**, 5—14.
63. Anderton B., (1980), *Nature*, **283**, 716.
64. O'Connor C. M., Balzer D. R., Lazarides E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **76**, 819—823.
65. Nelson W. J., Traub P., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 733.
66. Eagles P. A. M., Gilbert D. S., Hopkins J. M., Maggs A., Wais C., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 731.



ANNA JAKUBIEC-PUKA \*

## Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych

### Intermediate Filaments (10 nm) of Muscle Fibres.

We włóknie mięśniowym występują filamenty kilku rodzajów. Są to: filamenty miozynowe czyli grube (o średnicy około 15 nm), aktynowe czyli cienkie (około 7 nm), mikrotubule (około 25 nm) oraz filamenty pośrednie (1, 2) o średnicy około 10 nm, o których będzie mowa poniżej. We włóknie mięśniowym znajdują się najprawdopodobniej inne jeszcze filamenty: opisane przez Kelly'go (2, 3), a ostatnio szczegółowiej zbadane przez Maruyamę i jego grupę (4, 5, 6), filamenty o średnicy 2-4 nm (2) zbudowane z białka konnektyny (4, 5) oraz filamenty wchodzące w skład struktury linii Z (3, 6).

Głównym białkiem filamentów pośrednich mięśnia szkieletowego, sercowego i części mięśni gładkich zwierząt wyższych jest desmina, nazywana również skeletyną (ang. *sceletin*) (7, 8, 9). Znamienna rola filamentów pośrednich w wysoko zróżnicowanej tkance, jaką jest mięsień prążkowany, polega — jak się zdaje — na wytwarzaniu systemu integrującego organele ruchu — miofibryle (7, 10, 11). Ponadto filamenty pośrednie we włóknie mięśnia, podobnie jak ma to miejsce w komórkach innych tkanek (co omówione zostało w poprzednim artykule na str. 309), utrzymują we właściwym położeniu organele komórkowe, jak jądra (2, 12, 13), mitochondria (14, 15), a prawdopodobnie również system T i kanaliki siatki sarkoplazmatycznej (11, 12, 13, 14).

Filamenty pośrednie są bardzo wyraźnie widoczne na obrazach z mikroskopu elektronowego mięśnia rozwijającego się, w którym opisano je najwcześniej (1, 2, 16); również stosunkowo dobrze są widoczne na obrazach mięśnia przerastającego lub regenerującego (12, 13, 17). Są one natomiast z nieznanых powodów bardzo trudne do zauważenia na obrazach ultrastruktury normalnego dojrzałego mięśnia prążkowanego (18), w którym widoczne są gdzieś w okolicy podsarkolemalnej (obserwacje własne). Z tego względu rolę tych filamentów w mięśniu, jakkol-

\* Dr med, Pracownia Metabolizmu Białek, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.



wiek sugerowaną już w 1969 roku przez Kelly'go (2), można było rozpoznać dopiero w ostatnich latach, po wprowadzeniu do badań mięśni technik immunologicznych i elektroforezy dwukierunkowej (19), umożliwiających identyfikację i umiejscowienie we włóknie mięśniowym poszczególnych białek. Wyjaśnienie tego problemu zawdzięczamy głównie pracom Lazaridesa (7, 10, 14, 20).

Najliczniejsze filamenty pośrednie we włóknie mięśnia prążkowanego, tak szkieletowego jak i sercowego, występują pomiędzy miofibrilami, poprzecznie do osi długiej włókna, łącząc i otaczając linię Z sąsiadujących miofibrili (7, 12, 13, 21), jak to ukazuje Ryc. 1 i 2 na przykładach mięśnia regenerującego. Długość filamentów pośrednich może dochodzić do 5  $\mu\text{m}$ , ich liczba pomiędzy dwiema sąsiadującymi liniami Z wynosi od kilku do kilkadziesiąt (22). Połączone linie Z tworzą morfologiczną całość tzw. „płaszczyznę Z” (Ryc. 1A), obejmującą całe włókno mięśniowe w jego przekroju poprzecznym (14). „Płaszczyzna Z” umocowana jest do sarkolemy za pomocą filamentów pośrednich (7, 12, 21), jednak nie bezpośrednio, a najprawdopodobniej poprzez strukturę o gęstości linii Z (12). „Płaszczyzny Z” zostały wyizolowane przez Grangera i Lazaridesa (14), którzy zastosowali ekstrakcję mięśnia roztworami o wysokiej sile jonowej, celem usunięcia filamentów aktynowych i miozynowych i osłabienia struktury prążków A i I, a następnie odpowiednią homogenizację. Autorzy ci wykazali metodami immunologicznymi, że poszczególne linie Z w „płaszczyźnie Z” połączone są strukturą zawierającą desminę, ta ostatnia występuje komplementarnie z  $\alpha$ -aktyniną — białkiem linii Z. W całej „płaszczyźnie Z” stwierdzono obecność aktyny: zarówno w liniach Z (razem z  $\alpha$ -aktyniną), jak i pomiędzy nimi (razem z desminą). Kolejne linie Z miofibrili wchodzi w skład kolejnych, równoległe położonych „płaszczyzn Z” tworząc przestrzenny układ porządkujący aparat kurczliwy. Temu układowi struktura kurczliwa zawdzięcza równoległe położenie miofibrili, jednakową długość sąsiadujących sarkomerów, oraz regularne ich ułożenie, manifestujące się w obrazie mięśnia jako poprzeczne prążkowanie. Układ ten „porządkuje ruch” — umożliwia jeden kierunek skurczu wszystkich sarkomerów, oraz powoduje przeniesienie tego synchronicznego skurczu na włókno mięśniowe jako całość (10, 11) i tym samym umożliwia wykonanie przez włókno mięśniowe efektywnej pracy mechanicznej. Integrująca aparat kurczliwy rola filamentów pośrednich nie ogranicza się do połączeń pomiędzy liniami Z, mniej liczne połączenia tworzą filamenty pośrednie pomiędzy miofibrilami na poziomie linii M i być może w innych jeszcze miejscach (14). W mięśniu sercowym filamenty pośrednie występują licznie w okolicy desmosomów i jak się zdaje łączą się z nimi (12, 16).

W mięśniu gładkim filamenty pośrednie są o wiele liczniejsze niż w mięśniu prążkowanym. Tworzą one nieregularną trójwymiarową siatkę, rozciągającą się wzdłuż całego włókna, połączoną z błoną komórkową

i ciałkami cytoplazmatycznymi, uważanymi za prymitywne odpowiedniki linii Z (8, 23, 24, 25, 26). Nie ma jak dotąd jednolitego poglądu co do roli filamentów pośrednich we włóknie mięśnia gładkiego. Badania mięśni gładkich przewodu pokarmowego kręgowców wykazały, że nie ma w nich ani strukturalnej kontynuacji, ani funkcjonalnych powiązań pomiędzy siatką filamentów pośrednich, a filamentami aktynowymi i miozynowymi. W czasie rozciągania włókna następuje nawet oddzielenie filamentów pośrednich od filamentów miozynowych (25, 26). Wydawałoby się więc, że w mięśniu gładkim filamente pośrednie stanowią układ niezależny od układu filamentów miozynowych i aktynowych, który nie bierze udziału w integracji ruchu, a jego rola ogranicza się do integracji przestrzeni i zachowania sprężystości komórki, podobnie jak ma to miejsce w komórkach niemięśniowych. We włóknach mięśnia gładkiego pochodzącego z naczyń krwionośnych, natomiast znaleziono połączenia filamentów aktynowych z układem filamentów pośrednich (27). Sugeruje to, że filamente pośrednie w tym mięśniu biorą udział w integracji ruchu (18). Nie można wykluczyć, że oba poglądy są słuszne, tym bardziej, że filamente pośrednie mięśni gładkich przewodu pokarmowego zbudowane są głównie z desminy, podczas gdy filamente mięśni naczyń prawdopodobnie nie zawierają wcale desminy (28), a zbudowane są głównie z wimentyny (ang. *vimentin*), białka charakterystycznego dla filamentów pośrednich komórek tkanki łącznej (29).

Desmina (skeletyna), białko o ciężarze cząsteczkowym 50 000-55 000, stanowi około 2-5% białek mięśnia prążkowanego (7, 9, 26) i do 20% białek mięśnia gładkiego (8, 9). Desminę wyizolowano po raz pierwszy z mięśni gładkich przewodu pokarmowego kręgowców (8, 26). Jest to białko kwaśne, o punkcie izoelektrycznym około pH 4, zawierające 234 aminokwasy w tym około 20% kwasu glutaminowego, po około 10% kwasu asparaginowego, leucyny i argininy, a bardzo mało aminokwasów aromatycznych i cysteiny (8, 9, 30, 31). Ponadto desmina zawiera penozy i heksozy w ilości mniejszej niż 0,3% masy (9).

Desmina mięśni wykazuje stosunkowo znaczną zmienność gatunkową (21, 31), jak i narządową, może być inna w mięśniu gładkim i prążkowanym (30). Badanie desminy metodą elektroforezy dwukierunkowej (19) pozwoliło wyodrębnić różne jej formy, różniące się nieznacznie ciężarami cząsteczkowymi i punktem izoelektrycznym (9, 21, 32). Nie stwierdzono dotąd czy są one produktami odrębnych genów, czy też powstają w wyniku modyfikacji; przeważa raczej ostatni pogląd.

Desmina występuje w filamentach pośrednich niektórych komórek niemięśniowych jak fibroblasty, komórki Schwanna czy komórki BHK-21 (32, 33). Znaczenie obecności desminy w tych komórkach nie jest znane, przypuszczalnie może ona brać udział w wiązaniu aktyny z błonami komórkowymi (18).



W filamentach pośrednich mięśnia prążkowanego oprócz desminy występują inne jeszcze białka, w tym aktyna (7, 31, 34). Aktyna otrzymana z filamentów pośrednich charakteryzuje się innymi właściwościami fizykochemicznymi i inną konformacją niż aktyna filamentów cienkich (31, 34), a jej rozpuszczalność jest bardzo bliska rozpuszczalności desminy: kopolimeryzuje ona z desminą, tworząc filamenty pośrednie bardzo podobne do naturalnych. Całkowite rozdzielenie tych dwu białek jest bardzo trudne (8, 31, 34).

Według Grangera i Lazaridesa (10) w skład filamentów pośrednich dojrzałego mięśnia prążkowanego wchodzi także wimentyna — białko filamentów pośrednich tkanki łącznej (29) — rozmieszczona we włóknie mięśniowym tak samo jak desmina (10). We wczesnych stadiach miogenezy mięśnia prążkowanego (w premioblastach i mioblastach), desmina nie występuje, a głównym składnikiem filamentów pośrednich jest wimentyna (20, 35). Jak wiadomo, filamenty wimentynowe występują we wszystkich dzielących się komórkach (29, 36), biorąc udział w procesie mitozy (37). Po zakończeniu podziałów mitotycznych, w okresie fuzji mioblastów, następuje gwałtowny wzrost syntezy desminy, synchroniczny z syntezą białek aparatu kurczliwego mięśnia (20). W tym czasie stosunek ilości desminy do wimentyny zwiększa się znacznie. Początkowo desminowo-wimentynowe filamenty rozmieszczone są w cytoplazmie nieregularnie i reagują na kolcemid tworzeniem agregatów (20) typowych dla filamentów wimentynowych (29, 38). W dojrzałych miotubach następuje ułożenie filamentów pośrednich w okolicy linii Z, co jest poprzedzone pojawieniem się  $\alpha$ -aktyliny w linii Z (20). Filamenty związane z linią Z wprawdzie nie tworzą agregatów w wyniku działania kolcemidu (20), ale reagują z przeciwciałami anty-wimentynowymi, co może wskazywać na obecność wimentyny w dojrzałym włóknie mięśnia prążkowanego; Lazarides i wsp. (10, 20) sugerują jej umiejscowienie wraz z desminą. Obecności wimentyny w „płaszczyźnie Z” dojrzałego mięśnia prążkowanego nie udało się potwierdzić przy zastosowaniu metod immunologicznych ani Frankemu i wsp. (29), ani Bennettowi i wsp. (35).

Jak stwierdzili Wang i Lazarides (39) składnikiem filamentów pośrednich mięśni prążkowanych, występującym w niewielkich ilościach, jest również białko o ciężarze cząsteczkowym około 68 000, umiejscowione we włóknie mięśniowym w okolicy linii Z, podobnie jak desmina (39). Białko to jest najprawdopodobniej identyczne z białkiem będącym jednym z głównych składników neurofilamentów — filamentów pośrednich komórek nerwowych (39, 40). Białko to jak się zdaje, stymuluje agregację mikrotubuli (41, 42). Znajdowano je w nieznacznych ilościach również w filamentach pośrednich komórek pochodzenia mezenchymalnego (39, 40). Rola białka 68 000 w filamentach pośrednich mięśnia dotąd nie jest wyjaśniona.



Wśród białek związanych z filamentami pośrednimi mięśni, prócz wymienionych, występują jeszcze dwa inne o ciężarach cząsteczkowych 43 000—45 000 oraz 47 000—49 000, uważane za produkty proteolitycznej degradacji desminy (9, 14, 31, 34). Znaczenie obecności w filamentach pośrednich mięśnia prążkowanego innych oprócz desminy białek jest niejasne: wydaje się, że nie są one konieczne do tworzenia filamentów pośrednich, ponieważ czysta desmina polimeryzuje *in vitro* w bardzo regularne filamenty o średnicy około 10 nm (31).

Białka filamentów pośrednich występują w komórce zwierzęcej w formie ufosforylowanej (43). Stopień ich fosforylacji jest niestały i różny w przypadku poszczególnych form (32, 43). Fosforylację desminy i wimentyny katalizuje cytoplazmatyczna kinaza, zależna od cyklicznego AMP (43, 44). Fosforylację białek uważa się za jeden z czynników je modyfikujących (44, 45), mogących też wpływać na agregację i dezagregację filamentów pośrednich (18); jak dotąd nie udało się potwierdzić tego doświadczalnie (20, 43). Innym czynnikiem modyfikującym białka i dezagregującym filamenty pośrednie mogą być proteazy (18, 45); wskazuje na to znaczna podatność białek filamentów pośrednich na proteolizę (10), zwłaszcza w obecności jonów  $Ca^{2+}$ . W badaniach *in vitro* stwierdzono, że neutralna proteaza mięśni aktywowana jonami  $Ca^{2+}$  (46) trawi desminę do peptydów o ciężarze cząsteczkowym około 32 000 i około 18 000 (30). W komórkach niemięśniowych z kolei znaleziono proteazę o wysokiej specyficzności w stosunku do białek filamentów pośrednich, w tym również pochodzących z mięśni (47, 48). Nie wiemy natomiast jeszcze jak przebiega proteoliza filamentów pośrednich *in vivo*, ani też jakie czynniki regulują ten proces.

W mięśniu zmienionym patologicznie obserwuje się także nieprawidłowości filamentów pośrednich. Wzrost ilości filamentów pośrednich oraz podwyższenie ilości desminy obserwowano w mięśniu miopatycznym, wykazującym zmiany patologiczne w linii Z (49, 50), w regenerującym dojrzałym mięśniu szkieletowym (17) oraz w przerastającym mięśniu sercowym (12, 13). W mięśniu atroficznym natomiast najprawdopodobniej następuje zmniejszenie się ilości filamentów pośrednich: wskazuje na to zarówno zmniejszenie ilości desminy w mięśniu (17, 50), jak też pośrednio, charakterystyczne dla odnerwionego mięśnia przemieszczenie organeli we włóknie (51, 52).

Przedstawione dane wskazują na zasadnicze znaczenie filamentów pośrednich dla prawidłowości struktury i pracy mięśnia. Znaczenie filamentów pośrednich i desminy we włóknie mięśniowym może polegać na: integracji przestrzeni, integracji ruchu, zachowaniu właściwej struktury i położenia organeli w czasie cyklu skurczowo-rozkurczowego, utrzymaniu mechanicznej wytrzymałości włókna mięśniowego, powodowaniu właściwego ułożenia linii Z w okresie miogenezy i regeneracji, udziału

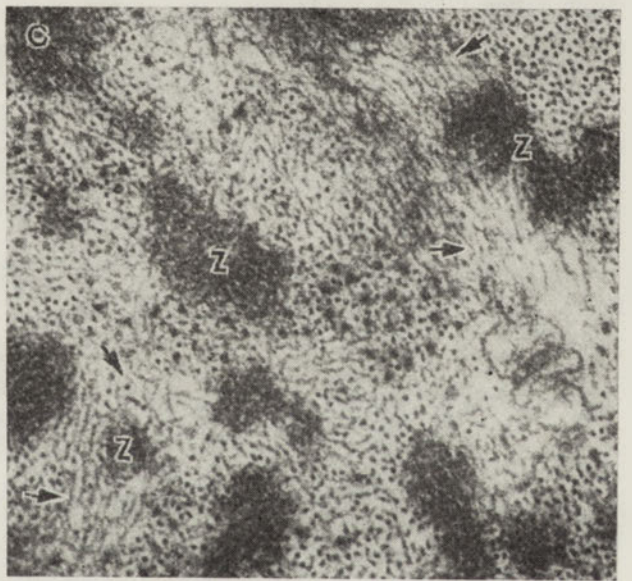
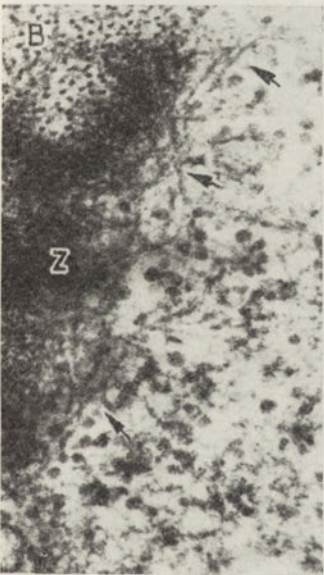
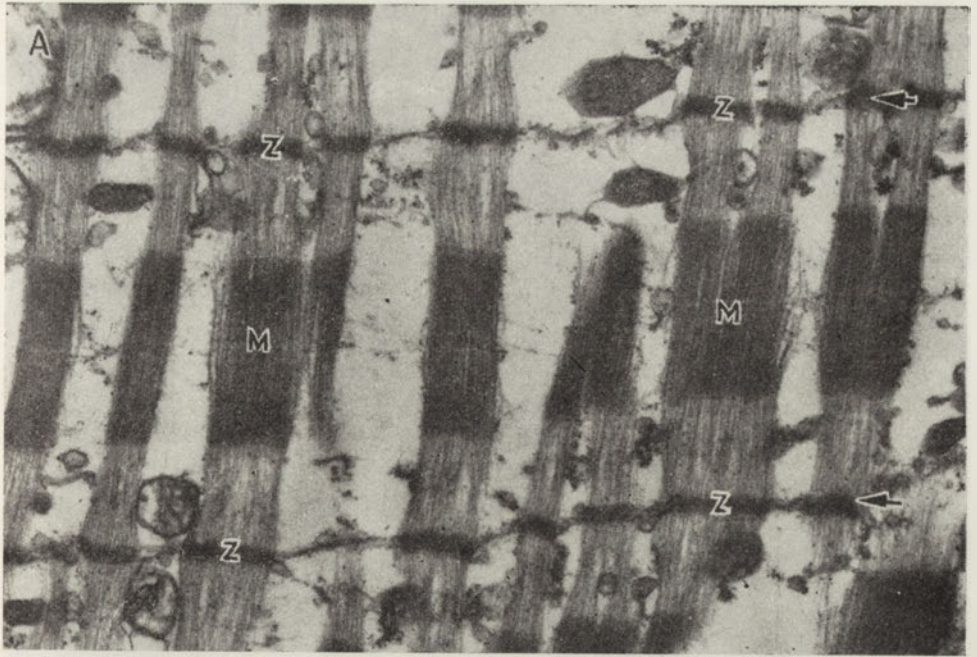
w biogenezie i właściwym ustawieniu przestrzennym triad, a być może także w wiązaniu aktywny przez desminę z układem filamentów pośrednich mięśnia gładkiego oraz z błonami komórek niemięśniowych (11, 17, 18, 25, 26).

Zaakceptowano do druku 30.3.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Ishikawa H., Bischoff R., Holtzer H., (1968), *J. Cell Biol.*, **38**, 538—555.
2. Kelly D. E., (1969), *Anat. Rec.*, **163**, 403—426.
3. Kelly D. E., Cahill M. A., (1972), *Anat. Rec.*, **172**, 623—642.
4. Maruyama K., Matsubara S., Natori R., Nonomura Y., Kimura S., Ohashi K., Murakami F., Handa S., Eguchi G., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 317—337.
5. Toyoda N., Maruyama K., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 239—241.
6. Ohashi K., Maruyama K., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 1103—1105.
7. Lazarides E., Hubbard B. D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 4344—4348.
8. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *J. Cell Sci.*, **23**, 243—268.
9. Huiatt T. W., Robson R. M., Arakawa N., Stromer M. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6981—6989.
10. Granger B. L., Lazarides E., (1979), *Cell*, **18**, 1053—1063.
11. Bennett P., (1979), *Nature*, **278**, 602—603.
12. Ferrans V. J., Roberts W. C., (1973), *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **5**, 247—257.
13. Behrendt H., (1977), *Cell Tiss. Res.*, **180**, 303—315.
14. Granger B. L., Lazarides E., (1978), *Cell*, **15**, 1253—1268.
15. Toh B. H., Lolait S. J., Mathy J. P., Baum R., (1980), *Cell Tiss. Res.*, **211**, 163—169.
16. Rash J. E., Biesele J. J., Gey G. O., (1970), *J. Ultrastruct. Res.*, **33**, 408—435.
17. Jakubiec-Puka A., Kulesza-Lipka D., Krajewski K., (1981), *Adv. Physiol. Sci.*, **24**, 333—339.
18. Lazarides E., (1980), *Nature*, **283**, 249—256.
19. O'Farrell P. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007—4021.
20. Gard D. L., Lazarides E., (1980), *Cell*, **19**, 263—275.
21. Lazarides E., Balzer D. R., (1978), *Cell*, **14**, 429—438.
22. Price M., Sanger J. W., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 318a.
23. Uehara Y., Campbell G. R., Burnstock G., (1971), *J. Cell Biol.*, **50**, 484—497.
24. Cooke P. H., Chase R. H., (1971), *Exp. Cell Res.*, **66**, 417—425.
25. Cooke P. H., Fay F. S., (1972), *J. Cell Biol.*, **52**, 105—116.
26. Cooke P. H., (1976), *J. Cell Biol.*, **68**, 539—556.
27. Somlyo A. P., Somlyo A. V., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 1288—1293.
28. Gabbiani G., Schmid E., Chaponnier C., Winter S., De Chastonay C., Franke W. W., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 374.
29. Franke W. W., Schmid E., Osborn M., Weber K., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5034—5038.
30. O'Shea J. M., Robson R. M., Huiatt T. W., Hartzler M. K., Stromer M. H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 972—980.





