

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTĘPY BIOCHEMII
(0032-5422) (1982)

1982

tom 28 nr 4
PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1982 TOM 28 ZESZYT 4

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 28 (4)
(383—526) (1982)

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 1983

Nakład 2300	Oddano do składania 28.VII.1982 r.
Ark. wyd. 10; ark. druk. 9,0	Podpisano do druku w kwietniu 1983 r.
Pap. d. b. sat. kl. III 90 g 70×100	Druk ukończono w czerwcu 1983 r.
Zam. 2952/82	Cena zł 60,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



Profesor dr Józef Heller
1896—1982

Założyciel i pierwszy redaktor kwartalnika Postępy Biochemii, członek honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, wybitny uczyony, twórca szkoły biochemii porównawczej, nauczyciel wielu pokoleń biochemików i lekarzy, zasłużony organizator biochemii polskiej, zmarł w Warszawie dnia 24 maja 1982 r. Żegnamy Go z wielkim żalem.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

1900-1901

Wspomnienie o Profesorze Józefie Hellerze

Profesor Józef Heller urodził się 3 stycznia 1896 roku we Lwowie w rodzinie nauczycielskiej. Egzamin dojrzałości złożył w 1914 roku, a w dwa lata później rozpoczął studia lekarskie na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie. Gdy wybuchła I wojna światowa, maturzysta wstępuje do Legionów Polskich i dzieli losy tej formacji. Służbę kończy w 5 pułku piechoty Legionowej odznaczony Krzyżem Walecznych i Odznaką „Za wierną służbę”. Potem jeszcze raz staje w szeregu, aby wziąć udział w III Powstaniu Śląskim. Dyplom Doktora Wszech Nauk Lekarskich uzyskuje w 1922 roku na lwowskim Uniwersytecie.

W latach 1921—1935 jest asystentem na Uniwersytecie Jana Kazimierza we Lwowie, początkowo w Katedrze Chemii Lekarskiej u prof. Jakuba Parnasa, a później w Zakładzie Higieny u prof. Zdzisława Steusinga. Rozpoczyna już wówczas badania nad fizjologią i biochemią owadów. Przez całe życie, jak wówczas, będzie dzielił swe siły i czas pomiędzy pracę naukową a liczne i często uciążliwe obowiązki organizacyjne, podejmowane w poczuciu społecznej potrzeby. W roku 1926 organizuje i przez kilka lat prowadzi Pracownię Analityczną Ubezpieczalni Społecznej we Lwowie, a w latach 1936—1939 Filię Państwowego Zakładu Higieny w Krakowie.

Habilituje się w 1937 roku na Uniwersytecie Stefana Batorego w Wilnie na podstawie pracy „Badania nad przeobrażeniem owadów”. Kampanię wrześniową drugiej wojny światowej odbywa w stopniu majora-lekarza w X Kadrcie Sanitarnej W.P. W latach 1940—1941 prowadzi we Lwowie Katedrę Biochemii na Wydziale Przyrodniczym Uniwersytetu, a następnie Katedrę Chemii Ogólnej Instytutu Medycznego. W latach 1942—1944 na Tajnym Uniwersytecie w Warszawie wykłada biochemię i fizjologię przyszłym lekarzom i farmaceutom. W przeszłości sam student-żołnierz rozumie dobrze tę młodzież. Po latach powie o niej, iż nigdy wcześniej ani później nie miał równie chłonnych słuchaczy. Wywieziony w 1944 roku do obozu pracy w Hanowerze, po wkroczeniu aliantów raz jeszcze wkłada mundur, obejmując stanowisko komendanta szpitala wojskowego Polskich Sił Zbrojnych na Zachodzie. To tam właśnie jest współzałożycielem Polskiego Związku Wychodźstwa Przymusowego, który zajmąwszy po wyzwoleniu drukarnię wydał „Pana Tadeusza”. Unikalny egzemplarz tej książki miał swoje poczesne miejsce w bibliotece domowej prof. Hellera.

Po powrocie do kraju pracuje na Ziemiach Odzyskanych. W katedrze Fizjologii Zwierząt na Wydziale Przyrodniczym Uniwersytetu we Wrocławiu wznawia swe badania nad owadami i kształci studentów. W 1946 roku zostaje mianowany profesorem nadzwyczajnym, a dwa lata później profesorem zwyczajnym. Równocześnie służy zniszczonemu i wyczerpanemu Krajowi swym doświadczeniem organizacyjnym, tworząc filię Państwowego Zakładu Higieny w Szczecinie i kierując przez rok, zastępczo, wrocławską filią PZH. Włącza się też w trud budowy szkolnictwa medycznego na Śląsku jako konsultant naukowy Akademii Medycznej w Rokitnicy.

W 1951 roku profesor Heller przenosi się do Warszawy. Nadal nie rezygnuje z umiłowanego kierunku badań nad owadami, ale, jak sam to później powie, myśli „o przyszłości, o wykształceniu kadr w wielu dziedzinach biochemii”. Przed takim zadaniem stanął bowiem obejmując Katedrę Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej i podejmując się zorganizowania Działu Biochemii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Obie placówki miały stanowić załazek nowoczesnego ośrodka naukowego polskiej biochemii. Wytrwałe, mądre i dalekowzroczne poczynania profesora Hellera sprawiły, że skupił On wokół siebie ludzi gotowych ośrodek taki współtworzyć. Już w 1953 roku powstaje pod Jego kierunkiem Zakład Biochemii Polskiej Akademii Nauk. Zakład szybko dorasta do rangi instytutu i w 1957 roku przekształca się w Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, a profesor Heller staje na jego czele jako dyrektor. Pozostaje On na tym stanowisku do chwili przejścia na emeryturę w 1967 roku, ale do 1981 roku jest przewodniczącym Rady Naukowej Instytutu, a do końca życia honorowym przewodniczącym tej Rady.

Jest Instytut Biochemii i Biofizyki PAN największym dziełem życiowym Profesora Hellera. Znaczna część kadry naukowej tego poważnego, liczącego się w nauce ośrodka badawczego biologii molekularnej, wśród nich sześciu profesorów, to wychowankowie Profesora. Jemu zawdzięcza Instytut zaszczepienie i pielęgnowanie szacunku dla pracy naukowej, otwartości na to, co w nauce nowe, poczucia więzi z nauką światową, mądrej tolerancji i świadomości, że za każdym sukcesem naukowym stoi tyleż pracy co talentu, a każda godność naukowa więcej nakłada obowiązku niż daje przywileju.

Zmudna, uparta, niosąca wiele trosk i porażek praca nad tworzeniem i rozwojem Instytutu, przyciąganiem i kształceniem kadry, zdobywaniem środków, zabieganiem o miejsce i wyposażenie, torowaniem drogi ku światu i zaszczepianiem nowych kierunków badawczych pozostawiała, zdawałoby się, niewiele czasu. A jednak przez 11 lat sprawował funkcje kierownika Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie opiekując się kształceniem przyszłych lekarzy. Założył i przez wiele lat redagował „Postępy Biochemii”, był długoletnim redaktorem Serii Biologicznej Biuletynu PAN, czuwał jako redaktor naukowy nad jakością no-

wych podręczników biochemii tłumaczonych z języka angielskiego. Pisał też sam artykuły przeglądowe o różnej tematyce biochemicznej i opracowywał hasła biochemiczne dla Wielkiej Encyklopedii Powszechnej PWN. O rozwój nauki, zwłaszcza zaś biochemii, zabiegał nieustannie w Komitecie Biochemicznym PAN, którego był pierwszym przewodniczącym, w towarzystwach naukowych, których był czynnym członkiem — we Wrocławskim Towarzystwie Naukowym, Towarzystwie Przyrodników im. Mikołaja Kopernika, Polskim Towarzystwie Fizjologicznym i w Polskim Towarzystwie Biochemicznym, którego był członkiem założycielem i członkiem honorowym. Reprezentował też naukę polską za granicą pełniąc funkcję v-przewodniczącego Międzynarodowej Unii Biochemicznej, członka zarządu Międzynarodowego Komitetu Standaryzacji w Biologii Człowieka i członka Biochemical Society. Wyrazem uznania międzynarodowego autorytetu Profesora był w 1962 roku wybór na członka Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina.

Powołany w 1952 roku na członka korespondenta Polskiej Akademii Nauk, został w 1961 roku jej członkiem rzeczywistym. W 1951 roku otrzymał za całokształt działalności Nagrodę Państwową II stopnia. Był odznaczony Krzyżem Niepodległości i Złotym Krzyżem Zasługi w okresie międzywojennym a po wojnie Krzyżem Komandorskim z Gwiazdą Orderu Odrodzenia Polski.

W pamięci znających Profesora bliżej, pozostanie On zawsze jako badacz-przyrodnik, spokojnie i uważnie obserwujący swoje ulubione wilczomlecunki. To prawda, że wykształcenie lekarskie wycisnęło piętno także i na twórczości Profesora. Rozpoczął ją wspólnym z prof. Parnasem odkryciem ammoniogenezy we krwi i skonstruowaniem aparatu Parnasa-Hellera do oznaczania mikroilości amoniaku. Zajmował się analizą chemiczną krwi, składnikami azotowymi, substancjami redukującymi i znaczeniem tych danych dla diagnozy i leczenia. Interesował się badaniami biochemicznymi prątka gruźlicy i sam się nimi po wojnie zajmował ze swymi współpracownikami. Jednakże główny nurt zainteresowań stanowiły zagadnienia teoretyczne fizjologii i biochemii. O pracy badawczej Profesora tak pisał Jego długoletni przyjaciel, prof. W. Mozołowski: „Idealnym jej celem to poznanie praw, ogólnie obowiązujących w przemianie żywych organizmów a badanych na materiale biologicznym wykazującym możliwie największą różnorodność nasilenia tych procesów; toteż wybór Hellera pada na owady z ich postaciami rozwojowymi przedstawiającymi w ramach jednego gatunku bardzo rozległy zakres natężenia przemian ustrojowych”. Wszechstronne badania fizjologii i biochemii wilczomlecunki prowadzone przez Profesora, odkryły zjawisko przeobrażenia powolnego i doraźnego. Poszukując przyczyny różnego czasokresu metamorfozy Profesor stwierdził, że poczwarki mają zdolność do obniżania przemiany podstawowej wraz ze wzrostem temperatury, a wspólnie z żoną, dr Mokłowską-Hellerową, ustalił, że zawartość fosforanu nieorganicznego w hemolimfie jest

odwrotnie proporcjonalna do wysokości tej przemiany. Stało się to początkiem prowadzonych już wspólnie z uczniami badań nad bilansem, przemianą i rolą związków fosforanowych, w tym fosfolipidów, kwasów nukleinowych i odkrytych u wilczomleczka pirofosforanów nieorganicznych. Odkrycie mechanizmu oddechowego niewrażliwego na cyjanki, obok oddychania cytochromowego, przyczyniło się później do rozwoju badań nad rolą chinonów i oksydaz końcowych w utlenianiu tkankowym. Zainteresowania Profesora przemianą białek podczas histolizy i morfogenezy miały też swój udział w rozwoju badań prowadzonych w IBB nad mechanizmami biosyntezy białka i związków purynowych oraz rolą kwasów nukleinowych a także hormonów owadzych. Wyniki swoich obserwacji poczynionych na ulubionym obiekcie umiał prof. Heller uogólniać tak, że inspirowały one różnorodne i różnokierunkowe badania prowadzone przez Jego wychowanków.

Żegnając Profesora Hellera na zawsze, żegnaliśmy Przełożonego i Przyjaciela z żalem ale i ze świadomością, że oto odszedł Ten, który miałby prawo powiedzieć: „non omnis moriar”.

Uczniowie

NOWE W BIOCHEMII

Kokancerogen jako czynnik zwiększający częstotliwość mutacji odpowiedzialnej za odporność komórek na antyfoliany

Częstym i wielce niepożądanym zjawiskiem towarzyszącym chemioterapii nowotworów przy zastosowaniu analogów kwasu foliowego (tzw. antyfolianów) jest pojawienie się oporności. Zjawisko to, badane od ponad dwudziestu lat w różnych układach biologicznych, związane jest najczęściej z podwyższeniem w komórkach opornych aktywności reduktazy dihydrofolianowej (DHFR^{*)}), enzymu szczególnie efektywnie hamowanego przez antyfoliany, jak również z upośledzeniem transportu antyfolianów do komórek lub z pojawieniem się w nich reduktazy dihydrofolianowej o znacznie obniżonym powinowactwie do antyfolianów. Dzięki badaniom Schimke i wsp. (1, 2) już od roku 1977 wiadomo, że podwyższona aktywność DHFR w komórkach opornych na ametoptynę, jeden z najpowszechniej stosowanych antyfolianów, jest często rezultatem zwielokrotnienia genu tego enzymu, co w efekcie prowadzi do zwiększenia syntezy tego określonego białka enzymatycznego**).