**Ryc. 1.** Regenerujący mięsień soleus szczura.

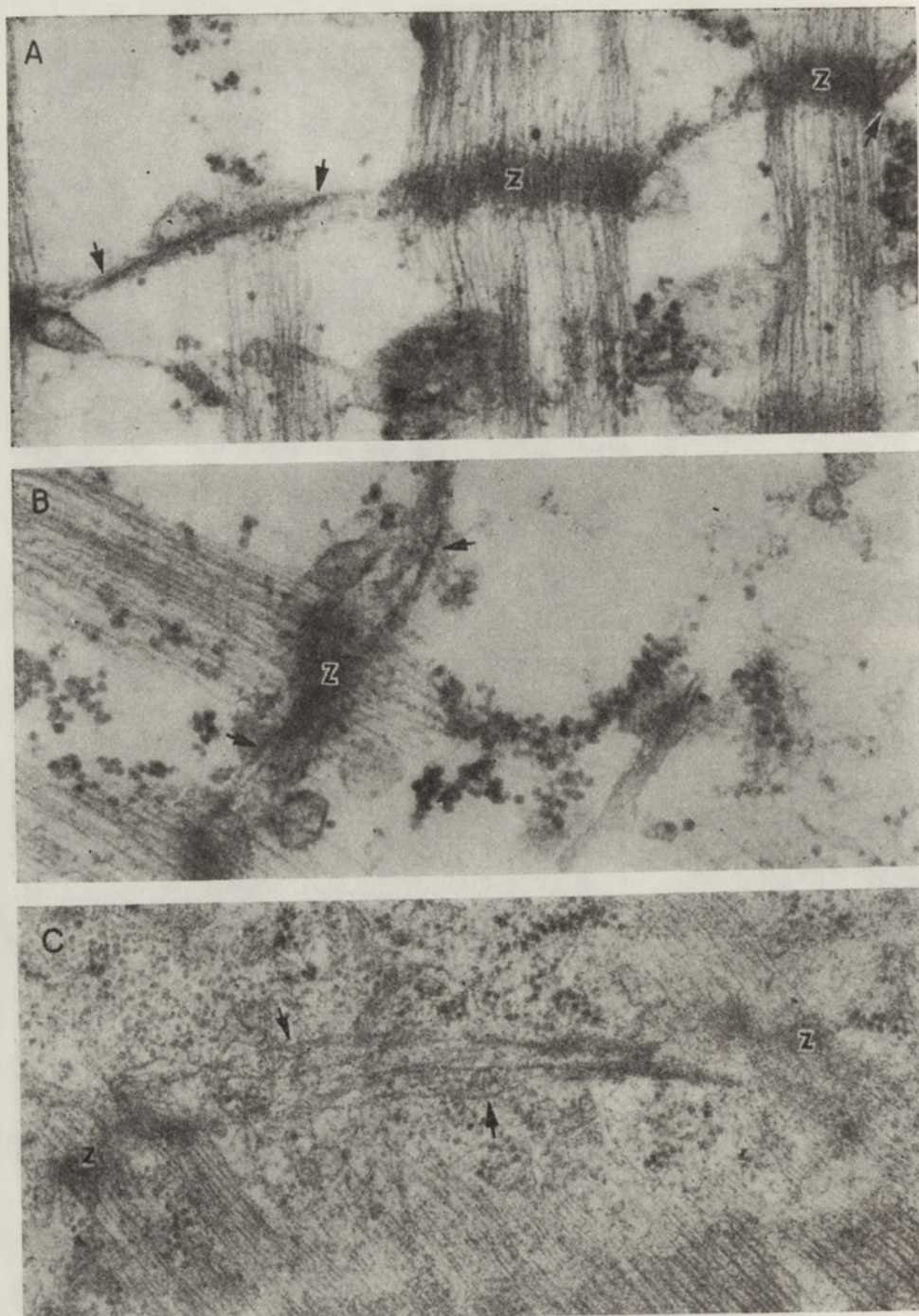
A. Przekrój podłużny mięśnia „glicerynowanego” (ekstrakcja roztworem gliceryny przed utwaleniem mięśnia stosowana jest celem lepszego uwidocznienia elementów struktury kurczliwej w obrazie mikroskopowym). Widoczne wyraźnie połączenia pomiędzy liniami Z (Z), tworzące wraz z nimi „płaszczyzny Z” (strzałki) oraz dyskretniejsze połączenia pomiędzy liniami M (M) sąsiadujących miofibryli. 22 000 X.

B. Przekrój poprzeczny okolicy podsarkolemalnej. Widoczna nieregularna linia Z (Z) oraz liczne filamenty pośrednie (strzałki). 57 000 X.

C. Przekrój poprzeczny. Liczne filamenty pośrednie (strzałki) otaczające i łączące nowotworzące się linie Z (Z). 80 000 X.

\* Preparat do mikroskopu elektronowego wykonany przez Zespół Pracowni Metabolizmu Białek Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.





**Ryc. 2.** Regenerujący mięsień *soleus* szczura. Przekroje podłużne.

- A. Mięsień glicerynowany, fragment Ryc. 1A. Widoczne filanty pośrednie (strzałki) pomiędzy liniami Z (Z) sąsiadujących miofibryli. 56 000 X.
- B. Mięsień glicerynowany. Widoczne filanty pośrednie (strzałki), łączące się z linią Z (Z). 50 000 X.
- C. Okolica podsarkolemalna. Widoczny pęczek filamentów pośrednich (strzałki) pomiędzy nieregularnymi liniami Z (Z), prawdopodobnie nowopowstałymi. 45 000 X.

\* Preparat do mikroskopu elektronowego wykonany przez Zespół Pracowni Metabolizmu Białek Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

31. Geisler N., Weber K., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **111**, 425—433.
32. Gard D. L., Bell P. B., Lazarides E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3894—3898.
33. Tuszyński G. P., Frank E. D., Damsky C. H., Buck C. H., Warren Z., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6138—6143.
34. Hubbard B. D., Lazarides E., (1979), *J. Cell Biol.*, **80**, 166—182.
35. Bennett G. S., Fellini S. A., Toyama Y., Holtzer H., (1979), *J. Cell Biol.*, **82**, 577—584.
36. Bennett G. S., Fellini S. A., Croop J. M., Otto J. J., Bryan J., Holtzer H., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4364—4368.
37. Aubin J. E., Osborn M., Franke W. W., Weber K., (1980), *Exp. Cell Res.*, **129**, 149—165.
38. Hynes R. O., Destree A. T., (1978), *Cell*, **13**, 151—163.
39. Wang C., Asai D. J., Lazarides E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1541—1545.
40. Czosnek H., Soifer D., Wiśniewski H. M., (1980), *J. Cell Biol.*, **85**, 726—734.
41. Lockwood A. H., (1978), *Cell*, **13**, 613—627.
42. Runge M. S., Detrich H. W., Williams R. C., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1689—1698.
43. O'Connor C. M., Balzer D. R., Lazarides E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 819—823.
44. Lazarides E., Granger B. L., Gard D. L., O'Connor C. M., Asai D. J., (1980), *Eur. J. Cell Biol.*, **22**, 368.
45. Eagles P. A. M., Gilbert D. S., Hopkins J. M., Maggs A., Wais C., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 731.
46. Dayton W. R., Reville W. J., Goll D. E., Stromer M. H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2159—2167.
47. Schollmeyer J. V., Dayton W. R., (1979), *J. Cell Biol.*, **83**, 318a.
48. Nelson W. J., Traub P., (1980), *Cell Biol. Int. Rep.*, **4**, 733.
49. Edström L., Thornell L-E., Eriksson A., (1980), *J. Neurol. Sci.*, **47**, 171—190.
50. Thornell L-E., Edström L., Eriksson A., Henriksson K-G., Ångqvist K-A., (1980), *J. Neurol. Sci.*, **47**, 153—170.
51. Gauthier G. F., Dunn R. A., (1973), *J. Cell Sci.*, **12**, 525—547.
52. Jakubiec-Puka A., Kulesza-Lipka D., Krajewski K., (1981), *Cell Tissue Res.*, **220**, 651—663.

## KOMUNIKAT

### **Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego**

Komitet Założycielski uprzejmie informuje, że zostało założone i rozpoczęło działalność POLSKIE TOWARZYSTWO NEFROLOGICZNE. Celem istnienia Towarzystwa jest:

- rozwijanie i propagowanie zdobyczy nauki w dziedzinie nefrologii, dializoterapii i transplantacji nerek,
- inspirowanie do twórczej pracy naukowej i stałego podnoszenia kwalifikacji zawodowych,
- współdziałanie w organizowaniu społecznej służby zdrowia w zakresie kompetencji Towarzystwa,
- współdziałanie w kształcaniu internistów i innych lekarzy w zakresie nefrologii.

Członkiem zwyczajnym Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego może być lekarz lub pracownik naukowy innej specjalności zainteresowany lub działający w dziedzinie nefrologii.

Siedzibą Komitetu Założycielskiego Polskiego Towarzystwa Nefrologicznego (do czasu Walnego Zjazdu i wyboru Zarządu) jest II Klinika Chorób Wewnętrznych Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi, ul. Żeromskiego 113. Zainteresowanych prosimy o nadsyłanie zgłoszeń z podaniem: nazwiska i imienia, stopnia naukowego, stanowiska, dokładnego adresu miejsca pracy i zamieszkania, numerów telefonów.

Wysokość składki członkowskiej wynosi 200 zł rocznie.

Polskie Towarzystwo Nefrologiczne działać będzie niezależnie od Sekcji Nefrologicznej Towarzystwa Internistów Polskich.

ZA KOMITET ZAŁOŻYCIELSKI  
Prof. dr hab. med. K. Trznadel



ZYGMUNT MACHOY \*

## Wpływ związków fluoru na enzymy oddechowe

### The Effect of Fluorine Compounds on the Respiratory Enzymes

#### Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Mechanizm oddziaływania związków fluoru z enzymami oddechowymi
  - II-1. Enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego
  - II-2. Peroksydazy i katalaza
  - II-3. Oksydazy miedzioproteidowe
- III. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Mechanism of interaction of fluorine compounds with the respiratory enzymes
  - II-1. Enzymes of the mitochondrial respiratory chain
  - II-2. Peroxidases and catalase
  - II-3. Terminal copper containing oxidases
- III. Final remarks

#### I. Wprowadzenie

Fluor należy do pierwiastków, których rola i znaczenie dla organizmów żywych budzi zainteresowanie specjalistów z różnych dziedzin nauki. Po masowym zatruciu związkami fluoru ludzi i zwierząt w Meuse Valley jednym z pierwszych zadań było ustalenie dawek toksycznych (1). Dalsze badania potwierdziły wpływ fluorków na przebieg wielu podstawowych procesów metabolicznych cukrowców, białek i lipidów. Do grupy enzymów wrażliwych na fluorki należą także enzymy oddechowe (2, 3).

W niniejszym artykule przedstawiono dane dotyczące mechanizmów oddziaływania związków fluorowych z enzymami oddechowymi. Badano między innymi: oksydazę cytochromową, dehydrogenazę bursztynianową,

\* Doc. dr hab., Zakład Chemii Fizjologicznej, Instytut Fizjologiczno-Chemiczny, Pomorska Akademia Medyczna, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin.

dehydrogenazę NADH, lakkazę, peroksydazę, oksydazę askorbinianową, dehydrogenazę jabłczanową, ceruloplazminę i polifenyllooksydazę. Z wyjątkiem dehydrogenazy jabłczanowej wymienione enzymy zawierają w swej cząsteczce żelazo lub miedź, względnie oba te pierwiastki jednocześnie. Zdaniem wielu autorów interakcja fluoru z żelazem i fluoru z miedzią ma związek z hamowaniem aktywności tych enzymów. Wiadomo też, że anion fluorkowy należy do ligandów o dużych skłonnościach do kompleksowania (4), w szczególności atomów lub jonów wapnia i żelaza (2, 5).

## II. Mechanizm oddziaływania związków fluoru z enzymami oddechowymi

### II-1. Enzymy mitochondrialnego łańcucha oddechowego

Hamowanie pobierania tlenu przez preparat mięśnia sercowego po dodaniu do niego fluorków zaobserwowali po raz pierwszy w 1939 roku Keilin i Hartree (6), którzy efekt ten wiązali z działaniem na poziomie oksydazy cytochromowej. Wyniki te potwierdził następnie Borei (7).

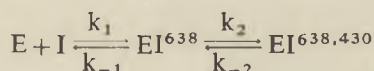
Oksydaza cytochromowa (cytochrom  $a_3$ ) jest enzymem składającym się z siedmiu białkowych podjednostek i zawiera dwa atomy miedzi i dwa hemy. Katalizuje ona szybką, czteroelektronową redukcję molekularnego tlenu do wody (8-10).

Wpływ jonu fluorkowego na aktywność oksydazy cytochromowej badano spektrofotometrycznie stosując zmienne ilości cytochromu c i różne stężenia fluorku potasu (11). Enzym poddano preinkubacji z fluorkiem, a następnie dodano do niego zmienne ilości cytochromu c bez fluorku. W drugiej serii pomiarów do preinkubowanego enzymu z fluorkiem dodano cytochrom c z określoną ilością fluorku. Końcowe stężenia fluorku w roztworach obu serii były jednakowe. Autorzy powyższego doświadczenia stwierdzili, że fluorek reprezentuje mieszany typ inhibitora. Stała inhibicji w przypadku fluorku i enzymu wynosiła  $K_i = 10$  mM, a stała w przypadku fluorku i kompleksu enzymu z cytochromem c odpowiednio  $K_i = 35$  mM.

Analiza spektrofotometryczna oksydazy cytochromowej, po dodaniu 100 mM fluorku, wykazała niewielkie przesunięcia w widmie utlenionego enzymu (11). Zmiany te wynosiły około 3% i okazały się niewystarczające, aby podtrzymać wcześniejszą interpretację Keilina i Hartree'ego (6). Autorzy ci uważali bowiem, że utleniona forma cytochromu  $a_3(\text{Fe}^{3+})$  wiąże się z fluorkami w podobny sposób, jak z cyjankami, siarczkami, azydami i hydroksylaminą. Zdaniem Muijsersa i współpracowników (11) fluorek nie wiąże się bezpośrednio z żelazem hemowym, lecz wpływa na zakłócenia obszaru pola ligandu. Stabilizacja

pola ligandu jest jednym z czynników odzwierciedlających stabilność kompleksu (4). Potwierdzeniem sugestii Muijsersa mogą być obserwacje poczynione przez Wilsona i współpracowników (12) wykazujące, że widmo EPR (elektronowy rezonans paramagnetyczny) utlenionego enzymu nie zmienia się w obecności fluorków. Jest to zgodne także z innymi badaniami dotyczącymi wpływu szeregu anionów na intensywność widma EPR. Autorzy cytowanego wyżej doniesienia (12) badali interakcję nieorganicznych anionów z atomami miedzi oksydazy cytochromowej. Sklasyfikowali oni fluorek jako ligand nieznacznie oddziaływający na enzym, w przeciwieństwie do grupy innych anionów zmieniających środowisko wokół miedzi lub powodujących jej redukcję (13).

Dane kinetyczne ukazały dość skomplikowany obraz oddziaływania fluorków z oksydazą cytochromową i pozwoliły wyróżnić tu trzy rodzaje reakcji. W tych badaniach szybkość reakcji fluorków dodanych do izolowanej oksydazy cytochromowej analizowano spektrofotometrycznie przy dwóch różnych długościach fali, a mianowicie 638 nm i 430 nm. Reakcja 1 przejawia się w szybko zachodzących zmianach absorpcji przy 638 nm. Reakcji 3 przypisano pozostałe 10-20% zmian absorpcji przy 638 nm postępujących bardzo wolno w czasie  $t_{1/2} = 800$  sekund. Reakcja wymieniona jako 1 powodowała także zmiany absorpcji przy 430 nm. Była to reakcja I rzędu zależna od stężenia fluorków. Jako reakcję 2 przyjęto reakcję niezależną od stężenia fluorków. Rejestrowano ją wyłącznie przy 430 nm i przy obecności w roztworze ponad 100 mM fluorków. Przebieg reakcji fluorków z oksydazą cytochromową ilustruje następujący schemat:



gdzie E oznacza wolny enzym, I — inhibitor (fluorek),  $EI^{638}$  — szybko tworzący się kompleks enzym-fluorek,  $EI^{638,430}$  — końcowy kompleks enzym-fluorek.

Zastosowanie wykresu Hilla opisującego stan równowagi między enzymem i jego kompleksem nie rozwiązało wątpliwości, czy 1 mol fluorku jest związany przez 1 mol enzymu, czy też przez 1 mol hemu (oksydaza cytochromowa zawiera 2 hemy). Na podstawie podobieństwa wiązania się innych ligandów z oksydazą cytochromową można wnioskować o słuszności pierwszej możliwości (mol fluoru na mol enzymu) (11).

Przy porównywaniu reakcji fluorków i azydków z oksydazą cytochromową podniesiono zagadnienie zmian konformacyjnych indukowanych przez wiązanie się enzymu z ligandami (14). Yoshikawa i Orii (15) badali inhibitorowy wpływ różnych liganów i zaproponowali model, w którym dwie możliwe konformacje oksydazy cytochromowej znajdują się w stanie równowagi, ale tylko jedna z nich jest zdolna do reakcji z ligandami, w tym z fluorkiem.

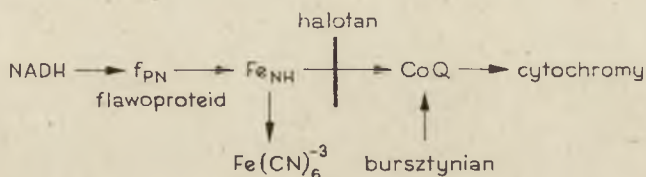


Zachowanie się dehydrogenazy bursztynianowej wzbudziło szczególne zainteresowanie przy określaniu wpływu związków nieorganicznych i organicznych fluoru na hamowanie aktywności tego enzymu (16). Mechanizm hamowania aktywności tej dehydrogenazy przez związki fluoru jest nadal nie jasny (17). W 1951 roku Slater określił fluorek jako kompetycyjny inhibitor dehydrogenazy bursztynianowej. Zauważył on także, że stopień inhibicji powodowany przez fluorki wzrasta w obecności fosforanu (18). W celu wyjaśnienia działania fluorku na dehydrogenazę bursztynianową Sullivan (17) przeprowadził badania *in vitro* i *in vivo* podając szczurom przez 9 miesięcy różne ilości fluorków w wodzie do picia. Badania *in vitro* miały udzielić informacji o bezpośrednim wpływie fluorków na dehydrogenazę bursztynianową, a badania *in vivo* uwzględniały jednocześnie wpływ innych, choć nie sprecyzowanych przez autora, układów enzymatycznych. Większe hamowanie aktywności enzymu rejestrowano w badaniach *in vitro*, a w różnicowaniu narządowym większe hamowanie wykazano dla dehydrogenazy bursztynianowej nerki niż wątroby. Metody cytochemiczne potwierdziły znaczące zmiany aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach zwierzęcych narażonych na wpływ związków fluoru (19).

Badano również oddziaływanie kwasów fluorobursztynowych w reakcji z dehydrogenazą bursztynianową (16, 20). Metabolizowany w ustroju monofluorobursztynian tworzył fumaran eliminując jednocześnie ze swej cząsteczki fluorowodór. Dwufiuorobursztynian tworzył fluorofumaran poprzez enzymatyczną jak i nieenzymatyczną eliminację fluorowodoru. Fluorofumaran prowadził zawsze do wytworzenia fluorojabłczanu, a ten przez nieenzymatyczne usunięcie fluorowodoru przechodził w szczawiooctan. Dwu-, trzy- i perfluorobursztyniany oraz mono- i dwufiuorofumarany działały jako kompetycyjne inhibitory utleniania bursztynianu. Przejście 2,2-dwufiuorobursztynianu w monofiuorofumaran katalizowane przez dehydrogenazę bursztynianową przebiegało z  $V_{max}$  równą 0,25% i  $K_m$  15 razy wyższą niż w przypadku bursztynianu. DL-monofiuorobursztynian był także utleniany przez dehydrogenazę bursztynianową z  $V_{max} = 45\%$  w porównaniu z bursztynianem i  $K_m$  odpowiednio 5 razy wyższą. L-monofiuorobursztynian posiadał  $V_{max}$  zbliżoną do bursztynianu.

W toku systematycznych badań wykazano, że halotan (trójfluorobromochloroetan), związek fluoroorganiczny zaliczany do środków znieczulających, hamuje szereg procesów mitochondrialnych takich jak oddychanie, fosforylacja i zdolność do translokacji jonów (21-23). Materiałem w tych badaniach były między innymi mitochondria serca wołu, mitochondria wątroby szczura i cząstki submitochondrialne przenoszące elektrony (ETP). W stanie oddechowym III halotan hamował utlenianie substratów zależnych od NAD. Obszar tego hamowania przez halotan zlokalizowano w pobliżu, lub w miejscu działania, takich inhibitorów

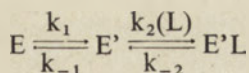
jak rotenon lub amytal. Przemawia za tym hamowanie przez halotan utleniania NADH w ETP, brak hamowania utleniania bursztynianu i brak hamowania reduktazy NADH-żelazicyjanek. Ponieważ żelazicyjanek jest akceptorem elektronów niehemowego żelaza  $Fe_{NH}$ , składnika kompleksu I łańcucha oddechowego, inhibicja przez halotan, podobnie jak i przez rotenon, dotyczy miejsca między żelazem niehemowym a koenzymem Q zgodnie ze schematem podanym przez Harrisa (21): hamowanie po-



wyższe jest całkowicie odwracalne przy niskich stężeniach tego anestetyku (2 mM). Podobny przebieg hamowania wykazują także inne anestetyki, a także rozpuszczalniki organiczne (metoksyfluran, fluorksen, chloroform, czterochlorek węgla, oktanol i eter dwuetylowy). Mechanizm hamowania przez te rozpuszczalniki transportu elektronów opisali wcześniej Redfearn i King (24). Wykazali oni, że szereg rozpuszczalników organicznych inaktywuje składowe oksydazy NADH w preparatach Keilina-Hartree'ego, a jednocześnie wcale, lub w niewielkim stopniu, oddziałuje na proces utleniania bursztynianu. Hamowanie transportu elektronów przez halotan wiązano z jego oddziaływaniem na zewnętrzny hydrofobowy obszar kompleksu I.

## II-2. Peroksydazy i katalaza

Przedmiotem badań wiązania fluorków z peroksydazami były peroksydazy rzodkiewki, otrzymane na drodze rekonstrukcji z apoprotein i szeregu nienaturalnych hemów oraz dwie izoperoksydazy rzepy oznaczone jako  $P_1$  i  $P_7$  (25, 26). Różnice w budowie peroksydazy  $P_1$  i  $P_7$  dotyczyły usytuowania grup karboksylowych i reszt histydylowych w sąsiedztwie poszczególnych hemów. Grupy te swoją zdolnością do jonizacji, zwłaszcza przy zmiennych wartościach pH, mogą wpływać na kinetykę wiązania fluorków przez te hemoproteinowe enzymy. Wiązanie fluorków z peroksydazami ma miejsce w osiowej pozycji koordynacyjnej 6 żelaza, które to miejsce normalnie zajmuje cząsteczka wody (ligand wodny). Proces wiązania się ligandu z enzymem jest procesem dwustopniowym:





E — oznacza peroksydazę, E' — peroksydazę po usunięciu cząsteczki wody, EL — kompleks peroksydaza — ligand.

W pierwszym etapie następuje usunięcie cząsteczki wody, co jest procesem stosunkowo powolnym. Drugi etap dotyczy tworzenia kompleksu enzym-ligand. Jeśli jest to proces szybki, to powyższe równanie kinetyczne ulega odpowiednio uproszczeniu, ponieważ wtedy dwuetapowy proces jest rejestrowany jako jednoetapowy. Ogólny wniosek, jaki autorzy wyprowadzili z tych badań, dotyczy zasadniczych różnic kinetycznych w trakcie wiązania się ligandu z izoenzymami. Proces wiązania się peroksydazy P<sub>1</sub> z fluorkiem jest procesem tak szybkim, że nie można go badać nawet przy użyciu techniki *stopped-flow*. Wiązanie fluorków przez P<sub>7</sub> jest procesem dużo wolniejszym i złożonym z 3 pośrednich reakcji. Pierwsza reakcja, szybsza od dwóch następnych, polega na wiązaniu enzymów z fluorkiem. Dwie pozostałe reakcje dotyczą procesu izomeryzacji kompleksu enzym-fluorek, a zwłaszcza zmian konformacyjnych tego kompleksu. Wcześniej doniesiono o możliwościach podobnych zmian konformacyjnych w przypadku innych hemoprotein, a mianowicie peroksydazy cytochromu c (27) oraz oksydazy cytochromowej (11, 15).

Zależność wiązania anionu fluorkowego przez peroksydazy P<sub>1</sub> i P<sub>7</sub> zależy od liczby i rodzaju grup zjonizowanych w izoenzymach, a tym samym od pH. Przyjmuje się, że P<sub>1</sub> ma dwie grupy zjonizowane a forma P<sub>7</sub> posiada conajmniej trzy takie grupy. Reaktywność liganda zależy od tego, czy on sam jest związkami jonowym, czy też występuje w formie niezjonizowanej. Na podstawie badań kinetycznych oddziaływania peroksydazy cytochromu c z fluorkiem wnioskowano, że w zakresie pH od 2,5 do 8,0 za jedynie reaktywną formę liganda uważa się kwas fluorowodorowy (28). Dane kinetyczne uzyskane w badaniach peroksydazy mleka także przemawiały za wiązaniem się z enzymem wolnego kwasu fluorowodorowego (29). Badając kinetykę wiązania fluorków przez peroksydazy rzodkiewki próbowano wyjaśnić mechanizm tego wiązania jako protonację zależną od pH. Według tych założeń z dwóch protonów znajdujących się w pobliżu hemu tylko jeden miał być zastąpiony przez ligand (30).

Dla zlokalizowania miejsca wiązania fluorku przez katalazę zastosowano metodę <sup>1</sup>H-NMR (protonowy jądrowy rezonans magnetyczny) i EPR (31, 32). Przy wyjaśnianiu mechanizmu powstawania kompleksu katalaza-fluorek, podobnie jak w przypadku peroksydaz, rozpatrywano możliwości różnej lokalizacji protonów wokół żelaza hemowego. Po dodaniu fluorków, a także innych ligandów do enzymu obserwowano znaczne podwyższenie wartości czasów relaksacji <sup>1</sup>H-NMR. Niektórzy badacze uważali, że zmiany <sup>1</sup>H-NMR są związane z udziałem w tym procesie cząsteczki wody zajmującej 6 pozycję koordynacyjną żelaza hemowego katalazy (32, 33). Inni natomiast uważali iż większe znaczenie dla <sup>1</sup>H-NMR mają protony z innych dostępnych źródeł, a nie protony z cząsteczki wody. Tak więc rola fluorku w tym procesie polegać miała na zwiększe-

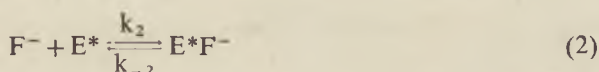
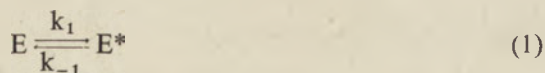


niu liczby protonów lub zmniejszeniu odległości międzyspiniowej protonów w wyniku konformacji lub w wyniku zmiany hydratacyjnej białka enzymatycznego.

### II-3. Oksydazy miedzioproteidowe

Lakkaza, podobnie jak ceruloplazmina i oksydaza askorbinianowa, zawiera trzy rodzaje jonów miedziowych związanych odmiennie z białkiem enzymatycznym (34). W utlenionej postaci enzymu jeden jon miedzi określono jako „typ 1  $\text{Cu}^{2+}$ ”, drugi jon jako „typ 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” (oba wykrywalne przy użyciu EPR) oraz jako formę złożoną przypuszczalnie z silnie powiązanej pary  $\text{Cu}^{2+} - \text{Cu}^{2+}$  (niewykrywalnej przez EPR) (35). Szczególne zainteresowanie budzi „typ 2  $\text{Cu}^{2+}$ ”, ponieważ uważa się, że w lakkazie nie zmienia wartościowości w czasie reakcji katalitycznej. Ponadto „typ 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” wykazuje wysokie powinowactwo do wielu anionów, w tym do jonu fluorkowego (36). Wiązanie się jednego względnie dwóch atomów fluorku z „typem 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” w lakkazie grzybowej zostało wcześniej wykazane analizą EPR (37). W tej reakcji nie rejestrowano jednak zmian w widmie absorbcyjnym. Dopiero widma różnicowe wykonane w odpowiednich warunkach (pH 5,5) wykazały obniżenie maksimum absorpcji przy 600 nm i 380 nm oraz podwyższenie przy 320 nm. Podwyższenie maksimum absorpcji przy 320 nm było w tych doświadczeniach zawsze powtarzalne (36). Analiza absorpcji przy 320 nm i widm EPR potwierdziła, że po okresie inkubacji fluorków z lakkazą przez 5 godzin w temperaturze pokojowej, związanie się jednego równoważnika fluorku powoduje wzrost absorpcji w 320 nm, a przyłączenie drugiego fluorku do „typu 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” ma bardzo mały wpływ lub jest bez wpływu na tę absorpcję.

Badania kinetyczne wykonane przy długościach fal 600, 420 i 320 nm potwierdziły, że szybkości wiązania fluorku przez preparaty lakkazy wyosobnionej z różnych źródeł są różne. Ustalenie się absorpcji przy 320 nm w stosowanych warunkach badania lakkazy grzybowej osiągnięto już po jednej godzinie. Jest to reakcja I-rzędu z uwagi na nieskompleksowany enzym i jest ona niezależna od ilości fluorku w zakresie 1-2 równoważników. Te same wyniki w szybkości wiązania fluorków przez lakkazę potwierdzono metodą potencjometryczną przy użyciu elektrody fluorkowej. Na podstawie powyższych obserwacji zaproponowano prosty schemat kinetyczny:



gdzie E oznacza enzym natywny niezdolny do wiązania fluorków ( $F^-$ ),  $E^*$  — formę aktywną enzymu w wiązaniu fluorków,  $E^*F^-$  — enzym z związanym fluorkiem do „typu 2  $Cu^{2+}$ ” enzymu.

Reakcją ograniczającą szybkość jest reakcja pierwsza ze stałą szybkości  $k_1 = 9 \cdot 10^{-4} \text{ sek}^{-1}$ . Z podsumowania doświadczeń Brändena i współautorów (36) wynika, że fluorek jest inhibitorem lakkazy. Kompleksuje on 90-100% miedzi oznaczonej jako „typu 2  $Cu^{2+}$ ” po inkubacji 0,17 mM enzymu przez 24 godziny w  $4^\circ C$  w obecności jednego równoważnika. W obecności 10 równoważników fluorków „typ 2  $Cu^{2+}$ ” reaguje z dwoma jonami fluorkowymi.

Ceruloplazmina należy do tej samej grupy miedziowych oksydaz co lakkaza (34). Mimo ich zbliżonych właściwości fizykochemicznych hamowanie aktywności ceruloplazminy przebiegało w obecności fluorków w sposób nieco inny niż dla lakkazy (36). Interakcja fluorków z miedzią „typ 2  $Cu^{2+}$ ” ceruloplazminy była dużo wolniejsza niż w przypadku lakkazy i wymagała do uzyskania jakichkolwiek zmian spektralnych dużego nadmiaru fluorków. Przy wysokich stężeniach fluorków maksymalnie dwa jony fluorkowe mogą być związane przez dwa jony miedzi w formie „typ 2  $Cu^{2+}$ ” ceruloplazminy (38). Wiązanie fluorków jest zależne od pH i ma miejsce tylko przy niskim pH medium (pH 5,5).

Oksydaza askorbinianowa, podobnie jak ceruloplazmina, zawiera dwa razy więcej miedzi niż lakkaza, a więc przypuszczano, że ma dwa razy więcej miejsc aktywnych niż lakkaza (39). Te badania dotyczące zawartości miedzi przeprowadzono metodą EPR i widm spektrofotometrycznych. Nie wchodząc w szczegóły złożonego katalitycznego mechanizmu działania tych oksydaz (40-42) przyjmuje się obecnie, że fluorek, podobnie jak azydek, wiąże się z miedzią w postaci „typ 2  $Cu^{2+}$ ” i że ta forma miedzi jest także częścią miejsca wiązania substratu (askorbinianu). Fluorek hamuje aktywność enzymu kompetycyjnie względem askorbinianu, a niekompetycyjnie względem tlenu (43). Stała wiązania dla fluorku, jako inhibitora kompetycyjnego, wynosi  $1640 \text{ M}^{-1}$ , a stała wiązania dla fluorku, jako inhibitora niekompetycyjnego względem tlenu, wynosi  $435 \text{ M}^{-1}$ . Odpowiednie stałe Michaelisa uzyskane dla natywnego enzymu i kwasu askorbinowego przy  $250 \mu\text{M}$  tlenie wynoszą  $4,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , a przy  $750 \mu\text{M}$  askorbinianie dla tlenu wynoszą  $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ . Miareczkowanie enzymu fluorkami nie powodowało znaczniejszych zmian w zakresie widma widzialnego. Jedynie niewielkie odchylenia zaznaczyły się przy długościach 380 nm i 310 nm przy stężeniu fluorków rzędu  $10^{-3} \text{ M}$ . Fluorek, podobnie jak azydek, wiąże się z enzymem aczkolwiek w sposób nieco odmienny. Fluorek wiąże się silniej z enzymem w jego tzw. fazie spoczynkowej, podczas gdy azydek wiąże się silniej w formie czynnej enzymu czyli w toku aktywności katalitycznej. Mniejszy wymiar anionu fluorkowego niż azydkowego nie pociąga za sobą zmian konformacyjnych w czasie wędrówki anionu do miejsca wiązania w enzy-

mie. Obserwowano także, że w reakcji enzymatycznej „typ 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” jest wolniej redukowany w obecności fluorków niż bez fluorków (43), ponieważ reduktor współzawodniczy z fluorkiem w tym procesie. Fluorek można także łatwiej oddializować z kompleksu fluorek-lakkaza wobec buforu zawierającego askorbinian (44). Askorbinian konkuruje wtedy z fluorkiem o miejsce wiązania z miedzią „typu 2  $\text{Cu}^{2+}$ ” i powoduje usuwanie fluorku z kompleksu enzymatycznego.

Pierwsze przypuszczenia dotyczące pośredniego wpływu fluorków na roślinną polifenylooksydazę poczyniono na podstawie badań cytochemicznych. Badanie metodą mikroskopii elektronowej potwierdziło uszkadzający wpływ fluorków na organelle komórkowe i związane z nimi enzymy. Spektrofotometryczne badania wyciągów z liści tytoniu, narażonego przez szereg tygodni na działanie fluorowodoru wykazały wzrost aktywności polifenylooksydazy i peroksydazy (45).

### III. Uwagi końcowe

Nasze wiadomości o oddziaływaniu fluorków na inne enzymy oddechowe są dość skąpe. Wiadomo, że wolny fluor hamuje aktywność dehydrogenazy jabłczanowej i dehydrogenazy cytrynianowej w mniejszym zakresie, niż fluorek sodowy i fluorek amonowy (3). Ponadto kwas beta-fluoroszczawiooctowy jest kompetycyjnym inhibitorem dehydrogenazy jabłczanowej (46).

Z dotychczasowych badań wynikają pewne wspólne spostrzeżenia dotyczące wpływu fluorków na poszczególne enzymy. Na przykład należy tu wymienić podobne równania kinetyczne sugerujące zbliżone mechanizmy przebiegu omawianych procesów. Także aktywności enzymów oddechowych są z reguły hamowane przez fluorki. Grupa miedzioproteinowych oksydaz posiada w swych cząsteczkach w podobny sposób wbudowane atomy miedzi i wykazuje zbliżone właściwości w odniesieniu do reakcji z fluorkami (wyjątek stanowi polifenylooksydaza). Badania wpływu fluorków na aktywności enzymów oddechowych były w wielu przypadkach prowadzone równoległe z takimi inhibitorami jak cyjanki i azydki. Azydki i fluorki wykazywały wiele podobnych cech, co nasuwało przypuszczenie, że model kinetyczny ich oddziaływania z enzymami jest podobny. Na podstawie dotychczasowych obserwacji nie udało się jednak ustalić prostej zależności między zdolnością fluorków do kompleksowania metali a zmianami aktywności enzymów metaloproteinowych.



## PIŚMIENNICTWO

1. Roholm K., (1937), *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.*, **19**, 126—137.
2. Gumiński S., (1971), *Oddychanie roślin*, str. 94—98, PWN Warszawa.
3. Il'kun G. M., Drokova I. G., (1975), *Tsentr. Resp. Bot. Sad.*, Materiały Naukowej Konferencji, red. Kondratyuk E. N., str. 85—88.
4. Burger K., (1973), *Organic Reactions in Metal Analysis*, str. 15—47, Akademiai Kiado, Budapest.
5. Berry R. J., (1969), *Fluoride*, **2**, 157—167.
6. Keilin D., Hartree E. F., (1939), *Proc. R. Soc., London*, ser. B., **127**, 167—191.
7. Borei H., (1945), *Ark. Kem., Mineral. Geol. Bd 20A*, No. 8. (cyt. wg (11)).
8. Merle P., Kadenbach B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **105**, 499—507.
9. Wikström M. K. F., Krab K., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 177—222.
10. Malmström B. G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 281—303.
11. Muijsers A. O., van Buuren K. J., van Gelder B. F., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 430—438.
12. Wilson D. F., Leigh J. S. jr., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 154—163.
13. Pogosyan G. G., Pajtyan N. A., Nalbandyan R. M., (1979), *Biochimia* **44**, 845—850.
14. Muijsers A. O., Tiesjema R. A., van Gelder B. F., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **234**, 481—492.
15. Yoshikawa S., Orii Y., (1972), *J. Biochem., Tokyo* **71**, 859—872.
16. Tober C. L., Nicholls P., Brodie J. D., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 506—514.
17. Sullivan W. D., (1969), *Fluoride*, **2**, 168—175.
18. Slater E. C., Bonner W. D., (1951), *Biochem. J.*, **49**, 1—12.
19. Makowa A., (1974), *Rozprawa doktorska*, PAM Szczecin.
20. Brodie J. D., Nicholls P., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 423—437.
21. Harris R. A., Munroe J., Farmer B., Kim K. C., Jenkins P., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 435—444.
22. Cohen P. J., Marshall B. E., Lecky J., (1969), *Anesthesiology*, **30**, 337.
23. Hoech G. P. jr., Matteo R. S., Fink B. R., (1966), *Anesthesiology*, **27**, 770—777.
24. Redfearn E. R., King T. S., (1964), *Nature*, **202**, 1313—1316.
25. Makino R., Yamazaki I., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **157**, 356—368.
26. Job D., Ricard J., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 427—437.
27. Erman J. E., (1974), *Biochemistry*, **13**, 39—44.
28. Lent B., Conroy C. W., Erman J. E., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 56—61.
29. Segal R., Dunford H. B., Morrison M., (1968), *Can. J. Biochem.*, **46**, 1471—1474.
30. Dunford H. B., Alberty R. A., (1967), *Biochemistry*, **6**, 447—451.
31. Vuk-Pavlovic' S., Williams-Smith D. L., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5465—5470.
32. Lanir A., Schejter A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2590—2596.
33. Hershberg R., Chance B., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3885—3891.
34. Malmström B. G., Reinhammar B., Vänngard T., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **156**, 67—79.
35. Fee J. A., Malkin R., Malmström B. G., Vänngard T., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4200—4207.

36. Bränden R., Malmström B. G., Vänngard T., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 195—200.
37. Malkin R., Malmström B. G., Vänngard T., (1968), *FEBS Lett.*, **1**, 50—54.
38. Dawson J. N., Dooley D. M., Gray H. B., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **75**, 4078—4081.
39. Strothkamp K. G., Dawson C. R., (1974), *Biochemistry*, **13**, 434—440.
40. Yamazaki I., Piette L. H., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 62—69.
41. Broman L., Malmström B. G., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **75**, 365—376.
42. Malmström B. G., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 15P—16P.
43. Strothkamp E., Dawson C. R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1926—1929.
44. Bränden R., Malmström B. G., Vänngard T., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 238—241.
45. Lhoste A. M., (1979), *Fluoride*, **12**, 33—38.
46. Kun E., Grasseti D. R., Fanshier D. W., Featherstone R. M., (1958), *Biochem. Pharmacol.*, **1**, 207—212.

## KOMUNIKAT

Szczecińskie Towarzystwo Naukowe opublikowało z dużym opóźnieniem materiały sympozjum PTBiochemicznego „*Metabolizm fluoru*”. Zainteresowani kupnem wydawnictwa (220 stron) mogą je zamówić w biurze Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego, Al. Wojska Polskiego 96, 70-481 Szczecin, tel.: 23-18-62.



ANNA PRZYKORSKA \*

## Zastosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny

### Application of Nucleolytic Enzymes in the Studies of Chromatin Structure

#### Spis treści

- I. Podjednostkowa budowa chromatyny
- II. Badanie struktury rdzenia nukleosomu
- III. Badanie ponadnukleosomowej struktury chromatyny
- IV. Rozmieszczenie białek nukleosomów wzdłuż nici DNA
- V. Badanie struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie
- VI. Badanie struktury chromatyny w stadium replikacji

#### Contents

- I. Subunit structure of chromatin
- II. Investigations on the structure of nucleosomal core
- III. Studies on the supernucleosomal chromatin structure
- IV. Arrangement of the nucleosomal proteins alongside the DNA strand
- V. Investigations on the structure of transcriptionally active chromatin
- VI. Studies on the structure of chromatin during replication

Stosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny ma już wieloletnią tradycję. Pionierami tych badań byli Clark i Felsenfeld (1), którzy w 1971 r. wykazali, że około połowa DNA w chromatynie jest podatna na działanie nukleazy ze *Staphylococcus*. Kolejne prace tych i innych badaczy stopniowo dostarczały nowych danych na temat działania enzymów nukleolitycznych na chromatynę. Dane te w powiązaniu z wynikami uzyskanymi przy użyciu innych metod pozwoliły skonstruować przejrzysty model budowy chromatyny spoczynkowej, a także uzyskać pewne wiadomości na temat struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie i chromatyny w stadium replikacji.

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

Pewne informacje na temat zastosowania enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny można znaleźć w artykułach przeglądowych publikowanych już wcześniej w „Postęпах Biochemii” (2, 3, 4).