Zwielokrotnienie genu DHFR a tym samym zwiększenie możliwości syntezy DHFR, powiększa szanse przeżycia komórek w obecności toksycznych skądinąd dawek antyfolianu.

Spontaniczne mutacje, prowadzące do ujawnienia się w populacji komórek opornych na antyfolian są rzadkie. W 1981 roku Varshavsky wykazał, że kokancerogen — octan forbolu (13-octan-12-O-tetradekanylo-forbolu), TPA, a także hormon taki jak insulina, w bardzo silnym stopniu zwiększały w populacji hodowanych *in vitro* mysich fibroblastów 3T6 częstotliwość pojawiania się komórek opornych na ametoptynę (3).

Na ogół w populacji fibroblastów 3T6 hodowanych w środowisku zawierającym ametoptynę w stężeniu 10^{-7} M częstotliwość pojawiania się kolonii komórek opornych jest rzędu $3-4 \times 10^{-7}$. Octan forbolu obecny wraz z ametoptyną w środowisku selekcyjnym zwiększał ilość kolonii komórek opornych na antyfolian w tym stężeniu ponad stukrotnie. Wynik ten uzyskano stosując TPA w szerokim zakresie stężeń (efekt maksymalny przy stężeniu 162 nM) i przy różnej gęstości wyjściowej komórek.

Zwiększenia ilości komórek opornych na ametoptynę nie wywoływał związek pokrewny — forbol, ani też sulfotlenek dwumetylu (DMSO), stosowany do sporządzania roztworów powyższych związków. Komórki odporne na ametoptynę, wyselekcjonowane w obecności TPA, po jego usunięciu nadal pozostawały odporne, a ich oporność na ametoptynę wynikała ze zwielokrotnienia w nich genu kodującego DHFR. A mianowicie, w komórkach 3T6 zdolnych do wzrostu w obecności

*) Oksydoreduktaza 5,6,7,8-tetrahydrofolian:NADP⁺ (E.C.1.5.1.3).

***) Niektóre aspekty zwielokrotnienia genu DHFR pod wpływem antyfolianów poruszono w „Postępach Biochemii”: Fikus M., Zielińska Z., (1979), 25, 254—256.

ametoptyeryny w stężeniach 100, 200 i 300 nM, liczba genów DHFR (oznaczona przy zastosowaniu techniki hybrydyzacji punktowej (*dot. hybridization procedure* wg Kafatosa i wsp., (4)), w znacznym stopniu zależała od selekcyjnego stężenia ametoptyeryny i była trzy, dziesięcio- i szesnastokrotnie wyższa niż we wrażliwych fibroblastach 3T6. Natomiast ilość reduktazy dihydrofolianowej w komórkach zawierających 16-krotnie więcej genu niż komórki wrażliwe na ametoptyerynę była nawet 80 razy wyższa. Wynik ten sugeruje, że zwielokrotnieniu genu DHFR towarzyszyło zwiększenie jego aktywności transkrypcyjnej. TPA należy do grupy tzw. czynników kokancerogennych (*tumor promoters*), zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia transformacji nowotworowej i rozwoju nowotworu, zainicjowanych uprzednim poddaniem komórek działaniu kancerogenu — chemicznego czynnika rakotwórczego (5). TPA sam, nie wykazuje działania mutagennego, jednakże wywołuje bardzo liczne efekty, między innymi takie jak przyspieszenie metabolizmu komórkowego i wzrostu komórek, stymulację różnych funkcji błon komórkowych (np. transportu cukrów i fosfolipidów), indukcję niektórych enzymów (np. aktywatora plazminogenu czy też dekarboksylazy ornitynowej). Trudno jednak jest powiązać bezpośrednio któryś z powyższych efektów TPA ze zwiększoną częstotliwością zwielokrotnienia genu DHFR.

Varshavsky dyskutuje dwie możliwe interpretacje obserwowanego efektu TPA. Pierwsza z nich zakłada, że TPA nie stymuluje zwielokrotnienia genu DHFR, sam jednak ułatwia w środowisku zawierającym antyfolian przeżycie komórek obdarzonych tą cechą. Dodatkowym założeniem niezbędnym w tej hipotezie jest postulat, że samo zwielokrotnienie genu DHFR nie wystarcza do zapewnienia przeżycia komórek w środowisku z antyfolianem. Drugie tłumaczenie sposobu działania TPA opiera się na koncepcji wysuniętej przez Varshavskiego w 1981 roku o metabolicznej kontroli replikacji genomu poprzez endo- lub egzogenne substancje określane mianem „*firone*” (6). Ich działanie miałyby polegać na wywoływaniu w określonych fragmentach genomu dodatkowych, „bezpprawnych” replikacji (tzw. *misfirings*), pociągających za sobą w efekcie zwielokrotnienie obecnych w nim genów. Według tej koncepcji octan forbolu można traktować jako substancję typu „*firone*”, wywołującą serię, poza normalnym cyklem komórkowym, dodatkowych podziałów, prowadzących do zwielokrotnienia fragmentu genomu zawierającego gen DHFR.

Dane doświadczalne nie dają jeszcze odpowiedzi na pytanie czy zwielokrotnienie genu jest wynikiem pojedynczego „wybuchu” replikacji czy jest procesem wieloetapowym. Jest oczywiste, że powyższe dwie interpretacje nie wyczerpują możliwych mechanizmów prowadzących do zwielokrotnienia genu. Niektóre z nich, jak pobieranie przez komórki fragmentów DNA z martwych komórek, nierówne „*crossing over*” czy też „nieproporcjonalną replikację” dyskutowane są w artykule Schimke i wsp. (7).

Oporność na leki jest zjawiskiem zawsze niekorzystnym. Stwierdzenie zatem, że znany kokancerogen czy też insulina mogą zwiększać w znacznym stopniu częstotliwość mutacji prowadzącej do wystąpienia oporności na antyfoliany jest niezmiernie ważne z punktu widzenia chemioterapii. Jest wielce prawdopodobne, że podobne zjawisko może mieć miejsce *in vivo*. Varshavsky obawia się, że jeśli w nowotworze poddawanym terapii antyfolianem pojawi się substancja typu „*firone*” o działaniu zbliżonym do działania octanu forbolu, to wówczas ilość komórek opornych na antyfolian mogłaby dramatycznie wzrosnąć, co w efekcie spowodowałoby nieskuteczność stosowanego leczenia. Zastosowanie w chemioterapii nowotworów razem z antyfolianem związków przeciwdziałających efektom kokancerogenów, np. witaminy A mogłoby według Varshavskiego (3) zapobiegać w pewnym stopniu wystąpieniu oporności na antyfoliany.

Dalszą sugestią, wynikającą z referowanych badań, jest możliwość wykorzystania systemu selekcyjnego komórki odporne na ametoperynę jako szybkiego testu do badania nowych kokancerogenów.

B. Grzelakowska-Sztabert

PIŚMIENNICTWO

1. Schimke R. T., Alt F. W., Kellems R. E., Kaufman R. J., Bertino J. R., (1978). *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* **42**, 649—657.
2. Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 1357—1370.
3. Varshavsky A., (1981), *Cell* **25**, 561—572.
4. Kafatos F. C., Jones C. W., Efstratiadis A., (1979), *Nucl. Acids Res.* **7**, 1541—1552.
5. Slaga T. J., (1981), *Postępy Mikrobiol.* **20**, 113—129.
6. Varshavsky A., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **78**, 3673—3677.
7. Schimke R. T., Kaufman R. J., Alt F. W., Kellems R. E., (1978), *Science* **202**, 1051—1055.

Transferowe kwasy rybonukleinowe. Właściwości i struktura

Transferowe kwasy rybonukleinowe (tRNA) spełniają jedną z podstawowych funkcji w procesie translacji, przenosząc enzymatycznie (1) związany aminokwas do rybosomalnego miejsca syntezy białka. W komórce znajduje się około 60 różnych tRNA rozpoznających 20 aminokwasów (2). W ostatnich latach zgromadzono wiele danych świadczących o udziale tRNA także w innych procesach komórkowych, takich jak: synteza ścian bakteryjnych, nierybosomalna modyfikacja białek, regulacja syntezy enzymów, regulacja transportu aminokwasów czy odwrotna transkrypcja (3). Wszystkie te procesy wymagają specyficznych oddziaływań tRNA z białkami lub kompleksami nukleobiałkowymi np. rybosomami (3). Do zrozumienia tych wysoce specyficznych rodzajów oddziaływań między białkiem i kwasem nukleinowym lub kwasem nukleinowym i kwasem nukleinowym konieczna jest znajomość struktury pierwszorzędowej (sekwencji nukleotydów) tRNA. W ostatnim czasie zanotowano olbrzymi postęp w tej dziedzinie. Obecnie znane są sekwencje ponad 330 różnych tRNA (4, 5) oraz sekwencje 88 tRNA odczytane z sekwencji genów tRNA (5). W 22 przypadkach poprawność określenia sekwencji tRNA potwierdzono porównując je z sekwencjami odpowiednich genów. Poznanie tak wielu struktur było możliwe dzięki wprowadzeniu nowych metod oznaczania struktury I-rzędowej kwasów nukleinowych (6).

Informacje zawarte w strukturze pierwszorzędowej tRNA są nie tylko niezbędne w badaniu oddziaływań międzycząsteczkowych z udziałem tRNA, ale wykorzystuje się je także do szukania podobieństw struktury specyficznych tRNA z różnych organizmów oraz w badaniu taksonomii organizmów (7). Określając sekwencję cytoplazmatycznego tRNA Phe *Euglena gracilis* i porównując ją z innymi znanymi tRNA Phe stwierdzono bardzo duże podobieństwo (94.7%) ze zwierzęcymi tRNA Phe oraz znacznie mniejsze podobieństwo z roślinami tRNA Phe (78.9%). Jest to jeden z argumentów pozwalających zaliczać *Euglena gracilis* raczej do zwierząt niż do roślin (8).

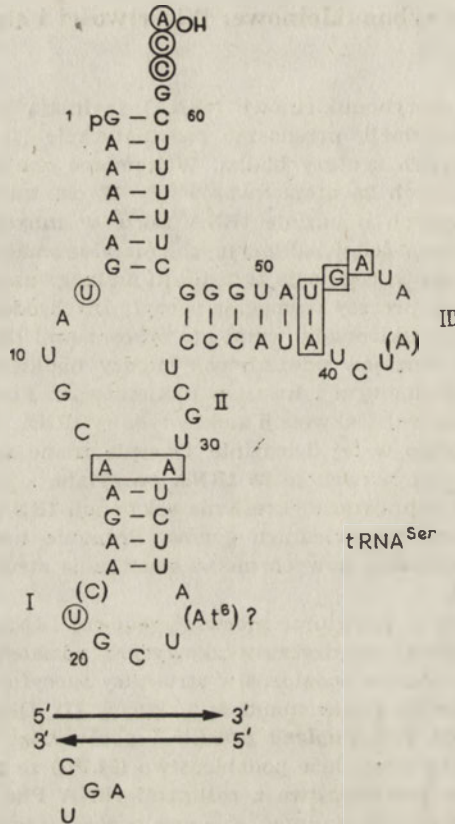
W ostatnich latach szczególne zainteresowanie skupia się na tRNA organelli komórkowych (chloroplasty i mitochondria), a także na supresorowych tRNA (7). Poznanie struktury I-rzędowej tRNA (mt tRNA) człowieka, krowy, drożdży, *Aspergillus nidulans* oraz *Neurospora crassa* umożliwiło zrozumienie organizacji kodu genetycznego w mitochondriach (7). Te wyspecjalizowane organelle zawierają około 20-25 tRNA (np. 23 rodzaje tRNA w mitochondriach człowieka (9)). Porównanie znanych struktur pierwszorzędowych mt tRNA pozwoliło na wykrycie następujących ich cech.