## I. Podjednostkowa budowa chromatyny

Enzymy nukleolityczne odegrały decydującą rolę w ustaleniu przyjętego powszechnie modelu podjednostkowej struktury chromatyny organizmów eukariotycznych. Chromatyna komórek eukariotycznych stanowi nukleoproteinowy kompleks, w skład którego wchodzi DNA, RNA, białka histonowe i białka niehistonowe. Wiele danych dotyczących struktury chromatyny wskazywało, że ów nukleoproteinowy kompleks charakteryzuje się dużą regularnością budowy. Bezpośrednich danych wskazujących na istnienie regularnej struktury nukleohistonu dostarczyły przede wszystkim badania przebiegu trawienia chromatyny przez nukleazy, a także obserwacje chromatyny w mikroskopie elektronowym. Równie przydatne były badania dyfrakcji neutronów przez preparaty chromatyny oraz badania nad asocjacją histonów w roztworach. W roku 1973 Rill i van Holde (5) otrzymali w wyniku trawienia chromatyny grasicą cięcej nukleazą z *Micrococcus* fragmenty nukleohistonu określone przez nich jako cząstki „PS”. Ustalono, że są one jednakowe pod względem wielkości i mają ciężar cząsteczkowy ok.  $1,76 \times 10^5$ . Z tych danych można obliczyć, że w cząstce „PS” znajduje się odcinek DNA o długości ok. 110-120 par zasad. W tym samym roku Hewish i Burgoyne (6) opublikowali pracę dotyczącą działania endogennej nukleazy aktywowanej przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  na chromatynę z wątroby szczura. Pod wpływem działania tej nukleazy uzyskano serię fragmentów nukleoproteinowych o wzrastającym ciężarze cząsteczkowym. Ruchliwość elektroforetyczna odcinków DNA wyizolowanych z tych fragmentów wskazywała, że większe fragmenty są całkowitymi wielokrotnościami fragmentów mniejszych. Otrzymane wyniki pozwoliły przyjąć, że powtarzający się blok DNA w chromatynie jest prawdopodobnie związany z białkami i dlatego wykazuje niewielką wrażliwość na trawienie endogenną nukleazą. Pomiędzy tymi blokami występują miejsca bardziej podatne na działanie enzymu. Noll (7) wykazał, że przez dodanie egzogennej nukleazy z *Micrococcus* uzyskuje się podobny wynik trawienia przy czym powstają fragmenty nukleoproteinowe zawierające odcinki DNA o długości ok. 200 par zasad lub wielokrotności tej długości.

Dane dotyczące regularnej struktury chromatyny uzyskane przy zastosowaniu enzymów nukleolitycznych są zgodne z równoległe prowadzonymi obserwacjami chromatyny w mikroskopie elektronowym. W 1974 r. Olins i Olins (8) opublikowali zdjęcia przedstawiają-

ce chromatynę interfazalną. Na zdjęciach tych wyraźnie widoczne są regularnie rozmieszczone wzdłuż włókna chromatyny globularne cząstki o średnicy ok. 70 Å rozdzielone włóknami łącznikowymi o średnicy ok. 15 Å.

Na podstawie powyższych danych, badań rentgenograficznych oraz badań dotyczących asocjacji histonów w roztworach wodnych (9) Kornberg (10) zaproponował model podjednostkowej struktury chromatyny. Model ten zakładał, że włókno chromatyny jest giętkim łańcuchem połączonych podjednostek zbudowanych z histonów i DNA. Rdzeń każdej podjednostki ma średnicę ok. 100 Å i złożony jest z ośmiu cząsteczek histonów, wokół których owija się nić DNA. W skład pojedynczego oktameru histonów wchodzi po dwie cząsteczki każdego z histonów H2A, H2B, H3 i H4. Odcinek DNA zawarty w podjednostce liczy ok. 200 par zasad. W 1975 r. Oudet i wsp. (11) zaproponowali dla określenia podjednostki chromatyny nazwę nukleosom. Dalsze badania nad strukturą chromatyny potwierdziły słuszność podstawowych założeń modelu zaproponowanego przez Kornberga. W oparciu o wyniki badań nad przebiegiem trawienia chromatyny nukleazą z *Micrococcus* oraz obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazano także uniwersalność modelu podjednostkowej struktury chromatyny. Chromatyna wszystkich badanych do tej pory organizmów wykazywała strukturę podjednostkową (4).

## II. Badanie struktury rdzenia nukleosomu

Szczegółowe badania dotyczące dotrawiania DNA w nukleosomie nukleazą z *Micrococcus* wykazały, że pewien fragment podstawowego odcinka DNA, liczącego ok. 200 par zasad, związanego z oktamerem histonów daje się stosunkowo łatwo zhydrolizować enzymatycznie. Pozostały odcinek DNA, liczący 144 par zasad, jest bardzo ściśle związany z białkami i wykazuje znaczną oporność na działanie enzymu. Oktamer histonów połączony z tym 144 nukleotydowym odcinkiem DNA stanowi tzw. rdzeń nukleosomu. W ciągu dalszych badań okazało się, że DNA rdzenia nukleosomu może być atakowany przez enzymy nukleolityczne. I tak np. DNAaza I może wprowadzać cięcia DNA rdzenia nukleosomu, przy czym zaskakująca jest regularność tych cięć (12). DNAaza I przecina każdą z obu nici DNA rdzenia co 10 nukleotydów z przesunięciem o dwie zasady w komplementarnych niciach. Szczegółowe badania kinetyki działania DNAazy I na DNA rdzenia wykazały, że podatność poszczególnych miejsc na nukleolityczny atak jest różna. I tak miejsca najbardziej podatne na przecinanie występują w parach oddzielonych od siebie o 80 nukleotydów. Podobnie miejsca najbardziej odporne oddalone są od siebie o 80 nukleotydów. Przy założeniu, że po wykonaniu pełnego obrotu



superheliksu, dwa miejsca łańcucha znajdują się obok siebie w podobnym środowisku lokalnym, należy przypuszczać, że miejsca te będą jednakowo podatne na nukleolityczny atak. Uwzględniając to założenie oraz fakt, że fragmenty DNA oddalone o 80 nukleotydów mają podobną wrażliwość na atak DNAazy I, Lutter (13) wyciągnął wniosek, że na pełny skręt superheliksu przypada 80 par nukleotydów. Wniosek ten został w pełni potwierdzony przez badania krystalograficzne z zastosowaniem promieni X (14). Analizując asymetryczne rozmieszczenie w obrębie rdzenia nukleosomu miejsc bardziej i mniej podatnych na działanie ONAazą I Lutter przyjął, że superspirala DNA jest lewoskrętna.

Charakterystyczny wzór cięcia rdzeniowego DNA co 10 nukleotydów związany jest zapewne z pierwszorzędowymi skrętami spirali DNA. Należy oczekiwać, że odcinki DNA najbardziej podatne na nukleolityczny atak są luźniej związane z białkami histonowymi rdzenia nukleosomu. Stosując dokładniejsze metody badawcze wykazano, że fragmenty DNA uzyskiwane w wyniku działania DNAazą I na chromatynę są wielokrotnościami nie 10, a 10,4 nukleotydów (15, 16). Trawienie chromatyny innymi nukleazami daje podobne rezultaty. DNAaza II i nukleaza z *Micrococcus* przecinają DNA nukleosomów w innych miejscach, ale w takich samych odstępach jak DNAaza I (17). Zestawienie tych danych pozwala wnioskować, że regularność rozmieszczenia miejsc cięcia chromatyny przez nukleazy nie zależy od mechanizmu reakcji enzymatycznej, a jest raczej związana z periodycznością budowy podwójnej spirali DNA w chromatynie (15). Co więcej, Rhodes i Klug (18) wykazali, że periodyczność rozmieszczenia miejsc cięcia wolnego od białek DNA DNAazą I jest bardzo podobna do periodyczności rozmieszczenia miejsc cięcia tym enzymem DNA w nukleosomie. DNAaza I nacina wolny DNA i DNA w nukleosomie co 10,6 i co 10,4 par zasad odpowiednio.

### III. Badanie ponadnukleosomowej struktury chromatyny

Dotychczasowe badania nad strukturą chromatyny wskazują, że ok. 90% chromatynowego DNA zorganizowane jest w formie nukleosomów. Nukleosomy upakowane są z kolei w struktury wyższego rzędu — solenoidy. W chromosomach metafazalnych występują jeszcze dwa dodatkowe rzędy upakowania: supersolenoid i heliks utworzony z supersolenoidu. Wymienione tu struktury helikalne konieczne są do osiągnięcia określonego stopnia upakowania DNA, jednak ostateczny kształt chromosomu zależy prawdopodobnie od bardziej specyficznych czynników, a przede wszystkim od niehistonowych białek „szkieletowych”.

Metody badania ponadnukleosomowej struktury chromatyny obejmowały między innymi działanie na chromatynę enzymami nukleolitycznymi. Na podstawie analizy produktów trawienia chromatyny nukleazą

z *Micrococcus*, Hozier i wsp. (19) postulowali w 1977 roku, że chromatyna jest zorganizowana w ponadnukleosomowe jednostki strukturalne (*superbeads*), zawierające 6 do 10 nukleosomów. Jednostki te zostały następnie wyizolowane i scharakteryzowane przy użyciu nukleazy z *Micrococcus* (20) a także kilku enzymów specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych (21). Fujimoto i wsp. (21) badali podatność chromatyny erytrocytów kurzczenia na trzy enzymy specyficzne wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych: nukleazę P1 z *Penicillium citrinum* (22), nukleazę z fasoli złocistej (23, 24) i fosfodwuesterazę z jadu węża (25). Wszystkie trzy enzymy wprowadzają endonukleolityczne cięcia DNA o chromatynie powodując powstawanie nukleoproteinowych fragmentów o stałej sedymentacji 30—100S. Wielkość tych fragmentów jest jednakowa dla wszystkich trzech enzymów i prawie niezależna od czasu inkubacji z enzymem. Fragmenty te przypominają ponadto produkty uwalniane w czasie łagodnej degradacji chromatyny nukleazą z *Micrococcus*, która również wykazuje pewną preferencję wobec jednoniciowych substratów (26). Wielkość fragmentów uwalnianych przez nukleazy specyficzne wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych odpowiada 8—80 nukleosomom. Fragmenty te posiadają superstrukturę i wydają się być strukturalnymi jednostkami wyższego rzędu (*superbeads*). Jednostki te powiązane są prawdopodobnie łącznikiem podatnym na działanie enzymów nukleolitycznych. Wykazano bowiem, że miejsce nukleolitycznego ataku trzech nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych substratów jest takie samo jak w przypadku łagodnego działania na chromatynę nukleazą z *Micrococcus*. Oligonukleosomy powstające w wyniku łagodnej hydrolizy nukleazą z *Micrococcus* pozostają odporne na działanie nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych.

Fragmenty nukleoproteinowe powstające w wyniku działania nukleazy P1 i nukleazy z fasoli złocistej zachowują strukturę podjednostkową, o czym świadczy fakt, że nukleaza z *Micrococcus* przekształca je do mono- i oligonukleosomów.

Fujimoto i wsp. (21) wykazali również, że minichromosomy wirusa SV40 są całkowicie odporne na działanie nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych. Minichromosomy te mogą być dobrym modelem jednostki struktury chromatyny wyższego rzędu obecnej w chromatynie komórkowej. Zarówno minichromosomy jak i struktury ponadnukleosomowe mają zwartą superstrukturę (19, 27), a także podobną ruchliwość elektroforetyczną, stałą sedymentacji, zawartość DNA i oporność na działanie nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych substratów (21).

Interesujące jest, że działanie nukleaz specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych na chromatynę nie jest zależne od uorganizowania chromatyny w helikalne struktury wyższego rzędu.



Świadczy o tym powstawanie takich samych produktów podczas hydrolyzy natywnej chromatyny i chromatyny pozbawionej histonów H1 i H5. Te bogate w lizynę histony odgrywają jak wiadomo ważną rolę w utrzymaniu przez chromatynę struktur wyższego rzędu (26, 28—30). Jednociowy charakter obszarów DNA w chromatynie podatnych na działanie nukleaz specyficznych wobec jednociowych substratów musi więc powstawać na poziomie pierwszorzędowego nukleofilamentu, albo też może być wynikiem eksponowania pewnych regionów, co ma miejsce w chromatynie eukariotycznej (31, 32).

#### IV. Rozmieszczenie białek nukleosomów wzdłuż nici DNA

Ustalenie podjednostkowej struktury chromatyny nasunęło wiele nowych wątpliwości dotyczących sposobu funkcjonowania DNA w chromatynie. Między innymi powstało pytanie, czy sekwencje DNA wiążące się z białkami nukleosomów są ściśle określone czy też może przypadkowe. I znów w znalezieniu odpowiedzi na to pytanie bardzo przydatne okazały się enzymy nukleolityczne, jednakże w zależności od metody badawczej i zastosowanego enzymu uzyskiwano różne rezultaty.

I tak np. badania prowadzone z zastosowaniem nukleazy z *Micrococcus* wskazywały raczej na wiązanie się z białkami histonowymi przypadkowych sekwencji nukleotydów w obrębie rdzenia nukleosomów (33, 34, 35). Jednocześnie wykazano, że ta przypadkowość jest przynajmniej częściowo spowodowana zmianą ułożenia histonów indukowaną działaniem nukleazy z *Micrococcus* (36). W celu uniknięcia tego ubocznego efektu zastosowano DNAazę I i nukleazę S1 do badania rozmieszczenia nukleosomów wzdłuż nici DNA (37). Fragmenty DNA, 80 nukleotydowe, powstające w wyniku działania DNAazy I na chromatynę z wątroby szczura topiono w temperaturze 100°C, a następnie pozostawiano w warunkach sprzyjających powolnej reasocjacji. Jak wynika z ustalonego już wcześniej wzoru cięcia DNA rdzenia nukleosomu przez DNAazę I (13), te 80 nukleotydowe fragmenty pochodzą z nacięć przy nukleotydach nr 10 i 90, 20 i 100, 40 i 120 oraz 50 i 130. Jeżeli nukleosomy pochodzące z różnych komórek miałyby to samo położenie względem nici DNA, to 80 nukleotydowe fragmenty reasocjując dawałyby cząsteczki, w których dwuniciowe odcinki byłyby wielokrotnością 10 nukleotydów minus 2 nukleotydy (te 2 nukleotydy są wynikiem przesunięcia miejsc cięcia komplementarnych nici DNA przez DNAazę I). W takim przypadku działanie nukleazy S1 na reasocjowane fragmenty powodowałyby powstawanie dwuniciowych cząsteczek o długościach 80, 70, 60, 50 i 40 nukleotydów. Jeśli natomiast nukleosomy rozmieszczone byłyby przypadkowo wzdłuż nici DNA, dwuniciowe odcinki w reasocjujących cząsteczkach miałyby wszystkie możliwe długości. Działanie nukleazy



S1 na takie cząsteczki dawałyby więc dwuniciowe odcinki DNA o długości zmieniającej się liniowo od 0 do 80 nukleotydów. Uzyskany wynik świadczy o tym, że sekwencje DNA związane z białkami histonowymi nukleosomów są przypadkowe. Po działaniu nukleazą S1 otrzymano bowiem dwuniciowe fragmenty DNA o długościach zmieniających się liniowo od 0 do 80 nukleotydów. Podobnie Prunell i Kornberg (34) wykazali, że sekwencje DNA związane z białkowymi rdzeniami nukleosomów z embrionów *Drosophila* są przypadkowe. Nie wykluczyli oni jednak, że mała grupa sekwencji DNA występujących w pojedynczych kopiach może być zlokalizowana w ściśle określonym miejscu względem białkowego rdzenia nukleosomu.

Wyniki dalszych badań nad rozmieszczaniem DNA w stosunku do rdzeni białkowych nukleosomów prowadzone w ostatnich latach wskazują jednak często na preferencyjne wiązania się rdzeni nukleosomów z pewnymi sekwencjami DNA. Wykazano to między innymi dla genów tRNA kurczenia (38), genów 5S RNA *Xenopus* (39) i genów białek szoku cieplnego *Drosophila* (40). Stosując nukleazę z *Micrococcus*, egzonukleazę III i restrykcyjną endonukleazę Hae III wykazano, że nukleosomy w chromatynie zawierającej satelitarny DNA wątroby szczura nie są rozmieszczone przypadkowo w stosunku do sekwencji DNA (41).

Dokładne ustalenie czy z białkami histonowymi nukleosomów związane są zawsze te same, czy też różne sekwencje DNA jest bardzo istotne ze względu na wyjaśnienie roli nukleosomów w kontrolowaniu ekspresji genów.

## V. Badanie struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie

Dane o strukturze chromatyny opisane wyżej odnoszą się przede wszystkim do upakowania DNA w jądrze i dotyczą chromatyny statycznej. Wśród badających istnieje jednak tendencja do powiązania wiedzy na temat struktury chromatyny z wiedzą na temat jej funkcji.

W ustaleniu struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie przydatne okazały się również enzymy nukleolityczne. Porównywano podatność chromatyny aktywnej i nieaktywnej transkrypcyjnie na atak nukleolityczny. Okazało się, że wynik zależy od rodzaju użytego enzymu. Produkty otrzymane w wyniku działania nukleazy ze *Staphylococcus* na aktywną transkrypcyjnie chromatynę nierybosomalnych genów, są bardzo podobne do produktów uzyskanych w wyniku działania tego enzymu na chromatynę nieaktywną. Geny globinowe w retikulocytach, które produkują globinowy mRNA, są upakowane w struktury o takiej samej wielkości jak nukleosomy. (42). Podobne wyniki otrzymano badając nukleoproteinowe monomery z jąder kurzych jajowodów (33). Obserwacje chromatyny aktywnej transkrypcyjnie w mikroskopie elektronowym potwierdziły jej podjednostkową strukturę (43).

Chociaż efekt działania nukleazy z *Micrococcus* na chromatynę aktywną i nieaktywną transkrypcyjnie jest podobny, inna jest podatność na nukleolityczny atak chromatyny aktywnie transkrybowanej i chromatyny spoczynkowej. Wykazano, że transkrybowane aktywnie rejony genów są preferencyjnie hydrolizowane przez DNAazę I (44—56), a także DNAazę II (57) i nukleazę z *Micrococcus* (58).

Szczegółowe badania wrażliwości genów aktywnych transkrypcyjnie na działanie DNAazy I przyczyniły się do zebrania wielu danych dotyczących struktury transkrybowanej chromatyny. Zaobserwowano m.in., że stopień wrażliwości na działanie DNAazą I nie jest proporcjonalny do aktywności transkrypcyjnej genu (45, 47, 56), co wskazuje, że zmieniona konformacja jest charakterystyczna dla wszystkich genów przygotowanych do transkrypcji. Struktura potencjalnie aktywnej i nieaktywnej chromatyny ustalona zostaje już w momencie replikacji. Świadczy o tym fakt, że wrażliwość na działanie DNAazy I pojawia się już w ciągu 3 minut od zakończenia replikacji danego fragmentu DNA (59). Ponadto gen może pozostać wrażliwy na DNAazę I nawet gdy komórka utraci swą aktywność transkrypcyjną (44, 48, 50—52, 54). Wrażliwość genów na działanie DNAazą I związana jest ze specyficznością tkankową; wrażliwość ta występuje zwykle w tkankach, których geny ulegają ekspresji, a nie występuje w tkankach, w których te same geny nie są transkrybowane (44, 53, 55, 56). Ponadto wykazano, że miejsca pierwszego cięcia pojedynczej nici DNA przez DNAazę I (*nick*) grupują się wewnątrz transkrybowanych sekwencji genu (60).

Zastosowanie DNAazy I pozwoliło też uzyskać pewne dane dotyczące mechanizmów kontrolowania ekspresji genów w komórkach eukariotycznych. Jednym z czynników kontrolujących jest grupa białek wpływających na konformację aktywnych genów (*high-mobility group proteins*). Niektóre białka tej grupy (HMG-14 i HMG-17) uwalniane są z jąder pod wpływem działania DNAazy I (53). Wykazano, że białka te mogą przywrócić chromatynie konformację wrażliwą na działanie DNAazy I, utraconą pod wpływem działania roztworów soli (53). Te same białka są bezpośrednio odpowiedzialne za utrzymanie struktury koniecznej do zachowania aktywności transkrypcyjnej chromosomów (61).

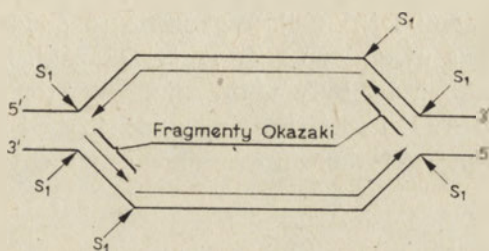
W ostatnich latach zastosowano do badania struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie również enzymy restrykcyjne, takie jak restryktazę Hae III i jej izoschizomer BspRI (62). Stwierdzono, że stały region genu kodującego lekki łańcuch kappa z myeloma, gdzie region ten ulega ekspresji, jest znacznie bardziej podatny na enzymy restrykcyjne niż taki sam region z wątroby, gdzie nie ulega on ekspresji. Wykazano również, że w jądrach z wątroby pewne miejsca omawianego regionu z sekwencjami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne są chronione przed działaniem restryktaz, a inne nie. Na podstawie powyższych obserwacji wysunięto wniosek, że obszar genu nie podle-



gający ekspresji ma strukturę nukleosomową, przy czym białkowe rdzenie tych nukleosomów wiążą się preferencyjnie z pewnymi sekwencjami DNA.

## VI. Badanie struktury chromatyny w stadium replikacji

Do badania struktury replikujących się chromosomów szczególnie przydatne okazały się enzymy nukleolityczne specyficznie degradujące jednoniciowe kwasy nukleinowe. Wiadomo bowiem, że w widełkach replikacyjnych występują jednoniciowe odcinki DNA (63—65), (Ryc. 1).



Ryc. 1. Potencjalne miejsca działania nukleazy S<sub>1</sub> w widełkach replikacyjnych DNA wirusa SV40 wg (66).

Herman, De Pamphilis i Wasserman (66) zastosowali nukleazę S<sub>1</sub> i nukleazę z *Neurospora crassa* do badania struktury replikujących się i dojrzałych chromosomów wirusa SV40. Chromosomy wirusa SV40 replikują w jądrach komórek ssaków i tworzą tam nukleosomy, których struktura i skład histonów są bardzo podobne do nukleosomów gospodarza (67—73).

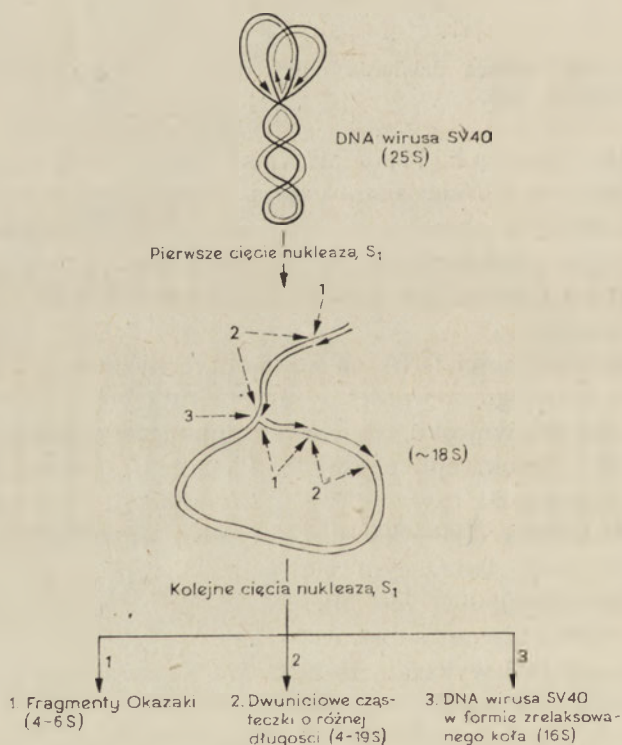
Porównanie podatności DNA na nukleolityczny atak w replikujących się chromosomach i jego oporności w niereplikujących się chromosomach wirusa prowadzi do wniosku, że cięcie replikującego się DNA występuje w obrębie widełek replikacyjnych. Ponadto fragmenty DNA uwalniane przez nukleazę S<sub>1</sub> czy nukleazę z *Neurospora crassa* z replikującego się DNA wirusa (100—300 nukleotydów) odpowiadają wielkością fragmentom Okazaki tworzącym się podczas replikacji DNA wirusa (50—300 nukleotydów); (64, 74—76).

Stosując radioaktywne substraty Herman, De Pamphilis i Wasserman (66) wykazali, że nukleaza S<sub>1</sub> uwalnia z replikujących się chromosomów wirusa SV40 najwyżej 50—60% obecnych tam fragmentów Okazaki. Pozostałe 40—50% fragmentów Okazaki zostaje nadal związane z większymi cząsteczkami DNA. Wynika to z faktu, że w stosowanych warunkach reakcji (pH 5,3) nukleaza S<sub>1</sub> nie rozpoznaje jednoniciowych fragmentów liczących mniej niż 10 nukleotydów (77). Należało się więc spodziewać, że ok. 50% fragmentów Okazaki w repliku-



jących się chromosomach SV40 jest oddzielone od dłuższych łańcuchów nowotworzonego DNA jedynie bardzo krótkim odcinkiem. Przypuszczenia te potwierdzone zostały przez Andersona i De Pamphalisa, którzy stosując ligazę z *E. coli* wykazali, że najwyżej 20% fragmentów Okazaki oddzielone jest od dłuższego łańcucha jedynie przez brak pojedynczego wiązania fosfodwuestrowego (*nick*). Wykazali oni również, że pozostałe 30% fragmentów Okazaki jest oddzielone od powstającego łańcucha DNA przez niewielki odstęp (*gap*), który może być zbyt krótki aby był rozpoznany przez nukleazę S1, lub też może być on zastąpiony przez RNA.

Co najmniej 90% fragmentów Okazaki uwalnianych z replikujących się chromosomów wirusa SV40 przez nukleazę S1 występuje jako nagi, niezwiązany z białkami DNA (66). Wykazano to poddając działaniu nukleazy z *Micrococcus* uwolnione fragmenty Okazaki. Stopień i szybkość hydrolizy tych fragmentów były takie same jak stopień i szybkość hydrolizy wolnego DNA. Ponadto działanie nukleazy S1 na replikujące się chromosomy SV40 potraktowane uprzednio formaldehydem (w celu unie-



**Ryc. 2.** Schemat działania nukleazy S1 na replikujący się DNA wirusa SV40 wg (66).

Numerami 1, 2, 3, oznaczone są miejsca cięcia nukleazą S1 prowadzące do wytworzenia: 1-fragmentów Okazaki, 2-dwuniciowych cząsteczek DNA o różnej długości, 3-DNA wirusa SV40 w formie zrelaksowanego koła

możliwienia oddysocjowywania jakichkolwiek białek), powodowało powstawanie fragmentów o stałej sedymentacji 4-6S i o takiej samej gęstości w chlorku cezu jak oczyszczony DNA ( $1,68 \text{ gm/cm}^3$ ). Z danych tych wynika, że conajmniej 90% uwalnianych nukleazami fragmentów Okazaki występuje poza nukleosomami. Obserwacja ta potwierdza schemat replikacji chromosomów, według którego fragmenty Okazaki są syntetyzowane poza nukleosomami, a dopiero później włączają się do nich i wiążą z nowo powstającym łańcuchem DNA.

Herman, De Pamphilis i Wasserman (66) zaproponowali model struktury widełek replikacyjnych wirusa SV40 uwzględniający produkty powstające w wyniku cięcia chromosomów SV40 przez nukleazy specyficzne wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych (Ryc. 1). Synteza DNA postępuje w sposób ciągły na „przednim ramieniu” widełek (78, 79) i w sposób nieciągły, w postaci fragmentów Okazaki na „wstecznym ramieniu” widełek. Na każdym „wstecznym ramieniu” widełek replikacyjnych występuje średnio jeden fragment Okazaki (80). Endonukleolityczne cięcie dowolnego jednoniciowego regionu w widełkach replikacyjnych powoduje powstawanie cząsteczek o stałej sedymentacji 18S przypominających „koło z ogonem” (Ryc. 2). Cząsteczki takie obserwowano pod mikroskopem elektronowym (81). Kolejne nukleolityczne cięcia jednoniciowych fragmentów DNA w widełkach replikacyjnych powodują powstawanie zrelaksowanych cząsteczek kołowych DNA (16S), liniowych dwuniciowych cząsteczek o różnej długości (4-19S) i fragmentów Okazaki w formie dwuniciowych cząsteczek DNA o stałej sedymentacji 4-6S (Ryc. 2).

### Uwagi końcowe

Badanie struktury chromatyny za pomocą enzymów nukleolitycznych o różnej specyficzności pozwoliło skonstruować przejrzysty model budowy materiału genetycznego organizmów eukariotycznych. Zastosowanie nukleaz o niskim stopniu specyficzności wobec struktury substratu, takich jak nukleaza z *Micrococcus* i DNAaza I, przyczyniło się między innymi do opracowania modelu podjednostkowej struktury chromatyny spoczynkowej, a także do uzyskania wielu danych na temat struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie. Użycie natomiast enzymów specyficznych wobec jednoniciowych kwasów nukleinowych — np. nukleazy S1 i nukleazy z *Neurospora crassa* — pozwoliło badać strukturę chromatyny w czasie replikacji. Te ostatnie enzymy zastosowano również do badania ponadnukleosomowej struktury chromatyny, a także do ustalenia rozmieszczenia rdzeni białkowych nukleosomów w stosunku do nici DNA.

Od niedawna również enzymy restrykcyjne znalazły zastosowanie do

badania struktury chromatyny. Wykazano między innymi, że restryktaza Hae III i jej izoschizomer BsuRI preferencyjnie atakują łącznikowe fragmenty DNA pomiędzy rdzeniami nukleosomów (82). Enzymy restrykcyjne zastosowano również do badania struktury wyższego rzędu w chromatynie spoczynkowej (83), a także do badania struktury chromatyny aktywnej transkrypcyjnie (62). Badano również wrażliwość regionu zawierającego miejsce startu replikacji (*origin*) minichromosomów SV 40 na atak enzymów restrykcyjnych (84).

Szeroko prowadzone badania nad enzymami nukleolitycznymi żywej komórki stwarzają potencjalnie możliwość odkrycia nowych enzymów, które byłyby odpowiednimi instrumentami w dalszych badaniach nad strukturą i funkcjonowaniem chromatyny. Interesujące byłoby również badanie zależności struktury aktywnej chromatyny od endogennych, jądrowych enzymów nukleolitycznych (85).

Zaakceptowano do druku 15.06.1981

## PIŚMIENNICTWO

1. Clarc R. J., Felsenfeld G., (1971), *Nature (London), New Biol.*, **229**, 101—106.
2. Kańska-Brudzyńska K., Walter Z., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 157—173.
3. Niedźwiedzka A., Kaliński A., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 175—188.
4. Fronk J., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 77—103.
5. Rill R., Van Holde K. E., (1973); *J. Biol. Chem.*, **248**, 1080—1083.
6. Hewish D. R., Burgoyne L. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 504—510.
7. Noll M., (1974), *Nature*, **251**, 249—251.
8. Olins A. L., Olins D. E., (1974), *Science*, **183**, 330—332.
9. Kornberg R. D., Thomas J. O., (1974), *Science*, **184**, 865—868.
10. Kornberg R. D., (1974), *Science*, **184**, 868—871.
11. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P., (1975), *Cell*, **4**, 281—300.
12. Noll M., (1974), *Nucleic Acid. Res.* **1**, 1573—1578.
13. Lutter L. C., (1978), *J. Mol. Biol.*, **124**, 391—420.
14. Finch J. T., Lutter L. C., Rhodes D., Brown R. S., Rushton B., Levitt M., Klug A., (1977), *Nature*, **269**, 29—36.
15. Prunell A., Kornberg E., Lutter L., Klug A., Levitt M., Crick F., (1979), *Science*, **204**, 855—858.
16. Lutter L., (1979), *Nucl. Acid. Res.*, **6**, 41—56.
17. Sollner-Webb B., Melchior W., Jr., Felsenfeld G., (1978), *Cell*, **14**, 611—627.
18. Rhodes D., Klug A., (1980), *Nature*, **286**, 573—578.
19. Hozier J., Renz M., Nehls P., (1977), *Chromosoma* **62**, 301—317.
20. Butt R. T., Jump D. B., Smulson M. E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1628—1632.
21. Fujimoto M., Kaliński A., Pritchard A. E., Kowalski D., Laskowski M. Sr., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7405—7410.



22. Fujimoto M., Kuninaka A., Yoshino H., (1974), *Agric. Biol. Chem.*, **252**, 8652—8659.
23. Johnson P. H., Laskowski M. Sr., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 891—898.
24. Kroeker W. D., Kowalski D., Laskowski M. Sr., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4463—4467.
25. Prichard A. E., Laskowski M. Sr., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6606—6613.
26. Driksen M. L., Dekker C. A., (1959), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 147—152.
27. Griffith J. D., Christiansen G., (1977), *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **42**, 215—226.
28. Renz M., Nehls P., Hozier J., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 245—252.
29. Cole R. D., Lawson G. M., Hsiang M. W., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 253—263.
30. Ganbatz J., Hardison R., Murphy J., Eichner M. E., Chalkley R., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 265—271.
31. Schwartz A. G., Taylor J. H., (1974), *Chromosoma*, **49**, 1—5.
32. Henson P., (1978), *J. Mol. Biol.*, **119**, 487—506.
33. Garel A., Axel R., (1977), *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **42**, 701—708.
34. Prunell A., Kornberg R. D., (1977), *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **42**, 103—108.
35. Birboim H. C., Holford R. M., Seligy V. L., (1977), *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **42**, 1161—1165.
36. Chambon P., (1977), *Cold Spring Harbor Quant. Biol.*, **42**, 1209—1234.
37. Prunell A., (1979), *FEBS Lett.*, **107**, 285—287.
38. Wittig B., Wittig S., (1979), *Cell*, **18**, 1173—1183.
39. Gottesfeld J. M., Bloomer L. S., (1980), *Cell*, **21**, 751—760.
40. Wu C., (1980), *Nature*, **286**, 854—860.
41. Igo-Kemenes T., Omori A., Zachau H. G., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 5377—5390.
42. Lacy E., Axel R., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3978—3982.
43. Foe V. E., Wilkinson L. E., Laird C. D., (1976), *Cell*, **9**, 131—146.
44. Weintraub H., Groudine M., (1976), *Science*, **193**, 848—853.
45. Garel A., Zolan M., Axel R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4867—4871.
46. Panet A., Cedar H., (1977), *Cell*, **11**, 933—940.
47. Levy W. B., Dixon G., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 883—898.
48. Palmiter R., Mc Knight S., Mulvihill E. Y., Senear A., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 639—647.
49. Flint S. J., Weintraub H. M., (1977), *Cell*, **12**, 783—794.
50. Stalder J., Seebeck T., Braun R., (1978), *Eur. J. Biochem.* **90**, 391—395.
51. Miller D., Turner P., Nienhuis A., Axelrod D., Gupolakraisham T., (1978), *Cell*, **14**, 511—526.
52. Groudine M., Das S., Neiman P., Weintraub H., (1978), *Cell*, **14**, 865—878.
53. Weisbrod S., Weintraub H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 630—634.
54. Young N., Benz E., Nienhuis A., (1979), w Molecular Regulation of Hemoglobin Switching, red. Stamatoyannopoulos G., Nienhuis A., str. 749—759, Grune i Stratton, New York.
55. Bloom K. S., Anderson J. N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10532—10539.
56. Garel A., Axel R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3966—3970.

57. Gottesfeld J. M., Garrard W. T., Bagi G., Wilson R. F., Bonner J., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2193—2197.
58. Bloom K. S., Anderson J. N., (1978), *Cell*, **15**, 141—150.
59. Weintraub H., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 781—792.
60. Zasloff M., Camerini-Otero D., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1907—1911.
61. Gazit B., Panet A., Cedar H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1787—1790.
62. Pfeiffer W., Zachau H. G., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4621—4638.
63. Geffer M. L., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 45—78.
64. Edenberg H. J., Huberman J. A., (1975), *Ann. Rev. Genet.*, **9**, 245—284.
65. Alberts B., Sternglanz R., (1977), *Nature*, **269**, 655—661.
66. Herman T. M., De Pamphilis M. L., Wassarman P. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4563—4571.
67. Bellard M., Oudet P., Germond J. E., Chambon P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 543—553.
68. Cremisi C., Pignatti P. F., Croissant O., Yaniv M., (1976), *J. Virol.*, **17**, 204—211.
69. Christiansen G., Griffith J., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1837—1851.
70. Varshavsky A. J., Nedospasov S. A., Schmatchenko V. V., Bakayev V. V., Chumackov P. M., Georgiev G. P., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3303—3325.
71. Ponder B. A. J., Crawford L. V., (1977), *Cell*, **11**, 35—49.
72. Shelton E. R., Wasserman P. M., De Pamphilis M. L., (1978), *J. Mol. Biol.*, **125**, 491—514.
73. Muller U., Zentgraf H., Eicken I., Keller W., (1978), *Science*, **201**, 406—415.
74. De Pamphilis M. L., Berg P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4348—4354.
75. Anderson S., Kufmann G., De Pamphilis M. L., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4990—4998.
76. De Pamphilis M. L., Anderson S., Bar-Shavit R., Collins E., Edenberg H., Herman T., Karas B., Kaufmann G., Krokan H., Shelton E., Su R., Tapper D., Wasserman P. M., (1979), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 679—691.
77. Dodgson J. B., Wells R. D., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2374—2379.
78. Perlman D., Huberman J. A., (1977), *Cell*, **12**, 1029—1043.
79. Kaufmann G., Bar-Shavit R., De Pamphilis M. L., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2535—2545.
80. Francke B., Hunter T., (1974), *J. Mol. Biol.*, **83**, 99—121.
81. Bourgaux P., Bourgaux-Ramoisy D., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 513—524.
82. Hörz W., Igo-Kemenes T., Pfeiffer W., Zachau G. H., (1976), *Nucl. Acids Res.*, **3**, 3213—3226.
83. Igo-Kemenes T., Zachau H. G., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 109—118.
84. Varshavsky A. J., Sundin O., Bohn M., (1979), *Cell*, **16**, 453—466.
85. Przykorska A., Szarkowski J. W., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **108**, 285—293.

## SPRAWOZDANIE

### „EMBO — FEBS tRNA workshop” Strasbourg, 16—21 lipiec 1980

W terminie 16—21 lipca 1980 r., odbyła się w Strasbourgu (Francja) międzynarodowa konferencja robocza nt. transferowych kwasów rybonukleinowych pod nazwą „EMBO-FEBS tRNA workshop”. Organizatorem konferencji był profesor Jean P. Ebel, dyrektor Institut de Biologie Moleculaire et Cellulaire w Strasbourgu, natomiast finansowały ją, jak to zresztą wynika z nazwy, międzynarodowe towarzystwa biochemiczne: EMBO i FEBS. W konferencji uczestniczyło około 200 naukowców z Europy, Azji oraz Ameryki Płn. i Płd., w tej liczbie było 6 Polaków.

Obrazy były prowadzone w formie wykładów, sesji plakatowych oraz dyskusji plenarnych, określanych popularnym terminem „dyskusji okrągłego stołu”. Wszystkie formy cieszyły się ogromnym zainteresowaniem, prowadzono bardzo ożywione dyskusje co spowodowane było między innymi homogennością tematyczną konferencji, jak również obecnością wielu prominentów nauki światowej w tej dyscyplinie wiedzy. Zasadniczym tematem, motywem przewodnim konferencji, była cząsteczka tRNA rozpatrywana w różnych aspektach. Jednakże z merytorycznego punktu widzenia możliwe jest wydzielenie kilku tematów wiodących omawianej konferencji:

- oddziaływania (interakcje) cząsteczek uczestniczących w procesie biosyntezy białka (kwasy nukleinowe, syntetazy AA-tRNA, czynniki elongacyjne i rybosomy),
- struktura makrocząsteczek uczestniczących w biosyntezie białka, głównie tRNA (analizowano zarówno poszczególne molekuly jako samodzielne indywidua chemiczne, jak również w aspekcie dynamicznym, w trakcie procesów biologicznych),
- biosynteza białka w organellach komórkowych, a w szczególności w mitochondriach,
- struktura, organizacja i ekspresja genów cząsteczek uczestniczących w procesie syntezy białka (głównie tRNA).

Szeroki i różnorodny wachlarz problemów przedstawianych przez uczestników konferencji umożliwił wskazać zagadnienia, które w najbliższej przyszłości będą problemami wiodącymi w tematyce tRNA. Niewątpliwie, był to pogląd wyrażany przez większość uczestników konferencji, najbardziej interesującym zagadnieniem jest kwestia mechanizmu biosyntezy białka w organellach komórkowych.

Szczególnie intensywnie, w różnych aspektach badanym problemem jest struktura i funkcja mitochondrialnych tRNA. Problematyka mitochondrialnych tRNA (określanych jako mt-tRNA) zaczyna się od pytania czy wszystkie tRNA występujące w mitochondriach są transkrybowane z mt-DNA. I stąd następne pytanie, czy istnieje transport tRNA z cytoplazmy do mitochondriów. Kolejnym zagadnieniem bardzo kontrowersyjnym jest struktura mitochondrialnych tRNA. W laboratorium G. Dirheimera określono sekwencję 8 drożdżowych mt-tRNA. Stwierdzono, iż wszystkie one mają klasyczną budowę liścia koniczyny i zasadnicze elementy struktury pierwszorzędowej zbliżone do tRNA cytoplazmatycznych.

Jednocześnie B. A. Roe przedstawił wyniki sugerujące, iż większość mitochon-



drialnych tRNA ma bardzo małą, w stanie zaniku pętlę DHU. Tenże sam autor wykrył jedynie 24-26 różnych tRNA, jako całkowitą liczbę tRNA występujących w mitochondriach, kodowanych przez mitochondrialny DNA; jest to bardzo mało, w porównaniu np. z cytoplazmą. Badania prowadzone nad rozpoznawaniem kodu genetycznego przez mt-tRNA pozwalają sądzić, iż dla tych tRNA wystarczają jedynie dwie pierwsze litery kodu. Obserwacja ta może być nader istotna. Można domniemywać, że w mitochondriach „czytane” są dwie litery kodu, u prokariotów- trzy (zgodnie z klasycznym schematem), natomiast u eukariotów istotne znaczenie ma również kolejna zasada, a więc niejako czwarta litera kodu genetycznego.

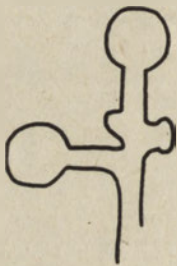
Podobnie zaprezentowana została przez M. Sudaralingama propozycja klasyfikacji strukturalnej tRNA, będąca jednocześnie kryterium rozwoju ewolucyjnego biocząsteczek, a mianowicie:

#### tRNA:

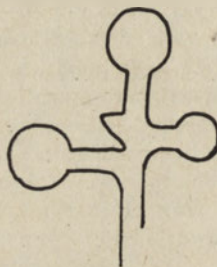
cytoplazmatyczny

prokariotyczny

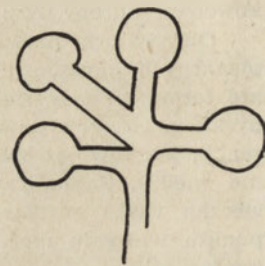
mitochondrialny



długi-długi



długi-krótki



krótki-krótki

Jak przedstawiono na ryc. 1 podstawą klasyfikacji jest długość pętli DHU i pętli dodatkowej.