— mt tRNA zawierające urydynę (U) w pierwszej pozycji antykodonu (ang. *wobble position*) rozpoznają rodzinę 4 kodonów, natomiast tRNA zawierające zmodyfikowany nukleozyd urydyny (U*) rozpoznają tylko 2 kodony kończące się adenozyną (A) lub guanozyną (G) (9, 10).

— mt tRNA^{Trp} ma antykodon U*CA a nie CCA lub CmCA, jak w przypadku cytoplazmatycznego tRNA^{Trp} (10). Ponieważ mt tRNA^{Trp} drożdży wykazuje własności supresorowe *in vitro* względem kodonu UGA, to kodon UGA jest widocznym kodonem terminującym w mitochondriach (11). Jednakże obecność zmodyfikowanego nukleozydu U* w antykodonie mt tRNA^{Trp} wskazuje na możliwość rozpoznawa-

nia kodonów UGA i UGG i włączania tryptofanu do łańcucha polipeptydowego (10).

— tRNA^{Ser} mitochondriów ssaków nie zawiera ramienia i pętli dwuhydrourydyny i jest najkrótszym znanym tRNA (64 nukleozydy) (Ryc. 1) (12, 13).



Ryc. 1. Struktura II-rzędowa (model liścia kończyny) tRNA^{Ser} mitochondriów ssaków (12, 13).

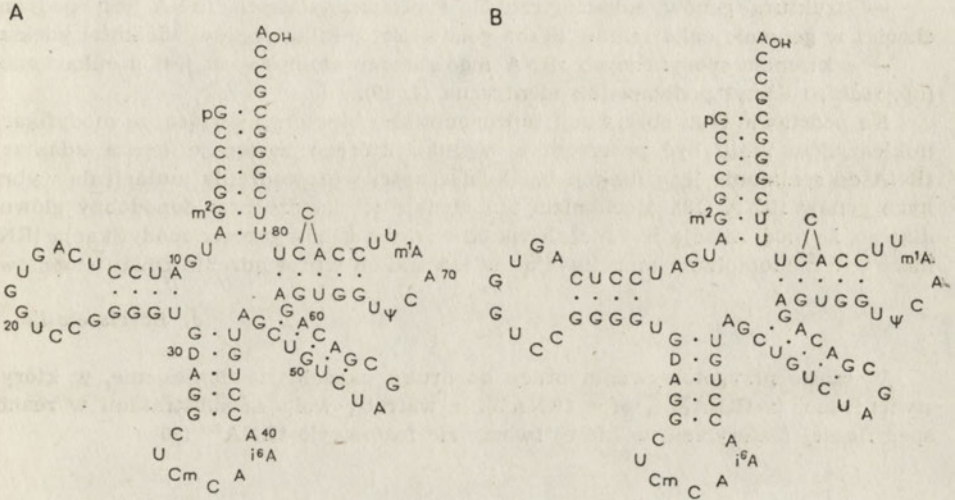
— izokodujące mt tRNA (ang. *isocoding mt tRNA*) człowieka i krowy wykazują duże różnice strukturalne w przeciwieństwie do cytoplazmatycznych tRNA z tych samych źródeł, które są bardzo podobne (7).

— niektóre mt tRNA zawierają dodatkowy nukleozyd w ramieniu rybotymidyny (7).

— tRNA^{T^h} mitochondriów drożdży zawiera antykodon UAG i rozpoznaje kodony leucynowe CUN (7).

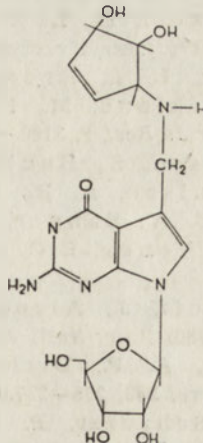
Niezwykle interesujące właściwości stwierdzono również badając cytoplazmatyczny tRNA^{Ser} wątroby wołu (14). Ten tRNA ulega enzymatycznej aminoacylacji seryną, chociaż ma antykodon tryptofanu CmCA (Ryc. 2). W obecności kodonu terminującego UGA, tRNA^{Ser}_{CmCA} ulega związaniu z rybosomami. Omawiany tRNA^{Ser} powoduje supresję terminującego kodonu UGA (opal supresor). Innymi słowy zmodyfikowany nukleozyd cytydyny (Cm) znajdujący się w antykodonie tRNA^{Ser} wątroby wołu oddziałuje z adenozyzną (A) a nie dochodzi do klasycznego oddziaływania z guanozyzną (G). Podobny rezultat obserwowano wcześniej w przypadku tRNA^{T^h}

Escherichia coli z antykodonem CCA, który rozpoznaje kodon UGA (15). Właściwości te (rzadko spotykane) mogą być konsekwencją obecności w tRNA^{Ser} dwu dodatkowych nukleozydów występujących między U8 i A14 (Ryc. 2) oraz, podobnie jak w przypadku niektórych mitochondrialnych tRNA, obecnością 1 dodatkowego niesparowanego nukleozydu w ramieniu rybotymidyny. Dwie alternatywne struktury II-rzędowe tRNA^{Ser}_{CmCA} wątroby wołu przedstawiono na Ryc. 2. Innym przykładem tRNA o ciekawych właściwościach jest supresorowy tRNA^{G17} (UGA supresor) (16).



Ryc. 2. Dwie alternatywne struktury tRNA^{Ser}_{CmCA} wątroby wołu (14).

Interesujący efekt zmodyfikowanych nukleozydów na oddziaływania kodon-antykodon stwierdzono badając naturalną supresję tRNA^{Tyr} *Drosophila melanogaster*. Znane są dwa tRNA^{Tyr} różniące się zmodyfikowanym nukleozydem w pierwszej pozycji antykodonu. tRNA^{Tyr}₁ zawierający antykodon GψA działa jako supresor UAG (amber), natomiast tRNA^{Tyr}₂ z antykodonem QψA nie wykazuje własności supresoro-



Ryc. 3. Struktura nukleozydu Q (4).

wych (17). Z danych tych wynika, że nukleozyd Q (Ryc. 3) nie pozwala na odczytywanie kodonu UAG prawdopodobnie oddziałując z mRNA. Ta obserwacja sugeruje, że obecność zmodyfikowanych nukleozydów może prowadzić do lepszego „dopasowania” tRNA do spełnienia jego funkcji.

Jest to widoczne gdy porównuje się sekwencje prokariotycznych i eukariotycznych tRNA i genów tRNA (18):

— tRNA izolowane z eukariontów są zmodyfikowane w większym stopniu niż tRNA z prokariotów.

— struktura genów eukariotycznych i prokariotycznych tRNA jest podobna, chociaż w genomie eukariontów liczba genów jest o kilka rzędów wielkości większa.

— sekwencja specyficznych tRNA tego samego aminokwasu jest u eukariontów (np. ssaki, rośliny) podobna lub identyczna (4, 19).

Na podstawie tych obserwacji zaproponowano hipotezę mówiącą, że modyfikacja nukleozydów może być procesem w wyniku którego następuje lepsza adaptacja tRNA do spełniania jego funkcji bez konieczności wprowadzenia mutacji do wybranych genów tRNA (18). Mechanizm ten wydaje się bardzo prawdopodobny głównie dlatego, że modyfikacja jest niezależna od wielości genów oraz że modyfikacja tRNA może być niekompletna umożliwiając w ten sposób wprowadzenie zmian stopniowo.

J. Barciszewski

W czasie przygotowywania pracy do druku ukazało się doniesienie, w którym stwierdzono, iż tRNA^{Met} oraz tRNA^{Leu} z wątroby wołu są substratami w reakcji specyficznej fosforylacji, w której tworzy się fosfoserylo-tRNA^{Ser} (20).

PIŚMIENNICTWO

1. Joachimiak, A., Barciszewski, J. (1980) *FEBS Lett.*, **119**, 201—211.
2. Favre, A., Thomas, G. (1981) *Ann. Rev. Biophys. Engineer.*, **10**, 175—195.
3. Rich, A., RajBhandary, U. L. (1976) *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860.
4. Barciszewski, J., Rafalski, A. (1981) *Atlas of Transfer Ribonucleic Acids and Modified Nucleosides*, Polish Scientific Publishers, Poznań.
5. Sprinzl, M., Gauss, D. H. (1982) *Nucleic Acids Res.*, **10**, r1—r55.
6. Stanley, J., Vassilenko, S. (1978) *Nature*, **274**, 87—89.
7. Cedergren, R. J., Sankoff, D., LaRue, B., Grosjean, H. (1981) *CRC Critical Rev. Biochemistry*; zeszyt czerwcowy.
8. Chang, S. H., Hecker, L. I., Brum, C. K., Schnabel, J. J., Heckman, J. E., Silberkland, M., RajBhandary, U. L., Barnett, W. E. (1981) *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3199—3204.
9. Barrell, B. G., Anderson, S., Bankier, A. T., de Bruijn, M. H. L., Chen, E. Y., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, I. G. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3164—3166.
10. Heckman, J. E., Sarnoff, J., Alzner-De Weerd, B., Yin, S., RajBhandary, U. L. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3159—3163.
11. Martin, R. P., Sibley, A. P., Dirheimer, C., de Henau, S., Grosjean, H. (1981) *Nature*, **293**, 235—237.
12. de Bruijn, M. H. L., Schreier, P. H., Barrell, B. G., Chen, E. Y., Armstrong, P. W., Wong, J. F. H., Roe, B. A. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5213—5222.

13. Arcari, P., Brownlee, G. G. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5207—5212.
14. Diamond, A., Dudock, B., Hatfield, D. (1981) *Cell*, **25**, 497—506.
15. Hirsh, D. (1971) *J. Mol. Biol.*, **58**, 439—458.
16. Prather, N. E., Murgola, E. J., Hims, B. H. (1981) *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6429—6438.
17. Bienz, M., Kubli, E. (1981) *Nature*, **294**, 188—190.
18. Kubli, E. (1980) *Trends Biochem. Sci.* **4**, 90—91.
19. Barciszewski, J., Joachimiak, A., Rafalski, A., Barciszewska, M., Twardowski, T., Wiewiórowski, M. (1979) *FEBS Lett.*, **102**, 194—197.
20. Hatfield, D., Diamond, A., Dudock, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **79**, 6215—6219.

KRONIKA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

NOWI PROFESOROWIE

Rada Państwa nadała tytuł profesora zwyczajnego **profesor dr Zofii Marii Lassotowej** z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie i **profesorowi dr Wincentemu Kilarskiemu** z Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Tytuł profesora nadzwyczajnego Rada Państwa nadała następującym członkom Towarzystwa:

prof. dr Renacie Marii Dąbrowskiej z Instytutu im. M. Nenckiego w Warszawie,

prof. dr Alinie Taylor z Uniwersytetu Gdańskiego,

prof. dr Januszowi Gregorczykowi z PAM w Szczecinie,

prof. dr Leszkowi Tomaszewskiemu z AM w Warszawie,

prof. dr Michałowi Małofiejewowi z AM w Białymstoku.

Nowym profesorom gratulujemy i życzymy dalszych sukcesów w pracy naukowej.

NOWI CZŁONKOWIE TOWARZYSTWA

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na posiedzeniu plenarnym w dniu 10 grudnia 1982 roku przyjął w poczet członków Towarzystwa Krystynę Bolewską, Martę Czupryn, Marię Urszulę Malinowską, Sławomira Maślińskiego i Włodzimierza Maślińskiego z Warszawy, Irenę Kustrzebę-Wójciką i Grzegorza Sawickiego z Wrocławia.

NAGRODY TOWARZYSTWA

Komisja nagrody im. J. K. Parnasa przyznała nagrodę za najlepszą pracę doświadczalną opublikowaną w 1981 roku Anastasisowi Pacanisowi, Jerzemu Rogulskiemu i Tadeuszowi Strzeleckiemu za dwie prace opublikowane w J. Biol. Chem. zatytułowane: „Studies on chemical and enzymatic synthesis of maleyl-CoA”, vol. 256, 13030—13034 oraz „Effect of maleate on the content of CoA and its derivatives in rat kidney mitochondria”, vol. 256, 13034—13038.