Największą dynamiką w tematyce badań nad tRNA charakteryzują się w chwili obecnej prace związane z techniką klonowania genów, mapowania operonu oraz lokalizacji poszczególnych genów na operonie. Miarą postępu w tej dziedzinie może być przedstawienie przez H. Ozeki pełnej mapy genetycznej lokalizacji genów tRNA dla bakterii *E. coli*. Przedstawiona mapa zawierała ponad 50 genów co odpowiadało około 35 różnym specyficznym tRNA. Jednakże można i w tym wypadku stwierdzić, że ta nowa metoda w istotny sposób powiększa zasób pytań, na które w chwili obecnej brak odpowiedzi. W ramach dyskusji „okrągłego stołu” D. Söll przedstawił kilka otwartych, zupełnie w chwili obecnej niewyjaśnionych kwestii wiążących się z problematyką tRNA:

- dlaczego występują geny wielokrotne (ang. *multiple genes*)?;
- który gen, z kilku wykrytych na operonie, jest transkrybowany *in vivo*?, a może wszystkie, ale z różną kinetyką?, jeżeli tak, to jakie jest fizjologiczne znaczenie tego faktu;
- czy istnieje w chwili obecnej jakiś ewidentny dowód na funkcje regulatorowe procesu transkrypcji, co jest tak często sugerowane przez wielu autorów?;
- dlaczego tRNA o różnej specyficzności są na operonie zlokalizowane obok siebie?, a izoakceptory w dużej odległości?, jak jest funkcja struktury operonu?

Prace nad strukturą i konformacją makromolekuł oddziaływujących ze sobą w procesie biosyntezy przebiegają niejako dwoma torami. Pierwszy kierunek zmierza do uściślenia i zwiększenia precyzji danych otrzymywanych metodami klasycznymi, głównie techniką rentgenografii, poprzez zwiększanie rozdzielczości i udo-

kładnianie danych. W problematyce tej, w analizie rentgenograficznej tRNA, niewątpliwie ośrodkiem wiodącym jest pracownia A. Richa. Na konferencji przedstawiono badania porównawcze kryształów tRNA<sup>Phe</sup> oraz inicjatorowego tRNA<sup>Met</sup>. Stwierdzono istotne różnice pomiędzy strukturą krystaliczną inicjatorowego tRNA<sup>Met</sup> z *E. coli* w porównaniu z elongacyjnym tRNA<sup>Phe</sup> w ramieniu akceptorowym, w ramieniu D, jak również w pętli antykodonu.

Druga grupa badaczy szuka metod analizy konformacyjnej cząsteczek w trakcie przemian funkcjonalnych. Jako przykład można podać w tym miejscu prace M. Sprintzla z zastosowaniem nie-izomeryzujących analogów tRNA; stwierdził on, że faktor Tu nie rozpoznaje czy grupa aminokwasowa znajduje się w miejscu 2' czy też 3', natomiast czynnik EFG rozróżnia konformację cis-diol cząsteczki AA-tRNA. Również metody spektroskopowe, aczkolwiek już od dłuższego czasu stosowane dla badań strukturalnych cząsteczki tRNA, umożliwiają ostatnio w miarę precyzyjne określenie zmian zachodzących np. w ramieniu antykodonowym i w ramieniu D (prace R. Riglera i L. Nilsona). Stwierdzono mianowicie, występowanie trzech stanów konformacyjnych, których istnienie jest zależne od stężenia jonów magnezu, sperminy oraz od temperatury.

Przedstawiony był również model cząsteczki czynnika elongacyjnego EF Tu z *E. coli* (B. F. C. Clark) opracowany na podstawie badań krystalograficznych. Obecnie znana jest również sekwencja łańcucha aminokwasowego fakturowego EFTu, tak więc jest to niezwykle korzystny układ modelowy dla badania procesu interakcji z cząsteczką tRNA<sup>Phe</sup>, dla której od dawna dysponujemy już analogicznymi danymi. Pomimo wielu prób eksperymentalnych autorom nie udało się jednoznacznie określić w jaki sposób te dwie molekuly oddziałują ze sobą. Przedstawiono jedynie możliwe wzajemne ułożenie obu cząsteczek względem siebie w przestrzeni. Być może czynnikiem limitującym jest fakt, iż dla czynnika elongacyjnego dysponujemy danymi odnośnie formy EFTu-GDP Tu-GDP, a dla tRNA<sup>Phe</sup> w formie deacylowanej, gdy tymczasem *in vivo* interakcja dotyczy kompleksu: AA-tRNA-EF Tu-GTP. Natomiast metodami znakowania powinowactwa udało się już określić prawdopodobne miejsca oddziaływań pomiędzy łańcuchem białkowym a polinukleotydowym (J. Jonak).

Problematyka wzajemnych interakcji, modelu ułożenia przestrzennego, jak również kompleksów przejściowych w trakcie elongacji łańcucha polipeptydowego była tematem wielu wystąpień (H. G. Gassen, M. Sprintzl, J. Ofengand, K. Nierhaus). Podstawowe zagadnienia to kwestia błędu w odczytywaniu kodu genetycznego, wzajemnego ułożenia cząsteczek na rybosomie, białek rybosomalnych tworzących poszczególne centra aktywne, jak również sekwencji wydarzeń i procesów zachodzących na rybosomie. Aczkolwiek prezentowano różne koncepcje mechanizmów poszczególnych etapów biosyntezy z całą pewnością nie zostało jeszcze w tej kwestii wypowiedziane ostatnie słowo.

Konferencja w Strasborgu była nader cenna dla tej grupy osób, dla których cząsteczka tRNA znajduje się w centrum zainteresowania badawczego, niezależnie od stosowanych metod i technik. Był to autentyczny przegląd wszelkich nowości związanych z tą makrocząsteczką. Jednocześnie tego typu konferencja monotematyczna, w której uczestniczy relatywnie niewielu naukowców jest z pewnością najbardziej efektywnym forum dla wymiany poglądów i dyskusji. Jest w tym również ogromna zasługa organizatorów, którzy zapewнили doskonałą organizację i atmosferę obrad.

T. Twardowski

## KOMUNIKAT

Komitet Cytobiologii Polskiej Akademii Nauk oraz Uniwersytet Jagielloński organizują we wrześniu (22—23.IX) 1983 roku w Krakowie dwudniową Pierwszą Ogólnopolską Konferencję Biologii Komórki. Przewidziane są obrady w następujących sekcjach:

1. Sekcja Struktury i Funkcji Błon Biologicznych
2. Sekcja Enzymologii Struktur Komórkowych
3. Sekcja Mechanizmów Ruchu Komórek
4. Sekcja Regulacji Wzrostu i Podziału Komórek.

W sekcjach przewiduje się jeden referat plenarny, doniesienia plakatowe i dyskusję okrągłego stołu.

Osoby zainteresowane proszone są o zgłoszenie swojego udziału w obradach wyżej wymienionych sekcji na adres:

Prof. dr Wincenty Kilariski, Uniwersytet Jagielloński,  
Instytut Zoologii. 30-060 Kraków, ul. M. Karasia 6  
w terminie do 31 grudnia 1982 roku.



## RECENZJE

S. Pfeifer, H. H. Borchert

Pharmakokinetik und Biotransformation; eine Einführung VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1980, str. 156, cena M 20, 70

Obserwowany w NRD szybki rozwój farmakologii klinicznej wymaga kształcenia kadry farmaceutów i lekarzy m. innymi w zakresie farmakokinetyki oraz biotransformacji leków. Recenzowana praca S. Pfeifera i H. H. Borcherta pt.: „Pharmakokinetik und Biotransformation eine Einführung” wychodzi naprzeciw temu zadaniu. Autorzy książki przekazali czytelnikom na 142 stronach druku podstawowe wiadomości z zakresu farmakokinetyki i równie podstawowe wiadomości z zakresu chemii, biochemii i biologii procesów biotransformacji leków. Część pracy zatytułowana „Farmakokinetyka” stanowi zestawienie podstawowych wiadomości dotyczących budowy błon komórkowych, mechanizmów transportu, problemów związanych z wchłanianiem leku z przewodu pokarmowego, tkanki mięśniowej, skóry, otrzewnej, omówienie wydalania leku na drodze nerkowej i pozanerkowej oraz farmakokinetyczną analizę stężeń leku obserwowanych w krwi po jednorazowym podaniu dożylnym i pozanaczyniowym jak również po jego podaniu wielokrotnym. Wszystkie zebrane w tej części informacje oparte są na klasycznych modelach jedno i dwukompartментowych. O niezwykle ważnej wielkości jaką jest klirens wspomniano jedynie przy okazji omawiania wydalania nerkowego nie nawiązując już do niego przy omawianiu wydalania pozanerkowego (wątrobowego itp.). Tą część książki zamyka krótkie omówienie możliwości wykorzystania analogicznych maszyn matematycznych w farmakokinetyce.

Część druga, zatytułowana „Biotransformacja” stanowi właściwie wstęp do 3-tomowej pracy S. Pfeifera pt. „Biotransformation von Arzneimitteln” wydanej w latach 1975—1979 przez to samo wydawnictwo Volk und Gesundheit w NRD. Zawiera ona omówienie reakcji chemicznych składających się na procesy I-ej i II-ej fazy biotransformacji leków, omówienie roli niektórych czynników takich jak płeć, wiek, ciąża, odżywianie, rytm dobowy i schorzenia na proces biotransformacji, zagadnienie hamowania oraz indukcji enzymatycznej oraz znaczenie tych problemów w terapii a także zjawisko biotransformacji w procesie pierwszego przejścia (*first pass effect*).

Dla czytelnika polskiego, mającego dostęp nie tylko do krajowych opracowań problematyki farmakokinetycznej ale i do obszernych i wyczerpujących monografii Gibaldiego (Gibaldi M., Perrier D.: Pharmacokinetics M. Decker 1975) czy Wagnera (Wagner J. G.: Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics. Drug Intell. Publ. Hamilton Ill. 1975) zdecydowanie większą wartość posiada druga część pracy S. Pfeifera i H. H. Borcherta dotycząca biotransformacji leków i zawierająca wiadomości może i podstawowe ale co jest w tym przypadku istotne—zebrane w jednym miejscu.

Wadą książki jest natomiast bardzo skąpe piśmiennictwo ograniczone do 64 pozycji, z których niemal połowa (31) stanowi odnośniki do prac monograficznych, oraz numerowanie wzorów leków i ich metabolitów zastępuje podawanie pełnych nazw. To ostatnie nie przyczynia się napewno do jaśniejszego przedstawienia treści

książki.

Książka może być wykorzystana przez wszystkich, którzy są zainteresowani procesami biotransformacji.

A. Danek

### Human nutrition; a comprehensive treatise

t. 3A — Nutrition and the adult: macronutrients str. 290, cena \$ 25.—

t. 3B — Nutrition and the adult: micronutrients str. 424, cena \$ 39,5

Red. Roslyn B. Alfin-Slater and David Kritchevsky, Plenum Press, New York, 1980.

Autorzy obszernej monografii wydanej w serii *Human Nutrition* jako t. 3A i 3B podejmują ambitną próbę całościowego ujęcia różnych aspektów żywienia ludzi dorosłych. Jak podkreślają we wstępie, celem tego typu monografii jest przegląd i krytyczna ocena już posiadanych danych oraz zwrócenie uwagi na działy niedostatecznie jeszcze opracowane, z nadzieją, że luka ta zostanie szybko zapełniona.

Monografię rozpoczyna rozdział o zapotrzebowaniu pokarmowym człowieka na podstawowe składniki odżywcze oraz na witaminy i składniki mineralne. Podane są również techniki stosowane do oceny stanu odżywienia. Zapotrzebowanie kaloryczne człowieka jest tematem dalszych dwóch rozdziałów, w których dyskutowana jest także między innymi wartość kaloryczna pokarmów, metody jej oznaczania, osobnicze zapotrzebowanie na energię w zależności od płci, wieku oraz rodzaju wykonywanej pracy, pomiary wymiany energii i przemiany podstawowej. W trzech rozdziałach omawiane są następnie przemiany związków dostarczających energii — węglowodanów i tłuszczów. Zwrócona jest w nich uwaga nie tylko na pobieranie, trawienie i przemiany tych związków w różnych organach, lecz także na czynniki warunkujące odpowiedź osobniczą na podanie węglowodanów i tłuszczów.

Osobne rozdziały monografii poświęcone są omówieniu przemian związków o „specjalnych funkcjach” tzn. białek i aminokwasów, niezbędnych kwasów tłuszczowych (EFA), cholesterolu i błonnika. Podobnie jak w przypadku węglowodanów i tłuszczów, zwrócono uwagę na udział tych związków w etiologii szeregu chorób.

Druga część monografii poświęcona jest omówieniu takich składników pożywienia jak witaminy i pierwiastki śladowe. Rozdział pierwszy tego tomu traktuje o tych witaminach, które są prekursorami wielu koenzymów, a mianowicie o biotynie, kwasie nikotynowym, kwasie pantotenowym, witaminie B<sub>6</sub> i B<sub>2</sub> kwasie foliowym, witaminie B<sub>12</sub> itd. W przypadku każdej witaminy przedstawiono krótko historię jej wykrycia, a następnie omówiono współczesne poglądy na mechanizm działania. Osobne rozdziały dotyczą witaminy C, A, E i K. W rozdziałach tych obok historii wykrycia i opisu mechanizmu działania i metabolizmu poszczególnych witamin podano szereg wiadomości farmakologicznych oraz wskazano na udział tych witamin w etiologii licznych chorób. Zwrócono również uwagę na możliwość wystąpienia przy przedawkowaniu witamin, zwłaszcza witaminy D i A, niekorzystnych objawów ubocznych a nawet symptomów toksycznych. Żelazo i hemoglobina oraz pierwiastki śladowe stanowią treść następnych dwóch rozdziałów. Również wyczerpująco potraktowano w specjalnych rozdziałach zagadnienia współzależności działania leków i stanu odżywienia człowieka, zapotrzebowania pokarmowego w przypadku stosowania środków antykoncepcyjnych oraz zagadnienie odżywiania ludzi starych.



Monografia wydana jest bardzo starannie, każdy rozdział kończy przegląd podstawowego piśmiennictwa a każdy tom zamyka wyczerpujący indeks rzeczowy. Recenzowana monografia jest bardzo cenna dla biologów, biochemików, farmakologów i żywieniowców zainteresowanych różnorodnymi aspektami żywienia człowieka.

B. Grzelakowska-Sztabert

**Robert B. McComb, George N. Bowers Jr., and Solomon Poser: Alkaline Phosphatase**

Plenum Press, 1979, New York and London, str. XVI+986, cena US \$ 90,00; ISBN 0-306-40214-9

Oznaczenia aktywności alkalicznej fosfatazy stanowią obecnie, jak się wydaje, najczęściej wykonywane testy enzymatyczne dzięki prostocie technicznej i wysokiej czułości metod analitycznych. W ciągu ostatnich sześciu lat corocznie ukazuje się ponad tysiąc prac oryginalnych, zawierających w tytule termin „alkaliczna fosfataza” (EC 3.1.3.1). Jeśli więc mierzyć wagę zagadnienia produkcją publikacyjną, to fosfataza alkaliczna bez wątplenia należy do najbardziej popularnego — co nie oznacza najważniejszego — tematu w biochemii dni dzisiejszych.

Mimo ponad 70-ciu lat intensywnych badań alkaliczna fosfataza — ten bodaj najbardziej wszechobecny enzym — pozostaje nadal tajemnicza i enigmatyczna. Patrząc z perspektywy czasu można z całą odpowiedzialnością za słowo stwierdzić, że postęp wiedzy w wielu obszarach badań nad alkaliczną fosfatazą, jej strukturą i funkcjami *in vivo*, był hamowany przez szybkie i bezkrytyczne gromadzenie faktów, w istocie przypadkowych. W słowie wstępnym do omawianej monografii prof. D. W. Moss pisze: „Uczy się naukowców w okresie ich wczesnej kariery (zawodowej), że — by użyć słów sir Johna Herschela — „pośpieszne uogólnienie stanowi nieszczęście nauki.” Niemniej, we wszystkich obszarach działalności naukowej przychodzi pora, gdy uogólnienie staje się wręcz nieodzowne, a to w celu wyselekcjonowania istotnych faktów z masy danych już nagromadzonych oraz w celu stworzenia podstaw wyjściowych do nowych odkryć i nowych kierunków badań” (s. IX). To właśnie było celem omawianej monografii: krytycznie przeanalizować literaturę przedmiotu od 1907 roku (liczącej ponad 10 000 ważniejszych pozycji), określić znaczenie odkryć dokonanych w latach przeszłych, aby tym samym uporządkować grunt i przygotować przedpole pod badania przyszłe. Zadanie, zdawałoby się, niewykonalne; a jednak wykonane!

Problem potraktowano całościowo acz syntetycznie, poczynając od skrótego zarysu historycznego kolei losów badań nad fosfatazą, z następnym omówieniem występowania tego enzymu we wszystkich grupach systematycznych świata żywnego. W rozdziale 4, omówiono metody oczyszczania enzymu z różnego materiału biologicznego, a w następnych strukturę enzymu, mechanizmy reakcji oraz metody oznaczania aktywności, łącznie z technikami analizy izoenzymów alkalicznej fosfatazy. Te rozdziały mają ogromne znaczenie poznawcze, i w połączeniu z rozdziałem 12. o fizjologicznych funkcjach enzymu — są wyjątkowo interesujące dla biochemików i fizjologów. Trzy rozdziały poświęcono zagadnieniom wykorzystywania testu aktywności alkalicznej fosfatazy w badaniach klinicznych i weterynaryjnych (diagnostyka) oraz przemysłowych i rolniczych. Stosowany racjonalnie, test ten oddaje nieocenione przysługi przy diagnozie schorzeń, zanieczyszczeń mikrobiologicznych w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, przy ocenie stanu gleb. Książkę kończy rozdział zawierający przepisy standardowych metod



analizy fosfataz alkalicznych. Indeks rzeczowy liczący 70 stron jest wyjątkowo szczegółowy; umożliwia natychmiastowe wyszukanie potrzebnych informacji.

Monografii opartej o omówienie 6131 prac oryginalnych (cytowanych w pełnym zapisie bibliograficznym tj. z tytułami), zawierającej 163 rys. oraz 121 tabel nie sposób omówić szczegółowo. Stwierdzić można, że autorzy dokonali ogromnej pracy, ponieważ udało im się wprowadzić ład do zagadnienia, którego w chwili obecnej nikt nie był w stanie ogarnąć. Wnioski autorów są udokumentowane, a wysuwane przepuszczenia niewątpliwie nakierują przyszłe badania w tej dziedzinie na sprawy najistotniejsze.

Otrzymałmy monografię wyjątkowo rzetelną. Stanowić ona będzie podstawowe źródło wiedzy o alkalicznej fosfatazie. Książka warta jest polecenia każdemu, kto zajmuje się enzymami.

*S. J. Knypl*

### **Pathobiochemie und Laboratoriumsdiagnostik in der Perinatalperiode**

Red. J. Gross, D. Scheuch

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1980, stron 484, cena 42 M

Recenzowane 2 tomowe opracowanie stanowi 36 tom seryjnego wydawnictwa „Postępy Medycyny Doświadczalnej” (Ergebnisse der experimentellen Medizin) i zawiera 46 prac naukowych przedstawionych w większości na 12 Kongresie Towarzystwa Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej NRD (kwiecień 1978 — Karl Marx Stadt).

Znaczna większość prac (42) zarówno klinicznych jak i eksperymentalnych opracowana została przez autorów NRD (w tym jedna w współpracy z Węgrami). 4 opracowania pochodzą z Anglii, Czechosłowacji, Polski i Bułgarii.

Całość opracowania podzielona jest na rozdziały: 1) Genetyka — 6 prac, 2) Patobiochemia — 15 prac, 3) Kliniczna biochemia — 25 prac.

Całość opracowana jest bardzo starannie i obejmuje bardzo szeroki zakres problemów interesujących patologów, położników, pediatrów i biochemików klinicznych.

Szczególnie ciekawe i praktyczne w znaczeniu lekarskim są prace rozdziału trzeciego ujmujące problemy diagnostyki perinatalnej i postnatalnej uwzględniające badania analityczne i morfologiczne zarówno płynów płodowych tkanek jak i krwi (surowicy, elementów morfotycznych krwi oraz moczu).

Szereg prac ma charakter opracowań monograficznych, a obszerne cytowane piśmiennictwo czyni z nich dobry przewodnik po zawitych problemach diagnostyki laboratoryjnej.

Na uwagę zasługuje bardzo staranna szata graficzna i umieszczanie w tekstach licznych schematów różnicowego postępowania diagnostycznego.

Zakres omawianych metod diagnostycznych jest daleko szerszy niż istniejące możliwości większości naszych laboratoriów, nawet specjalistycznych.

Należy jednak przyjąć, że zagadnienia te powinny być znane, nawet tylko z teoretycznego punktu widzenia, klinicytom-położnikom i stąd przedstawiona do recenzji książka winna być polecona szerokim kręgom odbiorców.

*J. Gregorczyk*

**Subcellular Biochemistry, vol. 6**

Red. D. B. Roodyn

Plenum Press, New York and London, 1979, 525 str., 45 \$

Zadaniem seryjnego wydawnictwa „Biochemia Struktur Komórkowych” jest publikacja prac dotyczących szerokiego zakresu badań nad biologią i biochemią komórki. Oprócz wyników badania izolowanych organeli, publikowane artykuły dotyczą genetyki, ewolucji oraz biogenezy struktur subkomórkowych, budowy i funkcji błon biologicznych oraz oddziaływań pomiędzy mitochondriami i cytoplazmą a także jądrem i cytoplazmą. Tom 6 wydawnictwa rozpoczyna artykuł który opracowali: T. P. Karpetsky, M. S. Boguski i C. C. Levy na temat budowy, własności i funkcji kwasu poliadenylowego (poli-A). Jest to wyczerpujące opracowanie tego tematu zawierające metody izolowania i wykrywania poli-A, a także wyznaczanie rozmiarów jego fragmentów. Następnie autorzy przechodzą do omówienia występowania poli-A w żywych organizmach. Pierwotnie wykryto ten polimer jako komponentę mRNA w komórkach ssaków. Obecnie wiadomo, że występuje on powszechnie w komórkach eukariotycznych a także i w pewnych prokariotycznych. Szeroko omawiana jest biologiczna funkcja poli-A. Polimerowi temu przypisuje się udział w procesie transportu mRNA z jądra do cytoplazmy, ale coraz więcej danych przemawia również za działaniem poli-A jako kompetycyjnego inhibitora rybonukleaz i czynnika regulującego stężenie mRNA w cytoplazmie. Ochrona mRNA przed degradacją przez rybonukleazy jest realizowana poprzez wiązanie mRNA z błonami rybosomalnymi. Końcowe fragmenty poli-A w mRNA są w dużej mierze odpowiedzialne za to wiązanie poprzez wytwarzanie hydrofobowych oddziaływań. Autorzy podają rozległą charakterystykę struktury poli-A w zależności od środowiska. Na zakończenie omówiono interakcję poli-A ze związkami o niskim ciężarze cząsteczkowym, jak puryny, aminokwasy i poli-aminy oraz z innymi polinukleotydami, na przykład z poli-U. Podano około 500 pozycji literatury.

Drugi artykuł poświęcony komputerowemu modelowi wirowania w gradiencie gęstości jest autorstwa J. Steensgaard i N. P. Hundahl Møllera. Poczynając od omówienia teoretycznych podstaw metody wirowania przy zastosowaniu gradientu stężeń autorzy następnie podają komputerowy model optymalizacji warunków procedury technicznej w celu uzyskania najlepszego rozdzielania przy jednoczesnym zmniejszeniu efektów ubocznych.

Następna praca dotyczy ogromnie interesującej propozycji zastosowania nowego modelu do badania procesu powstawania nowotworów. U. C. Knopf wykazuje podobieństwo pomiędzy rozwojem bulw korzeniowych wytwarzanych pod wpływem bakterii wiążących azot (*Rhizobia*) i roślinnym nowotworem występującym pod działaniem *Agrobacterium tumefaciens*. Autor opisuje szczegółowo trzy fazy transformacji nowotworowej komórek roślinnych pod wpływem tych bakterii kończące się rozwojem guza. Proliferacja komórek nowotworowych nie wymaga obecności bakterii, które są niezbędne do zainicjowania całego procesu. Autor podaje wiele wiadomości na temat molekularnego mechanizmu tworzenia raka roślin a także genetycznych podstaw mutacji tego zjawiska.

Następny artykuł P. A. Whittakera dotyczy wykorzystania mutacji „petite” u drożdży jako modelu do badania biogenezy mitochondriów i roli mitochondrialnego DNA. W 1949 roku stwierdzono, że kultury drożdży poddane działaniu akryflawiny wytwarzają mutanty zdolne do wzrostu i rozmnażania się pomimo braku funkcjonujących mitochondriów i niezdolności do syntezy białek mitochondrialnych. Mutacje „petite” występują pod działaniem wielu czynników mutagennych do których należą podwyższona temperatura, naświetlanie promieniami UV, nie-



dobory pokarmowe, zwłaszcza witamin a także związki chemiczne, jak 5-fluorouracyl, siarczan dodecyli i bromek etydyny. Autor podaje wyczerpującą charakterystykę mitochondrialnego DNA i RNA u tych mutantów oraz powiązanie zmian budowy obu polimerów ze zmianami fenotypu komórek drożdży.

Trzy ostatnie prace dotyczą błony komórkowej. Obszerny artykuł G. Lenaza omawia podstawowe aspekty funkcji lipidów w błonie komórkowej, począwszy od charakterystyki modeli lamellarnych jak liposomy lub „czarna” błona poprzez charakterystykę oddziaływania białko-lipid i modele ukazujące usytuowanie lipidów w błonie. Artykuł zawiera wiele informacji na temat wpływu lipidów na stan fizyczny i własności błon biologicznych, takie jak przepuszczalność i transport przenośnikowy. Ważne i ciekawe są wiadomości dotyczące wpływu lipidów na aktywność enzymatyczną ze szczególnym uwzględnieniem kinetyki enzymów związanych z błoną, jak ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ATP-aza, a także omówienie zjawiska allosteryczności wywołanej zmianami składu lipidowego błon. Przedyskutowany jest również efekt lipidów na receptory hormonalne poprzez wpływ na cyklazę adenylową. Lipidy tworząc hydrofobowe oddziaływania w wodnym środowisku spełniają ważną funkcję umożliwiając ukierunkowane przenoszenie jonów w transporcie  $\text{Ca}^{2+}$  lub pompie wodorowej w procesie oksydacyjnej fosforylacji.

Dehydrogenazom związanym z błoną komórkową poświęcony jest artykuł F. L. Crane, H. Goldenberga, D. J. Morré i H. Löwa. Autorzy prezentują wiele danych przemawiających za występowaniem szeregu dehydrogenaz związanych z błoną komórkową. Dehydrogenazom tym przypisuje się rolę w aktywnym transporcie oraz w procesie stymulacji hormonalnej poprzez tworzenie i rozkład cyklicznych nukleotydów.

Artykuł autorstwa N. Lakshminarayanaiah jest poświęcony procesom transportu przez błony biologiczne a szczególnie roli potencjału transmembranowego błon tzw. cienkich (poniżej 100 Å) i grubych (powyżej 100 Å). Autor podaje obszerną listę związków zmieniających własności błon biologicznych: przewodnictwa i przepuszczalności, oraz teoretyczne podstawy wyznaczania potencjału transmembranowego a także potencjału powierzchniowego. Wielkim walorem tej pracy jest wykazanie jak klasyczne fizykochemiczne teorie mogą znaleźć zastosowanie do badań błon biologicznych.

Tom zawiera również przegląd ważniejszych pozycji z dziedziny biochemii i biologii komórki wydanych w latach 1974—1977.

W sumie jest to książka zawierająca obszerne artykuły przeglądowe a także wiele nowych informacji na tematy specjalistyczne, ale napisana tak przystępnym językiem, że może być polecana studentom wydziałów biologicznych.

*E. Watajtyś-Rode*

### **Pathiobiochemie.**

### **Perspektiven und Entwicklungstendenzen für die klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik**

Wyd. R. Haschen i C. Wagenknecht

Seria Ergebnisse der experimentellen Medizin, t. 30

VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1981, Berlin, str. 250, cena 27.— M.

Książka jest zbiorem 13 artykułów omawiających wybrane zagadnienia patyobiochemii. Czytelnik zapoznaje się z kierunkami rozwoju niektórych metod klinicznych i ich trudnościami wynikającymi w zastosowaniu zarówno w badaniach profilaktycznych, jak również do celów terapeutycznych.



Bardziej szczegółowo omówione zostały te zagadnienia patobiochemii, które w sposób bezpośredni lub pośredni wiążą się z okresem ciąży. Ponadto omówiono znaczenie diagnostyki opartej na badaniu składu izoenzymów przy rozpoznawaniu chorób wątroby.

Omówiono znaczenie badań biochemicznych przy rozpoznawaniu i leczeniu niektórych chorób serca.

Trudności na jakie powinny być przygotowane laboratoria przykliniczne, opierające diagnozę na wynikach analizy enzymów w moczu przedstawione w pierwszym artykule, ilustrują złożoność problemów patobiochemii.

Książka może zainteresować wszystkich biochemików a zwłaszcza tych, którzy zajmują się problemami biochemii klinicznej.

I. Kąkol

### Toxische Beeinflusung der Hämostase

Wyd. Hans-Peter Klöcking

Seria Ergebnisse der experimentellen Medizin t. 38

VEB-Verlag Volk und Gesundheit. 1981; Berlin

str. 120, cena 13,90 M

Zaburzenia zdolności organizmu do samoistnego tamowania krwawienia zostały omówione w 10 artykułach, z których większość stanowią prace eksperymentalne poprzedzone nieco obszerniejszym wprowadzeniem w zagadnienie. W artykułach przeglądowych omówiono działanie uboczne leków i wpływ niektórych trucizn na krzepliwość krwi. W. Barthel wiele uwagi poświęcił zaburzeniom funkcji płytek krwi wywołanym ubocznym działaniem niektórych leków i trucizn. Jasno przedstawione zagadnienie zmian funkcji płytek w artykule W. Barthel'a doskonale poparte jest bogatą literaturą (245 odnośników do prac oryginalnych). Autorzy K. Hruba, E. Thaler i K. Lenz przedstawiają problem toksycznych uszkodzeń wątroby pociągających za sobą zaburzenia krzepliwości krwi.

Trzy kolejne artykuły poświęcono omówieniu mechanizmu działania, skuteczności działania i innych problemów toksykologicznych pochodnych 4-hydroksyku-maryny i 1,3-indandionu, stosowanych do zwalczania plagi szczurów i myszy.

Artykuł Heleny Cwajdy, interesujący zarówno z punktu widzenia medycyny pracy jak i toksykologii, zawiera informacje na temat zaburzeń hemostazy powstałych przy chronicznych zatruciach dwusiarczkiem węgla u ludzi. W następnej pracy wchodzącej w skład omawianej książki ta sama autorka wraz z Małgorzatą Woyke opisuje doświadczenia wykonane na królikach zmierzające do wyjaśnienia działania dwusiarczku węgla na odpowiednie fazy hemostazy. J. Perlowitz omówił krótko wpływ chromatyny, 2,4-dwunitrofenolu, jodooctanu na produkcję aktywatorów plazminogenu w hodowlach tkanek nerek i fibroblastów.

Ostatni artykuł jest poświęcony możliwości znalezienia wczesnych zaburzeń zdolności organizmów do samoistnego tamowania krwawienia w poszczególnych jej fazach.

Wszystkie artykuły omawiające ogólne zagadnienia zaburzeń hemostazy jak i szczegółowe przykłady określonych oddziaływań leków czy substancji toksycznych na poszczególne jej fazy stanowią bardzo interesującą lekturę i mogą być przydatne zarówno hematologom jak i biochemikom. Jest to napewno jeszcze jedna udana pozycja serii Ergebnisse der experimentellen Medizin.

I. Kąkol

**Heinz Weide, Harald Aurich**

**Allgemeine Mikrobiologie,**  
Gustav Fischer Verlag Jena, 1979, str. 519

Autorzy, z których pierwszy jest profesorem mikrobiologii a drugi profesorem biochemii w wyższej uczelni omawiają w ocenianym podręczniku właściwości wirusów, bakterii i grzybów, jako przedstawicieli prokariotów i eukariotów. Całość ujęto w ośmiu częściach, z których każda składa się z szeregu odpowiednio do treści zatytułowanych i ponumerowanych rozdziałów.

Pierwszą część stanowi wprowadzenie poświęcone omówieniu przedmiotu mikrobiologii oraz potrzeby zapoznania się z zagadnieniami mikrobiologii ogólnej.

W następnych częściach opisano składniki chemiczne komórki oraz struktury komórek niektórych prokariotów i eukariotów. Wiele miejsca (200 stron druku) poświęcono omówieniu procesów przemiany materii, głównie zagadnieniom biosyntezy RNA i DNA. W kolejnych dwu częściach zajęto się zagadnieniami wzrostu drobnoustrojów i różnymi problemami z dziedziny genetyki.

W ostatniej, ósmej części przedstawiono wybrane zagadnienia mikrobiologii stosowanej, dotyczącej na przykład wytwarzania różnych produktów żywnościowych, leków i szczepionek. Omawiano także drobnoustroje jako czynniki chorobotwórcze oraz metody ich zwalczania. Pokróćce zostały też wspomniane podstawowe zagadnienia serologii i immunologii bakteryjnej.

Liczne szkice i rysunki oraz prosty, nieskomplikowany język umożliwiają łatwe stosunkowo śledzenie myśli autorów. Podręcznik może oddać duże usługi w pracy nie tylko mikrobiologom, lecz również pracownikom specjalizującym się w innych dziedzinach nauk przyrodniczych, jak na przykład fizjologii.

*H. Meisel*

**Z. J. Vejdělek, B. Kakáč****Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen**

**Ergänzungsband I. Organische Farbreagenzien**  
VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1980, str. 830, cena 150.— M

Książka jest pierwszym tomem suplementu do wydanej w 1969 roku pracy pod tym samym tytułem. Uwzględniono w niej literaturę na temat barwników organicznych, która ukazała się do roku 1976/77. Każdy rozdział poświęcony jest jednemu barwnikowi organicznemu stosowanemu przy analizie spektrofotometrycznej związków organicznych. Wiadomości uporządkowane są w ramach rozdziałów jednorodnie w następującej kolejności: nazwa barwnika, jego wzór, mechanizm reakcji, zastosowanie wraz ze wskazówkami metodycznymi, opisy konkretnych metod, tabele związków analizowanych przy użyciu opisywanego barwnika, literatura.

Analizowane związki uporządkowane są w tabelach w sposób alfabetyczny i towarzyszy im każdorazowo powołanie się na literaturę oryginalną. Szczególną uwagę zwrócono na mechanizmy reakcji, których poznanie umożliwi czytelnikowi ewentualne rozszerzenie stosowności barwnika na analizę związków wcześniej przy jego użyciu nie analizowanych.

Omawiana książka przeznaczona jest w pierwszym rzędzie dla chemików — analityków, jednak może się okazać bardzo przydatną także w pracowni biochemicznej.

*W. Rode*

### XVII Zjazd Towarzystwa

XVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbył się w dniach 11—13 września 1980 r. w Warszawie w salach Uniwersytetu. Otwarcia Zjazdu dokonał Przewodniczący Komitetu Naukowo-Organizacyjnego prof. dr Kazimierz Zakrzewski; następnie głos zabrali: Rektor Uniwersytetu Warszawskiego prof. dr Kazimierz Dobrowolski, Sekretarz II Wydziału PAN prof. dr Adam Urbanek oraz Prezes Zarządu Głównego PTBioch prof. dr Lech Wojtczak.

W obradach Zjazdu wzięły udział 594 osoby w tym 248 członków PTBioch. W ramach Zjazdu odbyło się pięć sympozjów na temat:

- „Biochemiczne podstawy wykorzystania energii słonecznej” organizator: prof. dr Zbigniew Kaniuga (4 referaty oraz 9 komunikatów).
- „Konstrukcje i modyfikacje genomu *in vitro*” organizator: doc. dr Magdalena Fikus (9 referatów oraz 13 komunikatów).
- „Budowa, właściwości i biosynteza glikokoniugatów” organizator: prof. dr Jerzy Kościelak (5 referatów oraz 17 komunikatów).
- „Antymetabolity — aspekty metaboliczne i kliniczne” organizator prof. dr David Shugar (6 referatów oraz 14 komunikatów).
- „Zaburzenia metabolizmu lipoproteidów” organizator prof. dr Stefan Angielski (4 referaty oraz 14 komunikatów).

Na Zjazd ponadto nadesłano 294 komunikaty, które prezentowano w sesji plakatowej w następujących grupach tematycznych:

- Enzymologia 82, — Kwasy nukleinowe, składniki i analogi 26, — Białka i aminokwasy 31, — Komórka nowotworowa 15, — Receptory i błony 15, — Fizjologia, patologia 47, — Neurochemia 14, — Rośliny 17, — Drobnoustroje 23, — Środowisko 20.

Do nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego dla młodych biochemików zgłoszono 15 prac, które rozpatrzyła w czasie trwania Zjazdu powołana przez Zarząd Główny Komisja.

W trakcie Zjazdu w dniu 11 września odbyło się spotkanie towarzyskie w klubie studenckim SGPiS, w którym wzięło udział ponad 200 osób.

### Działalność naukowa Towarzystwa

Oddział Warszawski wspólnie z Instytutem Onkologii, Polskim Towarzystwem Onkologicznym oraz Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN zorganizował Konferencję Naukowo-Szkoleniową na temat: „Chemical carcinogenesis and mutagenesis”. W konferencji wzięło udział 130 uczestników krajowych i 19 z zagranicy.

W Oddziale Łódzkim odbyła się konferencja „Toksykologiczne i biochemiczne aspekty działania związków rtęci” zorganizowane przy współudziale Towarzystwa Toksykologicznego. W konferencji uczestniczyło 65 osób.

Oddział Warszawski był współorganizatorem kursu FEBS z zakresu bioenergetyki, który odbył się w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.



W Oddziałach Towarzystwa odbyły się 52 zebrania naukowe. Niektóre referaty zwłaszcza w Oddziale Warszawskim wygłaszane były przez gości zagranicznych. W Oddziale Warszawskim odbyło się wspólne zebranie z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN.

### **Działalność popularyzatorska**

Oddział Warszawski kontynuował współpracę z Redakcją czasopisma „Biologia w Szkole”. W roku 1980 ukazały się dwa artykuły członków Towarzystwa na temat biochemii żywienia i biosyntezy białka. W druku znajduje się artykuł na temat interferonu.

### **Działalność wydawnicza**

Towarzystwo wydaje kwartalnik „Postępy Biochemii”. Złożono do druku w 1980 roku 26 tom tego czasopisma o łącznej objętości 51 arkuszy wydawniczych. W tomie tym ukazało się 20 artykułów przeglądowych, nakład kwartalnika wyniósł 2330 egzemplarzy. Towarzystwo wydaje również „Monografie Biochemiczne”, które ukazują się w miarę napływu materiału. W druku znajduje się „Słownictwo Biochemiczne” a w przygotowaniu do druku monografie dotyczące enzymów i immunologii transplantacyjnej.

### **Nagrody Towarzystwa**

Zarząd Główny przyznał doroczną nagrodę im. J. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną kolegom J. Augustyniakowi, J. Wowerowi i Z. Janowskiemu z ośrodka poznańskiego. Nagrodę im. B. Skarżyńskiego za najlepszy artykuł przeglądowy w Postęпах Biochemii otrzymali koledzy Karol i Alina Taylor z ośrodka gdańskiego. Przyznano 9 nagród im. W. Mozołowskiego młodym biochemikom za najlepsze prace przedstawione na XVII Zjeździe Towarzystwa.

### **Współpraca krajowa i zagraniczna**

Towarzystwo utrzymywało kontakty z Komitetem Biochemii i Biofizyki PAN, z pokrewnymi Towarzystwami Naukowymi poprzez organizowanie wspólnych zebrań naukowych, konferencji i kursów. Współpracę zagraniczną realizowano poprzez przynależność Towarzystwa do FEBS, Prezes Towarzystwa brał udział w posiedzeniach Rady FEBS, Towarzystwo uczestniczyło w pracach komisji kursów i komisji stypendialnej FEBS.

### **Działalność wnioskodawcza**

W październiku 1980 roku PTBioch opracowało Memoriał omawiający przyczyny, które doprowadziły nauki biologiczne w Polsce do obecnego impasu. Memoriał podpisało 1500 osób z 12 ośrodków akademickich Kraju. Memoriał ten złożono w Sejmowej Komisji Nauki i Postępu Technicznego.

**Nowi członkowie Towarzystwa**

Koledzy: Wojciech Stec z Łodzi; Barbara Jędrzejewska-Wasilewska, Jan Stec, Ryszard Szyszka i Halina Anton z Lublina; Rozalia Grabarska-Bochenek, Bogusław Kula, Danuta Jakubowska, Barbara Miarczyńska, i Ewa Birkner z Katowic; Wiesława Roszkowska, Halina Ostrowska i Zofia Galewska z Białegostoku; Maria Różańska z Torunia; Anna Kijowska i Danuta Przybył z Poznania.

## KOMUNIKAT

### Kursy FEBS

W 1982 roku przewiduje się zorganizowanie przez FEBS następujących kursów:

- Biomolekularna mikroskopia elektronowa — ULM, Austria (kwiecień — maj)
- Biochemia i genetyka drożdży — Madryt, Hiszpania (kwiecień)
- Biochemia błon — Zurych, Szwajcaria (marzec)
- Struktura i metabolizm glikokoniugantów — Lille, Francja (wrzesień)
- Struktura i funkcja genomu roślinnego — Erice, Włochy (wrzesień)
- Rola lipidów w strukturze i funkcji płytek krwi — Erfurt, NRD
- Replikacja plazmidów bakteryjnych — Odensee, Dania (sierpień)

Bliższe szczegóły będą znane w drugiej połowie roku 1981, osoby zainteresowane mogą zgłaszać się po informacje do Zarządu Głównego PTBioch.



## KRONIKA Z ŻYCIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

### Nowi profesorowie

W ostatnim półroczu 1981 r. Rada Państwa nadała tytuł profesora zwyczajnego prof. dr Ignacemu Siemionowi z Uniwersytetu Wrocławskiego.

Tytuły profesora nadzwyczajnego otrzymali:

prof. dr Aleksandra Putrament z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie;  
prof. dr Zbigniew Latało z Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie.

Nowo mianowanym profesorom serdecznie gratulujemy.

### Nowi członkowie Towarzystwa

Na posiedzeniu Zarządu Głównego w dniu 7.12.1981 na członków Towarzystwa przyjęci zostali:

Wiesław Kozak z Bydgoszczy; Irena Celejowa, Domicela Litwińska, Barbara Maria Fiałowska, Ewa Prus, Anna Szczęsna-Kaczmarek, Andrzej Matuszkiewicz, Piotr Ścisłowski, Andrzej Składanowski, Andrzej Suchanowski i Julian Świerczyński z Gdańska; Mariola Grabowska, Maria Słomczyńska, Michał Puźniczek i Bohdan Turyna z Krakowa; Tadeusz Antczak i Wojciech Sławomir Zieliński z Łodzi; Krzysztof Linkowski z Poznania; Wiesława Barbara Czwirst z Torunia i Jerzy Żuk z Warszawy.