Nagrodę im. Bolesława Skarżyńskiego za najlepszą pracę przeglądową opublikowaną w Postęпах Biochemii w 1981 roku przyznano dr Annie Krówczyńskiej z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN za pracę zatytułowaną „Charakterystyczne sekwencje nukleotydowe w heterogennym jądrowym DNA”.

ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

JANINA KWIATKOWSKA *)

Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy

Fructose-2,6-bisphosphate, a novel Effector of Glucose Metabolism

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Identyfikacja fruktozo-2,6-bisfosforanu w tkankach
- III. Mechanizm działania Fru-2,6-P₂
 - III-1. Wpływ na fosfofruktokinazę
 - III-2. Wpływ na fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanową
- IV. 2-kinaza fruktozo-6-fosforan : ATP i jej hormonalna regulacja
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Identification of fructose-2,6-bisphosphate in tissues
- III. Mechanism of action of Fru-2,6-P₂
 - III-1. Effect on phosphofructokinase
 - III-2. Effect on fructose-1,6-bisphosphatase
- IV. 2-kinase fructose-6-phosphate : ATP and its hormonal regulation
- V. Concluding remarks

I. Wstęp

Reakcja przejścia fruktozo-6-fosforanu w fruktozo-1,6-bisfosforan jest wąskim gardłem glikolizy, a fosfofruktokinaza, katalizująca to przejście — jednym z najważniejszych enzymów kontrolujących beztlenową przemianę glukozy. Także i fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanowa, katalizująca reakcję w odwrotnym kierunku: Fru-1,6-P₂ → Fru-6-P jest enzymem regulatorowym.

*) Prof. dr hab., Katedra Biochemii Akademii Medycznej we Wrocławiu, Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: AF — czynnik aktywujący fosfofruktokinazę, Fru-1,6-P₂ — fruktozo-1,6-bisfosforan, Fru-2,6-P₂ — fruktozo-2,6-bisfosforan, Fru-6-P — fruktozo-6-fosforan, FBPaza — fosfataza: fruktozo-1,6-bisfosforanowa, E.6.3.1.3.11), Glc-1,6-P₂ — glukoza-1,6-bisfosforan, P_i — ortofosforan, PFK — fosfofruktokinaza, (1-fosfotransferaza fruktozo-6-fosforan . ATP, E.C.2,7,1,11), PFK₂ — kinaza-2 (2-fosfotransferaza fruktozo-6-fosforan : ATP)

Fosfofruktokinaza (PFK) podlega skomplikowanej regulacji. Jak się wydaje, głównym czynnikiem decydującym o aktywności enzymu jest stężenie Fru-6-P i powinowactwo enzymu do tego substratu. Efektory allosteryczne działają drogą zwiększenia lub zmniejszenia tego powinowactwa. Fosfofruktokinaza jest aktywowana przez K^+ , NH_4^+ i P_i . Dodatnimi efektoraми allosterycznymi enzymu są AMP i Fru-1,6- P_2 , ujemnymi — ATP (w wątrobie — Mg-ATP) i cytrynian. Ujemna korelacja między aktywnością fosfofruktokinazy i fosfatazy Fru-1,6- P_2 (FBPazy) nie zachodzi, jak pierwotnie przypuszczano drogą bezpośredniej interakcji typu białko-białko, lecz wynika wtórnie z rozkładu przez FBPazę Fru-1,6- P_2 , aktywatora PFK. Fosfofruktokinaza jest tetramerem. W wielu tkankach tetramery agregują, tworząc agregaty o różnej ilości podjednostek i różnej aktywności. Agregacja ta jest zależna od stężenia ATP, Fru-6-P, AMP, Fru-1,6- P_2 i od pH, jest też więc także mechanizmem regulacji aktywności enzymu.

Tak *in vitro*, jak i *in vivo* obserwuje się fosforylację fosfofruktokinazy pod wpływem kinazy białkowej i cAMP. Zjawisko to zachodzi w mięśniach, wątrobie, nerkach i innych narządach (2,3,4). Zdania badaczy na temat wpływu fosforylacji i defosforylacji na aktywność enzymu są podzielone. Zdaniem niektórych ufosforylowana forma enzymu z wątroby jest wysoce aktywna i ulega inaktywacji po odszczepieniu reszt fosforanowych przez swoistą fosfatazę fosfofruktokinazy (3,5). Inni autorzy nie obserwowali zależności ani ilości ani aktywności enzymu (wątrobowego i mięśniowego) od fosforylacji (6,7). Obserwuje się natomiast związek między intensywnością fosforylacji mięśniowej PFK a stanem funkcjonalnym tkanki. I tak w czasie skurczu mięśnia wzrasta liczba ufosforylowanych miejsc w cząsteczce enzymu oraz stopień ich fosforylacji (8). Fosforylacja wątrobowej fosfofruktokinazy zmienia jej właściwości allosteryczne. Preparat enzymu udało się rozdzielić drogą chromatografii jonowymiennej na „frakcje ubogie” i „bogate w fosforan”. Aktywność tych ostatnich była hamowana przez ATP w znacznie silniejszym stopniu niż aktywność pierwszych (9).

W 1979 r. zwrócono uwagę na hormonalną regulację aktywności wątrobowej fosfofruktokinazy. Castaño i wsp. stwierdzili, że po dodaniu do mieszaniny inkubacyjnej 10^{-10} M glukagonu enzym wykazuje niższą aktywność i mniejsze powinowactwo do Fru-6-P niż kontrolny. Zjawisko to zachodziło przy niewysycających stężeniach substratu, nie obserwowano go natomiast przy stężeniach wysycających. Autorzy donoszą, że zmiany aktywności są na tyle trwałe, że dają się zaobserwować nie tylko w wyciągach komórkowych, ale także po oczyszczeniu enzymu na *Agarose-ATP* i po sączeniu w żelu *Sephadex G-150* (10).

W laboratorium U y e d a w Uniwersytecie w Dallas zbadano wpływ glukagonu na fosfofruktokinazę *in vivo*. Po podaniu szczyrom glukagonu wraz z ^{32}P , zwierzęta zabijano i oznaczano w homogenacie wątroby ak-

tywność fosfofruktokinazy. Rozdzielano także enzym na frakcje „bogate” i „ubogie w fosforan”. Wykazano, że podanie glukagonu nie zmieniało ani aktywności ani ilości enzymu w homogenacie, enzym stawał się jednak bardziej wrażliwy na hamowanie przez ATP. Zmiany zachodzące przypuszczalnie w centrum allosterycznym cząsteczki wiązano z jej wzmoczoną fosforylacją. Pod wpływem glukagonu wzrastała znacznie zawartość „frakcji bogatych w fosforan” (9). W 1980 r. Van Schaftingen i wsp. z Uniwersytetu w Louvain powtórzyli badania Castaño nad wpływem glukagonu na hepatocytarną fosfofruktokinazę. Potwierdzili oni obserwację o obniżeniu powinowactwa enzymu do substratu. Zauważyli także, że w hepatocytach inkubowanych z 20 mM glukozą wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie Fru-6-P i aktywność fosfofruktokinazy. W odróżnieniu od poprzedników autorzy stwierdzili jednak, że po sączeniu wyciągów komórek inkubowanych z glukagonem lub glukozą w żelu *Sephadex G-25*, lub po oczyszczeniu enzymu na *Agarose-ATP* fosfofruktokinaza nie różniła się ani aktywnością ani powinowactwem do substratu od kontroli. Co więcej, dodanie ultraprzeszczu lub zagotowanego wyciągu z kontrolnych komórek do wyciągu hepatocytów traktowanych glukagonem powoduje aktywację fosfofruktokinazy i wzrost jej powinowactwa do substratu. Autorzy wywnioskowali stąd, że czynnikiem bezpośrednio działającym na fosfofruktokinazę jest związek niskocząsteczkowy, usuwany przy sączeniu na sitach molekularnych. Ich zdaniem gromadzi się on przy inkubacji tkanek z glukozą, a glukagon bądź hamuje syntezę czynnika aktywującego, bądź zmniejsza zdolność fosfofruktokinazy do wiązania go. Hipotetyczny związek nazwano AF (*activation factor*) — „czynnik aktywujący” (11).

II. Identyfikacja fruktozo-2,6-bisfosforanu w tkankach

„Czynnik aktywujący” rozkłada się po kilku minutach w 0° wobec 0,3 M kwasu trójchlorooctowego, oraz pod wpływem fosfatazy zasadowej. Sugeruje to, że AF jest kwaso-labilnym estrem fosforanowym. Nie jest to jednak fruktozo-1,6-bisfosforan (11). „Czynnik aktywujący” wyekstrahowano z wątroby szczurzej, oddzielono od nukleotydów oraz glikogenu i wytracono jako sól barową. Drogą chromatografii jonowymiennej na żywicy *Dowex AG-1* otrzymano preparat wolny od Fru-6-P, Fru-1,6-P₂ i Glc-1,6-P₂. Autorzy postulowali, że „czynnik aktywujący” jest fruktozo-2,6-bisfosforanem. Przemawia za tym fakt, iż po hydrolizie kwaśnej z AF otrzymuje się fruktozo-6-fosforan. Z 1 g wątroby autorzy otrzymywali około 5 nmoli (od 2 do 20 nmoli) „czynnika aktywującego”. Obliczono, że w wątrobie perfundowanej 50 mM glukozą stężenie czynnika aktywującego fosfofruktokinazę wynosi średnio 5×10^{-6} M, obniża się zaś 10-krotnie pod wpływem glukagonu. Pół-maksymalną aktywację fosfofruktokinazy uzyskuje się przy stężeniach aktywatora rzędu 10^{-7} M, a więc w stężeniach fizjologicznych (12).

Fru-2,6-P₂ znaleziono w wielu tkankach zwierzęcych (13), między innymi w trzustce (14), a także w nasionach roślin (15) i w drożdżach (16).

W laboratorium Van Schaftingena przeprowadzono chemiczną syntezę Fru-2,6-P₂ z fruktozo-6-fosforanu i kwasu fosforowego. Aktywność biologiczną naturalnego i syntetycznego aktywatora mierzy się dodając go do oczyszczonej fosfofruktokinazy wątrobowej lub mięśniowej). Ilość aktywatora, która powoduje wzrost aktywności fosfofruktokinazy o jedną jednostkę międzynarodową przy hamujących stężeniach ATP (zazwyczaj stosuje się 1,25 mM ATP) przyjmuje się za jednostkę aktywności. Jednostką aktywności PFK jest ilość mikromoli Fru-1,6-P₂ utworzonego w ciągu 1 min w 25°C. Syntetyczny Fru-2,6-P₂ okazał się jednakowo aktywny jak naturalny otrzymany z wątroby (17). Ci sami autorzy opracowali następnie bardziej wydajną metodę syntezy. Jest to modyfikacja metody Pontis i Fisher (18); stosuje się w niej jako substrat wyjściowy Fru-1,6-P₂ zamiast Fru-6-P. Po inkubacji z dicykloheksylokarboimidem otrzymuje się cykliczny fosfodiester fruktozy, który następnie hydrolizuje się w środowisku zasadowym i oczyszcza na Dowex AG-1. Podobnie jak naturalny, syntetyczny Fru-2,6-P₂ jest β-anomerem, opornym na hydrolizę zasadową i podatnym na kwaśną (19, 20).

Równolegle z zespołami Van Schaftingena z Louvain i Uyeda z Dallas także i w zespole Pilkis z Uniwersytetu Vanderbilta z Nashville wykryto „czynnik aktywujący”. Znalaziono go w ogrzanym i przesączonym przez ultrasączki wyciągu wątroby. Autorzy stwierdzili, że w obecności AF sigmoidalna krzywa zależności aktywności oczyszczonej fosfofruktokinazy od stężenia substratu przekształca się w hyperboliczną. Znalezione przez nich czynnik nie był wrażliwy na trawienie przez proteazy, rozkładała go natomiast fosfataza alkaliczna. W odróżnieniu od Fru-1,6-P₂ czynnik aktywujący był termo- i kwaso-labilny (21). Czynnik aktywujący został oczyszczony za pomocą chromatografii na żelu DEAE-Sephadex, oraz hydrolizy zasadowej dla usunięcia Fru-6-P i pirofosforanu i hydrolizy kwaśnej zróżnicowanej — dla usunięcia Glc-1,6-P₂ i Fru-1,6-P₂. Także i grupa z Nashville zidentyfikowała „czynnik aktywujący” jako fruktozo-2,6-bisfosforan i otrzymała go syntetycznie za pomocą zmodyfikowanej metody Pontis i Fisher (22).

III. Mechanizm działania fruktozo-2,6-bisfosforanu

III-1. Wpływ na fosfofruktokinazę.

Otrzymanie naturalnego i syntetycznego Fru-2,6-P₂ w czystej postaci umożliwiło dokładne zbadanie jego wpływu na kinetyczne i allosteryczne właściwości fosfofruktokinazy. Charakter działania Fru-2,6-P₂ na fosfofruktokinazę wątrobową, mięśniową i trzustkową okazał się jednakowy, zarysowują się jednak pewne różnice ilościowe w stopniu wrażliwości

enzymów z różnych źródeł na jego działanie. Aktywujący wpływ Fru-2,6-P₂ unacznia się szczególnie silnie przy hamujących aktywność enzymu stężeniach ATP. W obecności 1,25 mM ATP i 1 mM Fru-6-P oczyszczona fosfofruktokinaza mięśniowa i wątrobowa jest całkowicie nieaktywna. Dodanie Fru-2,6-P₂ do mieszaniny reakcyjnej aktywuje enzym. K_{0,5} Fru-2,6-P₂ enzymu mięśniowego wynosi 5 milijednostek/ml, a K_{0,5} enzymu wątrobowego — 12 milijednostek/ml (odpowiednio 10 nM i 24 nM). Różnice ilościowe możemy wytłumaczyć różną podatnością obu enzymów na hamowanie przez ATP. Aktywność enzymu wątrobowego jest hamowana przy niższych stężeniach ATP i w większym stopniu niż mięśniowego, dlatego też zapewne PFK wątrobowa wymaga wyższego stężenia aktywatora. Aktywujące działanie Fru-2,6-P₂ przejawia się nie tylko w optymalnych warunkach, w jakich zazwyczaj dokonuje się pomiaru aktywności fosfofruktokinazy, ale także w fizjologicznych stężeniach substratów i metabolitów, co nie zawsze ma miejsce w przypadku innych znanych efektorów enzymu. Gdy oznaczenia prowadzi się w stężeniach metabolitów fizjologicznych dla danej tkanki, wartości K_{0,5} Fru-2,6-P₂ są wyższe niż podane powyżej dla optymalnych warunków i wynoszą odpowiednio: 200 nM dla enzymu trzustkowego, 600 nM dla mięśniowego i 2,5 μM dla wątrobowego. Są to jednak zawsze wartości mieszczące się w fizjologicznym zakresie stężenia aktywatora w tkankach (13, 23).

Fru-2,6-P₂ zmienia powinowactwo fosfofruktokinazy wobec fruktozo-6-fosforanu. W nieobecności aktywatora K_{0,5} enzymu wątrobowego dla Fru-6-P wynosi 6 mM. Wraz z dodawaniem wzrastających ilości Fru-2,6-P₂ wartość ta maleje stopniowo, stając się 10-krotnie niższa w obecności 35 mJ/ml (70 nM) „czynnika aktywującego”. Zmienia się także współczynnik Hilla (z 4,5 do 2,3 — 3,5), co świadczy o zmniejszonej kooperatywności podjednostek enzymu. Enzym mięśniowy charakteryzuje się K_{0,5} dla Fru-6-P wynoszącą 1,4 mM w nieobecności, i 0,3 mM w obecności 3,2 mJ/ml (6 nM) Fru-2,6-P₂, zaś współczynnik Hilla wynosi odpowiednio 3,1 i 2,3. Tak naturalny jak i syntetyczny Fru-2,6-P₂ chronią enzym wątrobowy, mięśniowy i trzustkowy przed hamowaniem przez ATP i cytrynian, działając synergicznie z AMP (13, 14).

Działanie Fru-2,6-P₂ ma szczególnie ważne znaczenie w wątrobie. W stężeniach metabolitów, jakie występują w tym narządzie (3 mM ATP, 10-25 μM Fru-1,6-P₂ i 1 mM AMP), „czynnik aktywujący”, współdziałając z AMP może obniżyć K_{0,5} fosfofruktokinazy dla Fru-6-P do wartości 10-100 μM, co odpowiada fizjologicznemu stężeniu tego substratu w hepatocytach (24, 25, 26). Uzyskane informacje pozwalają zrozumieć, jak zachodzi regulacja glikolizy w wątrobie. Przy małej fluktuacji stężeń substratów i efektorów enzymów regulatorowych glikolizy w tym narządzie nie udawało się wyjaśnić mechanizmu tej regulacji przez prostą analo-

gię z innymi tkankami. Obecnie można przypuszczać, że najważniejszym aktywatorem fosfofruktokinazy w wątrobie jest Fru-2,6-P₂. Przemawiają za tym następujące fakty: a) Stężenie Fru-2,6-P₂ wzrasta gwałtownie po podaniu glukozy i maleje pod wpływem glukagonu, b) powinowactwo PFK wobec Fru-2,6-P₂ jest co najmniej 10-krotnie wyższe niż wobec Fru-1,6-P₂, któremu dotychczas przypisywano decydującą rolę w aktywacji wątrobowego enzymu ($K_{0,5}$ dla Fru-2,6-P₂ = 2,5 μM, a $K_{0,5}$ dla Fru-1,6-P₂ = 28 μM (26), c) Fru-2,6-P₂ działa synergicznie z AMP i P_n, chroniąc fosfofruktokinazę przed ATP i cytrynianem, których fizjologiczne stężenie w wątrobie jest bardzo wysokie, d) Fru-2,6-P₂ obniża $K_{0,5}$ enzymu dla Fru-6-P do wartości odpowiadających jego zawartości w hepatocytach (13).

Po odkryciu Fru-2,6-P₂ zrewidowano poglądy na mechanizm zmian właściwości wątrobowej fosfofruktokinazy związanych z fosforylacją i defosforylacją cząsteczki enzymu. Jak już wspomniano, aktywność „frakcji o małej zawartości fosforanu” jest znacznie słabiej hamowana przez ATP niż aktywność frakcji o dużej jego zawartości. Intensywność fosforylacji enzymu wzrasta jak wiadomo pod wpływem glukagonu. Wydaje się, że fosforylacja nie wpływa bezpośrednio na wrażliwość fosfofruktokinazy na ATP, ale zmienia jej powinowactwo wobec Fru-2,6-P₂, co z kolei odbija się na właściwościach allosterycznych enzymu. Gdy „frakcję ubogą w fosforan”, mało wrażliwą na ATP uwolniono od Fru-2,6-P₂, stała się ona równie podatna na hamowanie jak „frakcja bogata w fosforan”. Forma o małej zawartości fosforanu, izolowana z wyciągu wątroby zawiera 0,13 μM Fru-2,6-P₂ na jednostkę aktywności PFK, podczas gdy „forma bogata w fosforan” nie zawiera w ogóle aktywatora. „Frakcja o niskiej zawartości fosforanu” wykazuje wysokie powinowactwo do Fru-2,6-P₂, krzywa wysycenia jest sigmoidalna i obserwuje się kooperatywne oddziaływanie podjednostek enzymu (28).

Zgodnie z wynikami badań Söling i wsp., ufosforylowana forma wątrobowej PFK jest wysoce aktywna i ulega inaktywacji pod wpływem fosfatazy. Jak wynika z ostatniej pracy tych autorów, proces inaktywacji jest hamowany przez Fru-2,6-P₂, przy czym związek ten jest 500-1000-krotnie bardziej aktywny pod tym względem niż Fru-1,6-P₂. Autorzy zaobserwowali też, że Fru-2,6-P₂ chroni enzym przed spontaniczną inaktywacją w pH 6,5 oraz przed hamującym działaniem ATP i cytrynianu (29).

Fruktozo-2,6-bisfosforan jest też regulatorem innego enzymu tworzącego Fru-1,6-P₂, a mianowicie 1-fosfotransferazy Fru-6-P: pirofosforan (E.C.2.7.1.90), występującej w roślinach. W obecności 1 μM syntetycznego efektora enzym otrzymany z ziaren *Phaseolus aureus* jest silnie aktywowany, K_m wobec substratu ulega 67-krotnemu obniżeniu, a V_{max} wzrasta 15 razy. W wyciągu nasion *Phaseolus* znaleziono też naturalny Fru-2,6-P₂ (15).

II-2. Wpływ na fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanową

Okazało się, że Fru-2,6-P₂ jest nie tylko efekтором fosfofruktokinazy ale także fosfatazy fruktozo-1,6-bisfosforanowej (FBPazy), a mianowicie hamuje on ten ostatni enzym (16, 30, 31, 32). Fru-2,6-P₂ reguluje zatem w obu kierunkach przejście: Fru-6-P ⇌ Fru-1,6-P₂.

Hamujące działanie efektora na FBPazę zależy od pH i od stężenia substratu. Najsilniejsze hamowanie zachodzi przy pH 7,5, bardzo słabe — przy pH powyżej 9,0. Hamowania nie obserwuje się w obecności wysycających stężeń Fru-1,6-P₂ (70—150 μM), natomiast w półwysycających (2,5—5 μM), które są zarazem bliskie fizjologicznym wartościom, inhibicja jest wyraźna, a jej stopień — wprost proporcjonalny do stężenia efektora. Jest to hamowanie typu kompetycyjnego. Wartość K_i Fru-2,6-P₂ wynosi 0,5 μM. Udowodniono też, że Fru-2,6-P₂ nie jest substratem FBPazy.

Fru-2,6-P₂ działa synergicznie z innym allosterycznym inhibitorem FBPazy, jakim jest AMP. W nieobecności Fru-2,6-P₂ wartość S_{0,5} dla AMP wynosi 40 μM. W obecności 0,1 μM, 0,2 μM i 1,0 μM Fru-2,6-P₂ maleje ona odpowiednio do 14 μM, 10 μM i 6 μM. W nieobecności drugiego efektora K_i dla AMP wynosi 200 μM, a w jego obecności — tylko 18 μM. Obecność Fru-2,6-P₂ zmienia też sigmoidalny przebieg krzywej zależności FBPazy od stężenia Mg²⁺.

Przeprowadzając acetylację reszt tyrozynowych, znajdujących się tak w centrum katalitycznym jak i allosterycznym FBPazy można spowodować jej inaktywację oraz zniesienie hamującego efektu AMP na enzym. Fru-1,6-P₂ jako substrat chroni centrum aktywne i zapobiega inaktywacji enzymu przez acetylację, ale nie wpływa na utratę wrażliwości na AMP. Z kolei AMP zapobiega utracie właściwości allosterycznych FBPazy, ale nie zapobiega jej inaktywacji przez acetylację. Fru-2,6-P₂ chroni enzym zarówno przed utratą aktywności, jak i przed odczuleniem na AMP. Wypływa stąd wniosek, że efektor ten wiąże się tak w katalitycznym jak i allosterycznym centrum FBPazy, modyfikując oddziaływanie z substratem i z inhibitorem (32).

FBPaza drożdżowa podlega bardzo specjalnej regulacji. Oprócz efektu allosterycznego enzym ten podlega regulacji przez proteolizę. Ten drugi mechanizm uczynnia się po podaniu glukozy. W czasie pierwszej minuty po podaniu glukozy, podczas fazy szybkiej inaktywacji aktywność enzymu spada do 60% wyjściowej wartości. Tłumaczy się to modyfikacją cząsteczki w wyniku której staje się ona podatna na trawienie. Podczas trwającej około godziny fazy powolnej inaktywacji następuje pełna utrata aktywności enzymu. Stwierdzono, że w pierwszej minucie po podaniu glukozy w komórkach wątroby gromadzą się Fru-6-P, i Fru-1,6-P₂ w stężeniach milimolarnych oraz Fru-2,6-P₂ w stężeniach mikromolarnych. Tak niskie stężenia Fru-2,6-P₂ są jednak w pełni wystarczające, gdyż całkowita inaktywacja drożdżowej FBPazy ma miejsce przy 3 μM stężeniu efektora.

Wyrażono pogląd, że Fru-2,6-P₂ może być sygnałem dla uczulenia enzymu na proteolizę. Przemawia za tym spostrzeżenie, że inaktywacja proteolityczna FBPazy nie zachodzi w komórkach mutantów, nie zawierających izomerazy fosfoheksosowej, a więc niezdolnych do syntezy biologicznego prekursora Fru-2,6-P₂, czyli Fru-6-P (33).