### Nagrody Towarzystwa

Komisja Polskiego Towarzystwa Biochemicznego do spraw nagród imienia Jakuba Karola Parnasa w składzie: prof. dr Tadeusz Chojnacki (przewodniczący), prof. dr Anna Wojtczak (vice-przewodniczący), prof. dr Maria Kopeć, doc. dr Barbara Grzelakowska-Sztabert, prof. dr Mieczysław Chorąży i prof. dr Krzysztof Golankiewicz — przyznała nagrodę im. J. K. Parnasa za najlepszą pracę doświadczalną opublikowaną w 1980 roku i wykonaną w kraju — Julianowi Świerczyńskiemu, Jerzemu Stankiewiczowi, Piotrowi Ścisłowskiemu i Zenonowi Aleksandrowiczowi — za pracę pt. „Isolation and regulatory properties of mitochondrial malic enzyme from rat skeletal muscle” opublikowaną w *Biochim. Biophys. Acta*, t. 612, str. 1-10.

Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego za najlepsze komunikaty na XVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu otrzymali:

Jacek Otlewski z Instytutu Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego; Bożena Korczak z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie; Irena Kustrzeba z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu; Bogusław Wójczyk z Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Jadwiga Pulikowska z Zakładu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

Nagrodzonym serdecznie gratulujemy.

### Komunikat

Mgr Małgorzata Kalinowska została powołana w skład Zespołu Programowego Chemii przy Ministrze Oświaty i Wychowania jako przedstawiciel PTBioch. Uwagi dotyczące programów nauczania chemii w szkołach średnich prosimy kierować do mgr M. Kalinowskiej, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, 02-089 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 93.

## POLSKIE TOWARZYSTWO NAUK ŻYWIENIOWYCH (PTNŹ)

W wyniku starań pracowników nauki zajmujących się żywieniem w Polsce, a zwłaszcza członków Komitetu Żywienia Człowieka PAN, powstało i zostało zarejestrowane w dniu 25.VIII.1980 Stowarzyszenie pod nazwą Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych — PTNŹ\*.

Celem Towarzystwa jest:

1. Organizowanie i popieranie działalności zmierzającej do rozwoju nauk żywieniowych w Polsce.
2. Upowszechnianie osiągnięć naukowych z zakresu żywienia.
3. Propagowanie na forum międzynarodowym osiągnięć nauki polskiej w zakresie żywienia.
4. Prowadzenie działalności na rzecz kształtowania zaangażowanych, ideowych i obywatelskich postaw swoich członków.

Cele te będą realizowane przez:

1. Organizowanie zebrań, konferencji, sympozjów, zjazdów i kongresów naukowych.
2. Organizowanie wykładów, odczytów, wystaw oraz innych form upowszechniania nauki o żywieniu (środki masowego przekazu).
3. Współpracę z Polską Akademią Nauk i jej placówkami oraz resortami i instytucjami zajmującymi się problematyką żywienia.
4. Współpracę z organizacjami krajowymi i zagranicznymi o podobnym profilu działania.
5. Podejmowanie inicjatyw i wypowiedanie się w zakresie stanu potrzeb żywieniowych w Polsce.
6. Prowadzenie działalności wydawniczej w zakresie żywienia.
7. Prowadzenie społecznego doradztwa naukowego i konsultacji w dziedzinie żywienia człowieka.

Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może być obywatel polski posiadający dyplom ukończenia studiów wyższych i legitymujący się dorobkiem naukowym oraz popularyzatorskim z dziedziny żywienia człowieka oraz podstaw żywienia zwierząt.

Na pierwszym walnym zgromadzeniu członków założycieli PTNŹ w dniu 29.IX.1980 w Warszawie powołano 12-osobowy Zarząd Główny z którego wyłoniono przewodniczącego (prof. dr hab. Stanisław Berger), dwóch zastępców (prof. dr hab. Wiktor Szostak, prof. dr hab. Wanda Szotowa), sekretarza (doc. dr hab. Anna Gronowska-Senger), skarbnika (prof. dr hab. Światosław Ziemiański). Wybrano również Główną Komisję Rewizyjną (przewodniczący — prof. dr hab. Henryk Gertig) i Główny Sąd Koleżeńcki (przewodniczący — prof. dr hab. Władysław Kierst).

Poza działalnością statutową i organizacyjną (m.in. powołanie oddziałów PTNŹ i rekrutacja jego członków lub sekcji problemowych), PTNŹ postanawia koncentrować swoją pracę w obecnej kadencji w kierunku podnoszenia prestiżu nauk żywieniowych oraz współpracować i reprezentować w/w nauki w kraju i za granicą.

W ramach swojej działalności PTNŹ pragnie również stworzyć podstawy naukowe służące rozwiązywaniu złożonych problemów żywienia.

Siedzibą PTNŹ jest Instytut Żywienia Człowieka SGGW-AR, ul. Nowoursynowska 166, 02-766 Warszawa.

\* Rejestr Stowarzyszeń i Związków Wydziału Spraw Społeczno-Administracyjnych Urzędu m.st. Warszawy, nr rej. 1030.  
lipiec 1980 . . . . .

## SPIS TREŚCI

### Nowe w biochemii

M. Chorąży . . . . .	263
T. Twardowski, J. Julikowska, K. Gulewicz . . . . .	267
R. Gryglewski . . . . .	271
K. Famulski . . . . .	275
A. Jakubiec-Puka . . . . .	276

### Artykuły

E. Kurek—Prokariotyczne i wirusowe fosfokinazy białkowe i ich biologiczna rola . . . . .	281
K. W. Kasman—Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kręgowców . . . . .	295
A. Jakubiec-Puka—Filamenty pośrednie (10 nm) komórek zwierzęcych . . . . .	309
A. Jakubiec-Puka—Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych . . . . .	319
Z. Machoy—Wpływ związków fluoru na enzymy oddechowe . . . . .	327
A. Przykorska—Zastosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny . . . . .	339
Sprawozdanie (T. Twardowski)—EMBO-FEBS tRNA workshop, Strasbourg, lipiec 1980 . . . . .	353

### Recenzje książek

Pharmakokinetik und Biotransformation; eine Einführung . . . . .	357
Human nutrition; a comprehensive treatise t. 3A i 3B . . . . .	358
Alkaline Phosphate . . . . .	359
Pathobiochemie und Laboratoriumsdiagnostik in der Parinatalperiode . . . . .	360
Subcellular Biochemistry, vol. 6 . . . . .	361
Pathobiochemie . . . . .	362
Toxische Beeinflussung der Hämostase . . . . .	363
Allgemeine Mikrobiologie . . . . .	364
Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organische Verbindungen . . . . .	364
Kronika PTBioch. . . . .	365

### Komunikaty



# POSTĘPY BIOCHEMII

December 1981

## ARTICLES IN POLISH

Volume 27

Number 3—4

Biochemical news

### Articles

E Kurek — Procariotic and viral Protein Kinase and their biological Role (Dept. Mol. Biol., Inst., Microbiol., University of M. Curie-Skłodowska, Lublin)	281
K. W. Kasman — Structure, Protein Composition and Function of the M-line of the vertebrate skeletal Muscle (Dept. Cell Biochem., Nencki Inst. Exp. Biol., Warszawa)	295
A. Jakubiec-Puka — Intermediate Filaments (10 nm) of Animal Cells (Nencki Inst. Exp. Biol., Warszawa)	309
A. Jakubiec-Puka — Intermediate Filaments (10 nm) of Muscle Fibres (Nencki Inst. Exp. Biol., Warszawa)	319
Z. Machoy — The Effect of fluorine Compounds on the respiratory Enzymes (Dept. Biochem., Inst. Physiol. and Chem., Pomeranian Med. Acad., Szczecin)	327
A. Przykorska — Utilization of Nucleolitic Enzymes in Searching Structure of Chromatin (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	339
Book Reviews	357
Cronicle	369

## SPIS TREŚCI — TOM XXVII, 1981

### ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

N. Grankowski — Problemy regulacji syntezy białka u <i>Eukariota</i> . . .	3
K. Nowak — Prebiałka . . . . .	29
A. Krówczyńska — Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym RNA . . . . .	41
A. Grzelińska — Poinfekcyjne zmiany w procesie regulacji genetycznej u roślin . . . . .	67
Cz. Cierniewski, T. Krajewski — Interakcje osoczowych czynników krzepnięcia krwi . . . . .	81
R. Dąbrowska — Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni . . . . .	125
P. Masłowski, S. Kowalczyk — Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki . . . . .	147
T. Sawicka — Biosynteza glikokoniugatów plazmolemy komórek ssaków . . . . .	157
J. Andrzejczuk-Hybel — Roślinne i bakteryjne inhibitory enzymów amylolytycznych . . . . .	181
E. M. Rakowicz-Szulczyńska — Sekwencje sygnałowe w białkach . . . . .	197
D. Kierek-Jaszczuk — Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków . . . . .	217
E. Kurek — Prokariotyczne i wirusowe fosfokinazy białkowe i ich biologiczna rola . . . . .	281
K. W. Kasman — Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kręgowców . . . . .	295
A. Jakubiec-Puka — Filamenty pośrednie (10 nm) komórek zwierzęcych . . . . .	309
A. Jakubiec-Puka — Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych . . . . .	319
Z. Machoy — Wpływ związku fluoru na enzymy oddechowe . . . . .	327
A. Przykorska — Zastosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny . . . . .	339

### NOWE W BIOCHEMII

E. Bartnik — Nagroda Nobla w dziedzinie chemii 1980 . . . . .	123
M. Chorąży — Ceny eukariontów i wirusy enkogenne — struktura i transkrypcja . . . . .	263
T. Twardowski, J. Pulikowska, K. Gulewicz — Badania nad strukturą i funkcją czynnika elongacyjnego EFTu z bakterii <i>E. coli</i> . . . . .	267
R. Gryglewski — Kaskada kwasu arachidowego . . . . .	271
K. Famulski — Udział wirusowej kinazy białkowej w procesie nowotworzenia . . . . .	275
A. Jakubiec-Puka — Obecne poglądy na wewnątrzkomórkowy katabolizm białek . . . . .	276

## RECENZJE KSIĄŻEK

- B. Grzelakowska-Sztabert — Purine metabolism in man — III; Biochemical, immunological and cancer research. Red. A. Rapado, R. W. E. Watts, Ch. H. M. M. de Bruyn, Plenum Press, New York i London, 1979 . . . . . 113
- H. Adler — Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten. U. Spragner, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . . 114
- B. Czartoryska — Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 125. Structure and Function of Gangliosides. Red. L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus i P. F. Urbano. Plenum Press, New York, London, 1980 . . . . . 11
- St. Lewak — Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, E. Libbert. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979 . . . . . 116
- J. Kączkowski — Genome organization and Expression in Plants. Red. C. J. Leaver, Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . . 251
- J. Skangiel-Kramaska — GABA — Biochemistry and CNS Functions. Red. P. Mandel, P. V. De Fuedis. Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . . 253
- W. Rode — A. Ben-Naim, Hydrophobic Interactions. Plenu Press, New York, London, 1980 . . . . . 254
- A. Danek — S. Pfeifer, H. H. Borchert. Pharmakekinetik und Biotransformation eine Einführung. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . . 357
- B. Grzelakowska-Sztabert — Human nutrition; a comprehensive treatise t. 3A — Nutrition and the adult; macronutrients; t. 3B — Nutrition and the adult: micronutrients. Red. Roslyn B. Alfin — Slater and David Kritchevsky. Plenum Press, New York, 1980 . . . . . 358
- St. Knypl — Robert B. McComb, George N. Bowers Jr., and Solomon Posen. Alkaline phosphate. Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . . 359
- J. Gregorczyk — Pathobiochemie und Laboratoriummediagnostik in der Perinatalperiode. Red. I. Gross, D. Scheuch. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . . 360
- E. Wałajtyś-Rode — Subcellular Biochemistry, vol. 6. Red. D. B. Roodyn. Plenum Press, New York and London, 1979 . . . . . 361
- I. Kąkol — Pathobiochemie. Perspektiven und Entwicklungstendenzen für die klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981 . . . . . 362
- I. Kąkol — Toxische Beeinflussung der Hämostase. Wyd. Hans-Peter Klöcking. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981 . . . . . 363
- H. Meisel — Heinz Weide, Harald Aurich. Allgemeine Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979 . . . . . 364
- W. Rode — Z. J. Vejdělek, B. Kakač. Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen. Ergänzungsband I. Organische Farbreagenzien. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980 . . . . . 364

## KRONIKA

- III Zjazd ESM, Bled, Jugosławia (J. Skangiel-Kramaska, M. Skup) . . . . . 107
- I Zjazd International Society for Developmental Neuroscience, Strasbourg, Francja (A. Potempska) . . . . . 108
- II Konferencja Eur. Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Male, Belgia (B. Czartoryska) . . . . . 109
- Konferencja nt. „Regulacyjne funkcje procesów fosforylacji białek”, Lublin (E. Gąsior) . . . . . 111



VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Strasbourg, Francja (Z. Zarebska) . . . . .	239
IV Krajowe Konserwatorium nt. „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów (K. Waliszewski) . . . . .	242
Skrót sprawozdania z działalności PTBioch za okres 23.IX.1977—11.IX.1980 . . . . .	243
Ankieta Redakcji Acta Biochimica Polonica . . . . .	255
Kronika PTBioch . . . . .	369
Sprawozdanie — EMBO-FEBS tRNA workshop, Strasbourg, 1980 (T. Twardowski) . . . . .	353

## INDEKS AUTORÓW — TOM XXVII, 1981

Zeszyt

## A

Adler H. — Abkürzungen in der Medizin und ihren Randgebieten. U. Spranger. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . .	I
Andrzejczuk-Hybel J. — Roślinne i bakteryjne inhibitory enzymów amylolitycznych . . . . .	II

## B

Bartnik E. — Nagroda Nobla w dziedzinie biochemii 1980 . . . . .	II
------------------------------------------------------------------	----

## C

Chorąży M. — Geny eukariontów i wirusy enkogenne — struktura i transkrypcja . . . . .	III
Cierniewski Cz., Krajewski T. — Interakcje osoczowych czynników krzepnięcia krwi . . . . .	I
Czartoryska B. — Sprawozdanie — II Konferencja Eur. Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Male, Belgia . . . . .	I
Czartoryska B. — Recenzja książki — Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 125. Structure and Function of Gangliosides. Red. L. Svennerholm, P. Mandel, H. Dreyfus i P. F. Urbano. Plenum Press, New York, London, 1980 . . . . .	I

## D

Danek A. — S. Pfeifer, H. H. Borchert. Pharmakokinetik und Biotransformation eine Einführung. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . .	III-IV
Dąbrowska R. — Fosforylacja białek aparatu kurczliwego mięśni . . . . .	II

## F

Famulski K. — Udział wirusowej kinazy białkowej w procesie nowotworzenia . . . . .	III-IV
------------------------------------------------------------------------------------	--------

## G

- Gąsior E. Sprawozdanie z konferencji nt. „Regulacyjne Funkcje procesów fosforylacji białek”, Lublin . . . . . I
- Grankowski N. — Problemy regulacji syntezy białka u Eukariota . . . . . I
- Gregorczyk J. — Recenzja książki — Pathobiochemie und Laboratoriummediagnostik in der Perinatalperiode. Red. I. Gross, D. Scheuch. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1980 . . . . . III-IV
- Gryglewski R. — Kaskada kwasu arachidowego . . . . . III-IV
- Grzelakowska-Sztabert B. — Recenzja książki — Purine metabolism in man — III; Biochemical, immunological and cancer research. Red. A. Rapado, R. W. E. Watts, Ch. H. M. M. de Bruyn. Plenum Press, New York i London, 1979 . . . . . I
- Grzelakowska-Sztabert B. — Recenzja książki — Human nutrition; a comprehensive treatise t. 3A — Nutrition and the adult: macronutrients; t. 3B — Nutrition and the adult: micronutrients. Red. Roslyn B. Alfin — Slater and David Kritchevsky. Plenum Press, New York i London, 1980 . . . . . III-IV
- Grzelińska A. — Poinfekcyjne zmiany w procesie regulacji genetycznej u roślin . . . . . I
- Gulewicz K. — (patrz Twardowski T., Pulikowska J., Gulewicz K.) . . . . . III-IV

## J

- Jakubiec-Puka A. — Filamenty pośrednie (10 nm) komórek zwierzęcych . . . . . III-IV
- Jakubiec-Puka A. — Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych . . . . . III-IV
- Jakubiec-Puka A. — Obecne poglądy na wewnątrzkomórkowy katabolizm białek . . . . . III-IV

## K

- Kasman K. — Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kręgowców . . . . . III-IV
- Kączkowski J. — Recenzja książki — Genome organization and Expression in Plants. Red. C. J. Leaver. Plenum Press, New York i London, 1979 . . . . . II
- Kąkol I. — Recenzja książki — Toxische Beeinflussung der Hämostase. Wyd. Hans-Peter Klöcking. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981 . . . . . III-IV
- Kąkol I. — Recenzja książki — Pathobiochemie. Perspektiven und Entwicklungstendenzen für die klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981 . . . . . III-IV
- Kierek-Jaszczuk D. — Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków . . . . . II
- Knypl St. — Recenzja książki — Robert B. McComb, George N. Bowers Jr. and Solomon Posen. Alkaline Phosphate. Plenum Press, New York i London, 1979 . . . . . III-IV
- Kowalczyk S. — (patrz Masłowski P., Kowalczyk S.) . . . . . II
- Krajewski T. — (patrz Cierniewski Cz., Krajewski T.) . . . . . I
- Krówczyńska A. — Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym RNA . . . . . I

- Kurek E. — Prokariotyczne i wirusowe fosfokinazy białkowe i ich biologiczna rola . . . . . III-IV

## L

- Lewak St. — Recenzja książki — Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. E. Libbert. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979 . . . . . I

## M

- Machoy Z. — Wpływ związku fluoru na enzymy oddechowe . . . . . III-IV  
 Masłowski P., Kowalczyk S. — Rola nieorganicznego pirofosforanu w bioenergetyce komórki . . . . . II  
 Meisel H. — Recenzja książki — Heinz Weide, Harald Aurich. Allgemeine Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1979 . . . . . III-IV

## N

- Nowak K. — Prebiałka . . . . . I

## P

- Potempska A. — Sprawozdanie — I Zjazd International Society for Developmental Neuroscience, Strasbourg, Francja . . . . . I  
 Przykorska A. — Zastosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny . . . . . III-IV  
 Pulikowska J. — (patrz Twardowski T., Pulikowska J., Gulewicz K.) . . . . . III-IV

## R

- Rakowicz-Szulczyńska E. M. — Sekwencje sygnałowe w białkach . . . . . II  
 Rode W. — Recenzja książki — A. Ben-Naim. Hydrophobic Interactions. Plenum Press, Nowy York i London, 1980 . . . . . III-IV  
 Rode W. — Recenzja książki — Z. J. Vejdělek, B. Kakač. Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen. Ergänzungsband I. Organische Farbreagenzien. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1980 . . . . . III-IV

## S

- Sawicka T. — Biosynteza glikokoniugatów plazmolemy komórek ssaków . . . . . II  
 Skangiel-Kramaska J., Skup M. — Sprawozdanie — III Zjazd ESM, Bled, Jugosławia . . . . . I  
 Skangiel-Kramaska J. — Recenzja książki — GABA — Biochemistry and CNS Functions. Red. P. Mandel, P. V. de Fuedis. Plenum Press, New York, London, 1979 . . . . . II  
 Skup M. — (patrz Skangiel-Kramaska J., Skup M.) . . . . . I



## T

- Twardowski T., Pulikowska J., Gulewicz K. — Badania nad strukturą i funkcją czynnika elongacyjnego EFTu z bakterii *E. coli* . . . . . III-IV
- Twardowski T. — Sprawozdanie — EMBO-FEBS tRNA workshop. Strasbourg, 1980 . . . . . III-IV

## W

- Waliszewski K. Sprawozdanie — IV Krajowe Konserwatorium nt. „Nowe metody analityczne i usprawnienia pracy automatycznych analizatorów aminokwasów . . . . . II
- Wałajtys-Rode E. — Recenzja książki — Subcellular biochemistry, vol. 6. Red. D. B. Roodyn, Plenum Press, New York i London, 1979 . . . . . III-IV

## Z

- Zarębska Z. — Sprawozdanie — VII Międzynarodowy Kongres Fotobiologiczny, Strasbourg, Francja . . . . . II

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

**Układ maszynopisu:** strona 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.

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

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

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) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

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

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

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

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





## SPIS TREŚCI

## Nowe w biochemii

M. Chorąży	263
T. Twardowski, J. Pulikowska, K. Gulewicz	267
R. Gryglewski	271
K. Famulski	275
A. Jakubiec-Puka	276

## Artykuły

E. Kurek — Prokariotyczne i wirusowe fosfokinazy białkowe i ich biologiczna rola	281
K. W. Kasman — Struktura, skład białkowy i funkcja linii M mięśni szkieletowych kregowców	295
A. Jakubiec-Puka — Filamenty pośrednie (10 nm) komórek zwierzęcych	309
A. Jakubiec-Puka — Filamenty pośrednie (10 nm) włókien mięśniowych	319
Z. Machoy — Wpływ związków fluoru na enzymy oddechowe	327
A. Przykorska — Zastosowanie enzymów nukleolitycznych do badania struktury chromatyny	339
Sprawozdanie (T. Twardowski) — EMBO-FEBS (tRNA workshop, Strasbourg, lipiec 1980)	353

## Recenzje książek

Pharmakokinetik und Biotransformation; eine Einführung	357
Human nutrition; a comprehensive treatise t. 3A i 3B	358
Alkaline Phosphate	359
Pathobiochemie und Laboratoriumsdiagnostik in der Perinatalperiode	
Subcellular Biochemistry, vol. 8	360
Pathobiochemie	361
Toxische Beeinflussung der Hämostase	362
Allgemeine Mikrobiologie	363
Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse organischer Verbindungen	364

## Kronika PTBioch.

365

## Komunikaty

Post. Biochem. 27 z. 3—4 s. 261—380

Indeks 36969