IV. Fruktozo-6-fosfo,2-kinaza i jej hormonalna regulacja

Jak powstaje fruktozo-2,6-bisfosforan w komórkach? Okazuje się, że istnieje osobny enzym, 2-fosfotransferaza Fru-6-P : ATP, nazwany przez odkrywców fruktozo-6-fosfo,2-kinazą, kinazą-2, lub PFK₂ (33, 34, 35). Produkt reakcji, powstający po inkubacji Fru-6-P, ATP i Mg²⁺ z enzymem zidentyfikowano chromatograficznie jako Fru-2,6-P₂. Aktywność kinazy-2 oznacza się zazwyczaj biologicznie, mierząc zdolność aktywowania oczyszczonej fosfofruktokinazy. Za jednostkę aktywności kinazy-2 przyjmuje się taką ilość enzymu, która daje przyrost aktywności fosfofruktokinazy o jedną jednostkę międzynarodową (patrz rozdział II). Aktywność kinazy-2 w wątrobie szczura wynosi 1—10 j/g tkanki (około 0,44 mj/mg białka).

W zespole Uyeda oczyszczono kinazę-2 z homogenatu wątroby szczura drogą frakcjonowanego wytrącania glikolem polietylenowym i chromatografii jonowymiennej na DEAE-celulozie. Uzyskano enzym oczyszczony 34-krotnie, w 99,9% wolny od fosfofruktokinazy (34).

W laboratorium Van Schaftingena zastosowano wytrącanie za pomocą kwasu mlekowego przed chromatografią i uzyskano enzym oczyszczony 50-krotnie, wolny od PFK, fosfoheksizoizomerazy i miokinazy. K_i enzymu dla Fru-6-P i ATP mieszczą się w granicach 0,4—0,5 mM. AMP i P_n w fizjologicznych stężeniach aktywują PFK₂, a PEP i cytrynian — hamują ją. W obecności fosforanu K_m względem Fru-6-P oraz ATP ulegają obniżeniu, zaś wartość V_{max} nie zmienia się. W surowym wyciągu hepatocytów kinaza-2 katalizuje syntezę Fru-2,6-P₂ z wydajnością 20 nmoli/min/g tkanki, a po uprzednim potraktowaniu glukagonem — 5 nmoli/min/g (35). Enzym otrzymano także w laboratorium Pilkisów, stosując wytrącanie siarczanem amonu w zakresie 0,45—0,65 nasycenia, chromatografię na DEAE-celulozie i sączenie w żelu *Sephadex* G-100. Uzyskano białko 30-krotnie oczyszczone, o ciężarze cząsteczkowym 85—90 000 (36).

Aktywność kinazy-2 jest regulowana hormonalnie. Zarówno w izolowanych hepatocytach, jak i w homogenatach wątroby aktywność PFK₂ spadała do połowy w obecności 3×10⁻¹³ M glukagonu, a do 13% — przy jego stężeniu równym 10⁻⁷ M. Efekt ten utrzymuje się po sączeniu homogenatu w żelu *Sephadex*, można więc przypuszczać, że ma on związek z kowalencyjną modyfikacją cząsteczki enzymu. Dla zbadania tej hipotezy Van Schaftingen i wsp. zbadali wpływ cAMP i kinazy białkowej na

aktywność kinazy-2 w wyciągach wątroby oraz na oczyszczonej kinazę-2. Wyniki uzyskane przez nich były identyczne z obserwowanymi po podaniu glukagonu. I tu i tam zachodziła inaktywacja enzymu z obniżeniem szybkości maksymalnej reakcji i wzrostem wartości K_m względem substratu, a także zmniejszenie aktywacji enzymu przez P_i , oraz wzmoczenie hamującego wpływu PEP i cytrynianu. Pod wpływem kinazy białkowej i cAMP zmienia się przebieg krzywej zależności aktywności PFK₂ od pH (37).

Także i adrenalina (w stężeniu 10^{-5} M) powoduje obniżenie aktywności kinazy-2 i stężenia Fru-2,6-P₂ w komórce do połowy. Czy jednak działanie glukagonu i adrenaliny można tłumaczyć jedynie wzmoczeniem syntezy cAMP? Otóż po dokładniejszej analizie wydaje się to wątpliwe. Dwukrotny spadek aktywności PFK₂ zachodzi już w obecności 10^{-13} M glukagonu, podczas gdy znaczący wzrost syntezy cAMP na miejsce przy znacznie wyższych stężeniach hormonu ($S_{0,5} = 3 \times 10^{-9}$ M). W obecności 10^{-11} M glukagonu ilość cAMP wzrasta z 0,7 μ M do zaledwie 1,1 μ M. Oczywiście nie można wykluczyć, że kinaza-2 jest wrażliwa na tak znikome różnice stężeń, ale jest to mało prawdopodobne. Także adrenalina hamuje aktywność kinazy-2 w niskich stężeniach, nie wystarczających dla stymulacji syntezy cAMP. Jednocześnie wiadomo, że w tych niskich stężeniach adrenalina wpływa na metabolizm poprzez mechanizmy niezależne od cAMP, lecz zależne od wapnia. Wnioskuje się przeto, że hormonalna regulacja zawartości Fru-2,6-P₂ w komórkach jest procesem złożonym i składają się nań oddziaływania zależne i niezależne od cAMP. Regulowana jest głównie synteza czynnika, a nie — jak wykazano — jego rozkład (38).

Na aktywność kinazy-2 i zawartość Fru-2,6-P₂ w tkankach wpływa przypuszczalnie i insulina. W cukrzycy stężenie Fru-2,6-P₂ w tkankach jest o 60% niższe niż w normie, a aktywność kinazy-2 — niższa o 70%. Trudno jest jednak powiedzieć, czy chodzi tu o bezpośredni wpływ insuliny, czy też jest to wynik hypoglikemii. Podobny spadek aktywności PFK₂ zachodzi u głodujących zwierząt (39).

Synteza Fru-2,6-P₂ w hepatocytach jest wyraźnie stymulowana przez wazopresynę (10^{-8} M) i fenylefrynę (10^{-5} M). Wpływ tej ostatniej potęguje propranolol (10^{-5} M) oraz inne beta-blokery. Zachodziło pytanie, czy mechanizm ten należy wiązać z bezpośrednim wpływem na kinazę-2, czy też jest on wynikiem wzmoczonej glikogenolizy i glikolizy, na skutek czego gromadzi się Fru-6-P, substrat dla syntezy Fru-2,6-P₂. Wątpliwości te rozstrzygnięto porównując wpływ wyżej wymienionych ciał czynnych na syntezę Fru-2,6-P₂ u szczurów obficie karmionych i głodzonych. Otóż u tych ostatnich, pozbawionych jak wiadomo zapasów glikogenu w wątrobie, nie obserwuje się wpływu wazopresyny ani fenylefryny na produkcję Fru-2,6-P₂. Wpływ ten nie był widoczny także u szczurów z genetycznym niedoborem kinazy fosforylasy glikogenu, oraz w hepatocytach, z których usunięto wapń — niezbędny aktywator wymienionego enzymu. U zwie-

rząt obficie karmionych po podaniu wazopresyny wzrost ilości Fru-2,6-P₂ był wprost proporcjonalny do przyrostu Fru-6-P. Stwierdzono jednak, że o ile akumulacja Fru-6-P zachodzi już po 1 min po podaniu wazopresyny, to nagromadzenie Fru-2,6-P₂ obserwuje się dopiero po 10 min. Można z tego wnioskować, że działanie wazopresyny i fenylefryny na syntezę Fru-2,6-P₂ jest pośrednie, zachodzi przez wzrost stężenia substratu. Pomiedzy tym substratem a Fru-2,6-P₂ istnieje jednak regulowane przejście, na co wskazuje wspomniana różnica w czasie nagromadzania obu związków (40).

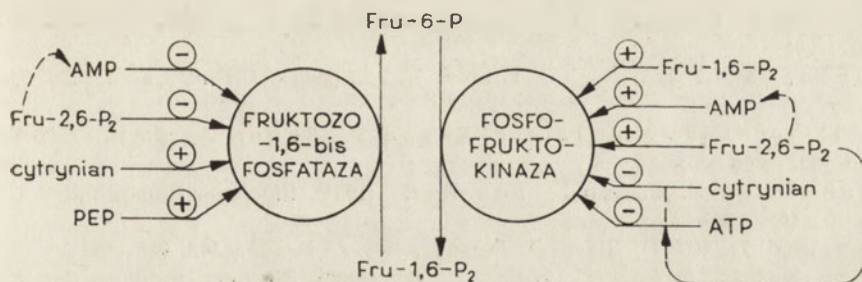
Działanie glukagonu i glukozy wydaje się niezależne od regulacji produkcji Fru-6-P, gdyż jest obserwowane także u szczurów głodzonych oraz u mutantów pozbawionych kinazy fosforylazy. Po podaniu hepatocytom glukagonu lub cAMP stężenie Fru-6-P wzrasta, a mimo to ilość produkowanego Fru-2,6-P₂ spada drastycznie. Potwierdza to przypuszczenie o bezpośrednim wpływie glukagonu, cAMP i glukozy na aktywność kinazy-2 (38).

V. Uwagi końcowe

Do niedawna wydawało się, że regulacja aktywności kluczowych enzymów glikolizy i glukoneogenezy jest dokładnie poznana. Dobrze rozumiały był mechanizm regulacji allosterycznej fosfofruktokinazy w mięśniach. Pewne wątpliwości istniały co do wątrobowego enzymu ze względu na występujące w tym narządzie stężenia metabolitów i małą ich fluktuację. I oto okazało się, że fosfofruktokinaza oraz fosfataza fruktozo-1,6-bisfosforanowa są w tkankach regulowane przez nieznaną dotychczas efektor — fruktozo-2,6-bisfosforan. Powstaje on pod wpływem odrębnej kinazy, nazwanej kinazą-2 lub PFK₂, z fruktozo-6-fosforanu. Metabolit ten jest zarazem substratem fosfofruktokinazy i produktem — FBPazy. Kinaza-2 podlega regulacji hormonalnej i alimentarnej, jest ona wrażliwa na glukagon, adrenalinę, cAMP i glukozę. Wazopresyna i beta-blokery działają na syntezę Fru-2,6-P₂ pośrednio, przyczyniając się do zwiększenia stężenia Fru-6-P w komórce. Nie wyjaśniono, czy hamujące działanie insuliny na kinazę-2 nosi charakter bezpośredni czy pośredni.

Fru-2,6-P₂ jest najaktywniejszym z dotychczas poznanych efektorów fosfofruktokinazy, zwłaszcza wątrobowej. Zmienia on powinowactwo tego enzymu wobec substratu, chroni go przed działaniem inhibitorów allosterycznych, takich jak cytryniany i ATP, wzmacnia też działanie aktywatorów. Co więcej, działanie Fru-2,6-P₂ w wątrobie przejawia się szczególnie silnie w fizjologicznych dla tego narządu stężeniach Fru-6-P, Fru-1,6-P₂, ATP i AMP. W odróżnieniu od innych metabolitów, stężenie Fru-2,6-P₂ w wątrobie zmienia się znacznie pod wpływem glukozy i hormonów.

Fru-2,6-P₂ jest kompetycyjnym inhibitorem fosfatazy fruktozo-1,6-



Ryc. 1. Wpływ fruktozo-2,6-bisfosforanu na fosfofruktokinazę i fosfatazę fruktozo-1,6-bisfosforanową.

⊕, ⊖ — działanie efektorów allosterycznych; ----- — działanie synergiczne

bisfosforanowej, a zarazem jej allosterycznym inhibitorem. Działa on synergicznie z innym ujemnym efektem enzymu — AMP.

Ryc. 1 przedstawia wpływ Fru-2,6-P₂ na fosfofruktokinazę i FBPazę.

Fru-2,6-P₂ wykryto w większości tkanek zwierzęcych (za wyjątkiem erytrocytów), a także w drożdżach i roślinach. Stężenie tego efektora, wzrastające po inkubacji tkanek z glukozą mieści się w zakresie, w jakim wywiera on swe regulatorowe działanie na fosfofruktokinazę i FBPazę. Można zatem przypuszczać, że regulacja glikolizy i glukoneogenezy z udziałem Fru-2,6-P₂ jest zjawiskiem powszechnie występującym w przyrodzie.

Zaakceptowano do druku 28.04.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Söling H. D., Bernhard G., Kuhn A., Lück H. J., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 563—572
2. Hofer H. W., Fürst M., (1976), *FEBS Lett.*, **62**, 118—122
3. Brand I. A., Söling H. D., (1975), *FEBS Lett.*, **57**, 163—168.
4. Mendicino J., Leibach F., Reddy S., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4662—4669
5. Richards C. S., Uyeda K., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 1535—1540
6. Hussey C. R., Liddle P. F., Ardron D., Kelett G. L., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **80**, 497—506
7. Uyeda K., Miyatake A., Luby L. J., Richards E. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8319—8327
8. Hofer H. W., Sørensen-Ziganke B., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 199—203.
9. Kagimoto T., Uyeda K., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5584—5187
10. Castaño J. G., Nieto A., Feliu J. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5576—5579
11. Van Schaftingen E., Hue L., Hers H. G., (1980), *Biochem. J.*, **192**, 887—895

12. Van Schaftingen E., Hue L., Hers H. G., (1980), *Biochem. J.* **192**, 897—901
13. Uyeda K., Furuya E., Luby L. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8394—8399
14. Malaisse W. J., Malaisse-Lagae F., Sener A., (1981), *FEBS Lett.*, **135**, 203—206
15. Sabularse D. C., Anderson R. L., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 848—855
16. Avigad D., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 985—991
17. Van Schaftingen E., Hers H. G., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1524—1531
18. Pontis H. G., Fisher C. L., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 452—459
19. Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 319—323
20. Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **117**, 325—327
21. Claus T. H., Schlumpf J., Pilkis J., Johnson R. A., Pilkis S. J., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 359—366
22. Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Pilkis J., Claus T. H., Cumming D. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3171—3174
23. Malaisse W. J., Malaisse-Lagae F., Sener A., Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 217—219
24. Guynn R. W., Veloso D., Veech R. L., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7325—7331
25. Reinhardt G. D., Lardy H. A., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1477—1484
26. Veech R. L., Raijman L., Dalziel K., Krebs H. A., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 837—842.
27. Hill D. E., Hames G. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 203—213
28. Furuya E., Uyeda K., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 11656—11659
29. Söling H. D., Kuduz J., Brand I. A., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 309—313
30. Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2861—2863
31. Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Pilkis J., Claus T., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 3619—3622
32. Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Mc Grane M. M., Pilkis J., Claus T. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11489—11495
33. Lederer B., Vissers S., Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1281—1287
34. Furuya E., Uyeda K., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7109—7112
35. Van Schaftingen E., Hers H. G., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1078—1084
36. El-Maghrabi M. R., Claus T. H., Pilkis J., Pilkis S. J., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1071—1077
37. Van Schaftingen E., Davies D. R., Hers H. G., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 362—369
38. Richards C. S., Furuya E., Uyeda K., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 1673—1679
39. Kuwijama M., Uyeda K., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 84—88
40. Hue L., Blackmore P. F., Exton J. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8900—8903

GRAŻYNA ADLER *)

Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cyklazy adenylowej

The Function of Nucleotide binding Protein in hormonal Regulation of Adenylate Cyclase

Spis treści

- I. Udział nukleotydów guanylowych w stymulacji hormonalnej
- II. Wieloskładnikowa budowa układu cyklazy adenylowej
 - II-1 Analiza układów docelowych
 - II-2 Rozdzielenie poszczególnych składników układu
- III. Rekonstrukcja układu cyklazy adenylowej
- IV. Obniżenie wrażliwości na hormon
 - V. Model działania hormonów
- VI. Hormonalne hamowanie cyklazy adenylowej

Contents

- I. Participation of guanyl nucleotides in hormonal stimulation
- II. Multiunit structure of adenylate cyclase
 - II-1 Target analysis
 - II-2 Separation of the component of multiunit structure
- III. Reconstruction of the adenylate cyclase system
- IV. Mechanism of hormone desensitisation
 - V. Model of hormone action
- VI. Hormonal inhibition of adenylate cyclase

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

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — adenozyntrójfosforan, cAMP — cykliczny 3' : 5' — adenozyntromonofosforan, GTP — guanozyntrójfosforan, GDP — guanozyndwufosforan, GppNHp — guanozyntro 5' — (β , γ — imido) trójfosforan, GTP γ S — guanozyntro 5' — (γ -tio) trójfosforan, R — receptor, N — regulatorowe białko wiążące nukleotydy guanylowe (białko N), C — cyklaza adenylowa, H — hormon, H-R — kompleks hormon-receptor, H-R-N — kompleks hormon-receptor-białko N, R-N — kompleks receptor-białko N, R-N-C — kompleks receptor-białko N-cyklaza adenylowa, N-C — kompleks białko N-cyklaza adenylowa

Cyklaza adenylowa (pirofosfo-liaza ATP/cyklizująca) (EC4.6.1.1) jest częścią złożonego systemu przekazującego komórce docelowej informacji niesione przez wiele hormonów. Koncepcja struktury tego systemu jest obecnie zmodyfikowana w porównaniu z pierwotną koncepcją budowy cyklazy adenylowej zaproponowaną przez Sutherlanda (1) i przedstawioną w Postęпах Biochemii (2, 3).

Umieszczony w warstwie lipidów błony komórkowej układ enzymatyczny składa się z co najmniej trzech składników: receptora hormonu (R), składnika regulatorowego — białka wiążącego nukleotydy guanylowe określanego jako G, N lub G/F oraz właściwego enzymu, cyklazy adenylowej, określanego też jako jednostka katalityczna C. Wysunięto ponadto koncepcje według których w układzie jako niezależny składnik występuje jednostka wiążąca jony F^- (4) lub białko o aktywności proteazy (5, 6), sugeruje się też, że w układzie są dwa miejsca wiążące nukleotydy guanylowe N_1 i N_2 (7, 8, 9). Wszystkie koncepcje zakładają, że poszczególne składniki układu mają zdolność do przesuwania się wzdłuż błony komórkowej, a hormonalnie wywołana pełna aktywacja układu wymaga ich współdziałania.

I. Udział nukleotydów guanylowych w stymulacji hormonalnej

Wpływ nukleotydów guanylowych na przebieg hormonalnej regulacji cyklazy adenylowej w błonach komórek wątroby po raz pierwszy wykrył Rodbell i wsp. (10). Następnie stwierdzono, że w układach pochodzących z komórek różnych typów GTP jest stymulatorem aktywności podstawowej cyklazy adenylowej lub aktywności stymulowanej hormonalnie, podczas gdy GDP nie wpływa na intensywność reakcji (11, 12, 13, 14). Wyniki wcześniejszych prac, w których również stwierdzano aktywność stymulatorową GDP, były prawdopodobnie skutkiem działania powstającego w mieszaninie reakcyjnej GTP w efekcie przeniesienia końcowej grupy fosforanowej z ATP na GDP. Kimura i Nagata (14) wykazali bowiem, że jeżeli w doświadczeniach używa się zamiast ATP pochodną adenozyne 5'—(β,γ -imido)trójfosforanu, który nie jest hydrolizowany, GDP nie stymuluje cyklazy z błon komórek wątroby. Autorzy ci wykazali też, że GTP jest wręcz niezbędne do stymulacji cyklazy adenylowej przez glukagon (15) i jeżeli *in vitro* przeprowadza się reakcję z użyciem ATP specjalnie pozbawionego śladowych ilości GTP występujących zawsze w preparatach handlowych, reakcja w ogóle nie zachodzi. Podobnie izoproterenol w nieobecności GTP nie stymuluje cyklazy w błonach limfocytów (13). Spośród innych pochodnych nukleotydów guanylowych bardzo silnymi aktywatorami cyklazy adenylowej z różnych tkanek okazały się pochodne GTP niewrażliwe na hydrolizę enzymatyczną, takie jak GppNHp (guanozyne 5'—(β,γ -imido) trójfosforan) i GTP γ S (guanozyne 5'—(γ -tio) trójfos-

foran). W niektórych układach, na przykład w błonach komórek limfocytów (4) stymulacja przez te nukleotydy wywołuje aktywność cyklazy wyższą niż stymulacja hormonalna, w innych natomiast stymulacja ta prawie równa się stymulacji hormonalnej (16). Znacznie słabszy wpływ na aktywność cyklazy adenylowej mają nukleotydy pochodne od innych niż guanina zasad (4). Spostrzeżenia te mocno zachwiały model mechanizmu przenoszenia informacji hormonalnej do komórki poprzez bezpośrednie oddziaływanie: pobudzony hormonalnie receptor — stymulacja cyklazy adenylowej. Zwróciły one uwagę na przekształcenia nukleotydów guanylowych podczas przekazywania tej informacji. Sugerowały, że hydroliza GTP do GDP mogłaby kończyć proces hormonalnej stymulacji układu.

Hydrolizę GTP do GDP podczas przekazywania informacji hormonalnej wykazały doświadczenia Cassela i Selinger'a (17). Błony erytrocytów indyckich inkubowali oni z izoproterenolem i ^3H -GTP. Po usunięciu niezwiązanego ^3H -GTP dodawali następną porcję izoproterenolu. Stwierdzili uwalnianie się radioaktywności z błon i wykazali, że radioaktywność związana jest z GDP, co wskazywało, że w efekcie stymulacji hormonalnej następuje hydroliza GTP z uwolnieniem GDP. Jeżeli w tym samym układzie doświadczalnym oprócz hormonu dodali GppNHp, to jednocześnie z uwalnianiem znakowanego GDP obserwowali stymulację cyklazy adenylowej. Wnioskowali, że w nieaktywnym układzie GDP związane jest z cyklazą adenylową, pod wpływem hormonu następuje uwolnienie GDP a na jego miejsce wchodzi GppNHp wywołując aktywację cyklazy. W układach *in vitro* proces uwalniania GDP z kompleksu można odtworzyć w nieobecności hormonu dodając do układu inne nukleotydy guanylowe w stosunkowo wysokich stężeniach. Ta zdolność wymiany nukleotydów nie jest jednakowa we wszystkich komórkach. Dlatego też jedne układy są stymulowane przez GTP w nieobecności hormonu, w innych stymulator ten nie działa, a układ stymulowany jest dopiero przez GppNHp. Przykładem, wyjątkowo silnie związanego z układem GDP są błony erytrocytów indyka (17, 18). W doświadczeniach *in vitro* z izolowanymi błonami i aktywowaniem cyklazy w komórkach limfocytów obserwuje się charakterystyczne opóźnienie odpowiedzi komórki na GppNHp i stymulator hormonalny. Opóźnienie to wynika z czasu potrzebnego na uwolnienie GDP (4). Według Swillensa i wsp. (19) szybkość uwalniania GDP z układu przekaźników informacji hormonalnej zarówno *in vivo* jak i *in vitro* jest szybkością ograniczającą cykl przemian. Jednak kinetyczne obliczenia Birnbauma i wsp. (20) przeczą tej koncepcji.

Omówione dwa procesy, to jest hydroliza związanego z układem GTP do GDP i jego uwolnienie pod wpływem hormonu z pozostawieniem miejsca na związanie GTP, lub *in vitro* jego analogów, dającym w wyniku aktywację cyklazy adenylowej są podstawą obecnej koncepcji mechanizmu działania hormonów. Następną, szybką hydroliza GTP kończy proces stymulacji i ta reakcja została nazwana „turn off”. Cassel (21) zbadał

szybkość reakcji „turn off” wykluczając niespecyficzną hydrolizę GTP i stwierdził, że jest ona podobna w błonach erytrocytów indyka, przytarczyc szczura i wątroby szczura. Sugeruje to, że opisany mechanizm przezywania aktywacji cyklazy adenyłowej jest powszechny. Za przekształceniami nukleotydów w błonach przemawiają także dane o stymulowanej hormonalnie aktywności GTP-azy w błonach erytrocytów indyka (22, 23), żaby (24) i błonach komórek wątroby (25) oraz mechanizm stymulacji cyklazy adenyłowej przez toksynę cholery. Toksynę tę mogą wiązać przez prawie wszystkie komórki, ponieważ jej receptorem jest powszechnie występujący gangliozyd GM₁ (26). Tak więc toksyna cholery w odróżnieniu od hormonów aktywuje cyklazę adenyłową w komórkach każdego typu i to w sposób niemal ciągły. Stwierdzono, że mechanizm stymulacji cyklazy adenyłowej przez toksynę cholery jest inny niż mechanizm stymulacji hormonalnej i polega na rybozylacji białka regulatorowego o aktywności GTP-azy w obecności NAD⁺, w wyniku czego zostaje zahamowana ta aktywność (22, 26, 27). Wyłączona zostaje więc reakcja „turn off” i układ jest permanentnie aktywny podobnie jak w obecności analogów GTP-GppNHp lub GTP-γ-S w doświadczeniach *in vitro*.

Badając wpływ nukleotydów guanyłowych na inne procesy błonowe zachodzące po przyłączeniu hormonu stwierdzono, że GTP w stężeniu dającym maksymalną aktywację cyklazy adenyłowej w obecności izoprote-renolu (agonista β-adrenergiczny) w limfocytach obniża powinowactwo tego agonisty do receptora. Nie obniża natomiast powinowactwa antagonistów β-adrenergicznych (4, 13). Podobnie w błonach komórek wątrobowych można wyróżnić funkcjonalnie dwa typy oddziaływań nukleotydów guanyłowych: inny podczas wiązania glukagonu, inny zaś podczas stymulacji cyklazy adenyłowej. Cyklazę adenyłową stymulują zarówno GTP jak i GppNHp, podczas gdy na obniżenie powinowactwa receptora do glukagonu znacznie silniejszy wpływ ma GTP. Działanie GppNHp ujawnia się dopiero w stężeniu dziesięciokrotnie wyższym niż wymagane do stymulacji. Stymulacja cyklazy adenyłowej przez GppNHp pozostaje również po odpłukaniu niezwiązanego nukleotydu lub po hydrolizie układu fosfolipazą C, równocześnie usuwa się wpływ nukleotydu na wiązanie glukagonu (7). Na podstawie tej odmienności oddziaływań autorzy wysuwają przypuszczenie, że miejsca wiążące nukleotydy zróżnicowane są nie tylko funkcjonalnie ale być może też i przestrzennie.

II. Wieloskładnikowa budowa układu cyklazy adenyłowej

Informacje o udziale nukleotydów guanyłowych w stymulacji hormonalnej zwróciły też uwagę na przestrzenne rozmieszczenie zachodzących w błonie procesów. Przytoczono szereg danych wskazujących na wielo-

składnikową budowę układu cyklazy adenyłowej, oraz na szybkie i przejściowe odpowiednie łączenie się elementów składowych w pobudzonej komórce.

II-1. Analiza układów docelowych

Szczególnie istotne dane przynoszą badania nienaruszonych struktur błonowych. Ze względu na różnicę w składzie lipidowym, aktywność enzymów zewnętrznej części błony komórkowej wykazuje inną zależność od temperatury niż enzymów wewnętrznej części błony komórkowej. Krzywe przedstawiające zależność aktywności enzymatycznej od temperatury enzymów zewnątrz- lub wewnątrzbłonowych są prostoliniowe. Zależne od temperatury zmiany aktywności podstawowej cyklazy adenyłowej, stymulowanej F^- lub stymulowanej przez GppNHp w błonach komórek wątroby szczura można przedstawić właśnie w formie prostoliniowej. Natomiast zależność aktywności cyklazy adenyłowej stymulowanej przez glukagon wykazuje zakrzywienie linii, co świadczy o tym, że obserwowana aktywność układu jest wynikiem współdziałania niezależnych składników rozmieszczonych w obu warstwach błon (28). Przebieg krzywej znacznie się zmienia w wyniku modyfikacji błon przez wprowadzenie egzogennych lecytyn, nie zmienia się natomiast w tych warunkach krzywa temperaturowa aktywności podstawowej, stymulowanej przez F^- , czy też stymulowanej przez GppNHp cyklazy adenyłowej. Wyniki te wskazują, że hormonalna stymulacja enzymu wiąże się z wywołaną hormonalnie, a uzależnioną od płynności struktury błony dyfuzją składników układu przekaźników informacji hormonalnej (28).

W nienaruszonej strukturze błonowej ciężar cząsteczkowy białek enzymatycznych można określić na podstawie maksymalnej dawki promieniowania rentgenowskiego nie powodującej inaktywacji enzymów. Błony napromieniowuje się w stanie zliofilizowanym a następnie, po uwodnieniu bada aktywność enzymów (28). Przyjmuje się, że inhibicja aktywności podstawowej cyklazy adenyłowej, jak również aktywności wiązania hormonu w błonach natywnych odpowiada aktywności podstawowej białek, odpowiednio cyklazy i receptora. Stwierdzono, że preinkubacja błon ze stymulatorami takimi jak nukleotydy guanyłowe, F^- czy hormon zmienia oznaczany tą metodą ciężar cząsteczkowy białek, chociaż wykazują one tę samą aktywność enzymatyczną czy receptorową. Badając komórki wątroby (29, 30) i komórki tłuszczowe (30) R o d b e l l i wsp. wykazali, że w nieobecności glukagonu aktywność receptora tego hormonu związana jest z oligomerycznym kompleksem o dużym ciężarze cząsteczkowym 670 000—1 300 000. Sugeruje to występowanie w błonach tych komórek skomplek-

sowanych wielu cząsteczek receptora z białkiem regulatorowym (kompleks poli R-N). Natomiast preinkubacje błon z glukagonem powoduje rozbitcie tego kompleksu. H o u s l a y i wsp. (25) badając również wątrobę nie stymulowaną nie wykryli jednak oligomerycznego kompleksu i wykazali aktywność receptorową związaną jedynie z białkiem receptorowym (220 000). Po stymulacji aktywność receptorową wykrywano następnie w grupie białek o masie 300 000 (co odpowiada kompleksom R-N lub R-N-C). Natomiast aktywność cykazy adenylowej po stymulacji nukleotydamy czy F^- występuje w białkach 160 000 odpowiadających kompleksowi cyklaza-białko regulatorowe (C-N), a po stymulacji glukagonem aktywność ta występuje w białkach 390 000 odpowiadając kompleksowi receptor-białko regulatorowe-cyklaza (R-N-C).

Badając w podobnych warunkach wielkość białek o aktywności receptorowej i enzymatycznej błon erytrocytów indyka (31) nie udało się wykryć odpowiedniego, do występującego w wątrobie, kompleksu oligomerycznego receptora. W błonach erytrocytów nie aktywowanych, aktywność receptorowa cechuje białko o ciężarze 90 000, a aktywność podstawowa cykazy badana w obecności Mn-ATP, białko o podobnym ciężarze 92 000. W tych samych, nie aktywowanych wstępnie błonach aktywność cykazy stymulowaną przez GppNHp lub F^- wykrywa się w białkach o ciężarze 226 000 (kompleks C-N) a w obecności izoprotenerolu i GppNHp w białkach 316 000 (kompleks R-N-C). W doświadczeniach z radiacyjną inaktywacją nie badano bezpośrednio aktywności regulatorowego białka N. Jego ciężar można jednak wyliczyć pośrednio i w błonach erytrocytów wynosi on 126 000 (28).

Jeżeli stymuluje się układ błon przed inaktywacją radiacyjną uzyskuje się podobne wyniki do uzyskanych bez stymulacji, co wskazuje, że w błonach erytrocytów zarówno nie aktywowanych jak i po stymulacji hormonalnej białka-receptor, białko regulatorowe i cyklaza występują w postaci niezależnej ale również i w formie kompleksów (R-N, N-C, R-N-C).

II-2. Rozdzielenie poszczególnych elementów układu

Aktywności poszczególnych składników układu udało się rozdzielić po solubilizacji komórek wielu typów. Następnie określono parametry fizyczne odpowiednich frakcji białek. Oznaczono na przykład promień Stoksa, stałą sedimentacji, ciężar cząsteczkowy i spęcyficzną objętość cząstkową. Białka te nie były jednak zupełnie czyste i przy interpretacji wyników pamiętać należy, że przekaźniki informacji hormonalnej stanowiły jedynie nieznaczny procent odpowiedniej frakcji białek. Najczęściej badano parametry otrzymane w wyniku solubilizacji detergentami oraz

w obecności niewielkich ilości tych detergentów. W ten sposób uzyskiwano dane dotyczące micelli białko-detergent. Celem scharakteryzowania samej frakcji białkowej wyznaczano specyficzną objętość cząstkową (odwrotność gęstości, \bar{v}) na podstawie różnic w sedymentacji podczas wirowania w gradiencie gęstości sacharozy rozpuszczonej w H_2O i D_2O i na tej podstawie wyliczano zawartość detergentu w micellach i korygowano ciężar cząsteczkowy białek (32). W kilku przypadkach stwierdzono, że aktywności enzymatyczne pozostają bez zmian lub nawet są wyższe po usunięciu detergentów (32, 33, 34). Zawsze jednak grozi wtedy niebezpieczeństwo agregacji białek. Przeprowadzano solubilizację błon natywnych pochodzących z wielu rodzajów komórki oraz preinkubowanych z różnymi stymulatorami. W następstwie izolowano różne składniki układu przekazywania informacji hormonalnej. W różnych tkankach różne są parametry fizyczne charakteryzujące frakcję białek z którą związana jest aktywność receptora hormonu. Zawsze jednak specyficzną objętość cząstkową receptorów jest duża, co wskazuje na wiązanie znacznej liczby cząsteczek detergentów a więc na dużą część hydrofobową (32, 35) receptora.

Cyklaza adenylova podczas solubilizacji częściowo traci aktywność podstawową, jest więc enzymem labilnym. Wyjątkami są preparaty cyklazy adenylowej z mózgu i jąder szczura (32) aktywowane przez detergenty. Solubilizacja obniża też stymulację cyklazy adenylowej przez F^- i GppNHp (33, 36) i enzym przestaje być wrażliwy na stymulację hormonalną. Stwierdzono, że aktywność enzymu można stabilizować przeprowadzając solubilizację w obecności NaF lub GppNHp (37, 38). Dlatego też najczęściej charakterystykę cyklazy adenylowej w formie rozpuszczonej przeprowadza się w obecności jednego z tych związków. Należy uwzględnić jednak, że w tych warunkach uzyskuje się nie samą cyklazę a kompleks z regulatorowym białkiem wiążącym nukleotydy guanylowe (C-N).

Aktywność cyklazy adenylowej stymulowanej przez GppNHp związana jest z białkami dwóch typów odpowiadających kompleksowi C-N. Białka pierwszego typu cechuje wiązanie dużej ilości detergentów niejonowych. Należą tu preparaty uzyskane z błon komórek kory mózgowej (32), limfatycznych (4, 35) oraz wątrobowych (33). Zachowują się one jak typowe białka zanurzone w błonie i posiadają w cząsteczce dużą część hydrofobową. Ich ciężar cząsteczkowy wynosi około 220 000. Natomiast cyklaza adenylova z błon komórek tarczycy (39) należy do białek drugiego typu. Wiąże mało detergentu a więc ma niewielką część hydrofobową. Jednocześnie też ma mniejszy ciężar cząsteczkowy (około 160 000). Również taki ciężar ma enzym wątrobowy, co wyznaczano na podstawie radiacyjnej inaktywacji (28), podczas gdy po solubilizacji wyznaczono ciężar 220 000 (33). Nieznana jest relacja pomiędzy tymi preparatami cyklazy. Jest jednak mało prawdopodobne żeby enzym ten występował w różnych formach w odmiennych, a zwłaszcza w tej samej komórce (32). Bardziej prawdopodobne jest, że podstawowa struktura cyklazy jest stała a obser-

wowane różnice wynikają z oddzielenia lub agregacji jakiejś podjednostki podczas preparatyki.

Ciążar cząsteczkowy cyklazy adenylowej z komórek wątroby solubilizowanej w obecności GppNHp i NaF jest taki sam (33). Natomiast po solubilizacji błon tarczycy w obecności NaF aktywność cyklazy występuje w białkach o ciężarze cząsteczkowym 119 000, podczas gdy w wyniku solubilizacji w obecności GppNHp aktywność związana jest z białkiem o ciężarze 159 000 (40). Te i podobne różnice ciężarów cząsteczkowych w preparatach z błon komórek nerek (41) dyskutowane są w kontekście obecności w układzie przekaźników informacji hormonalnej wspólnego białka regulatorowego N wiążącego oba stymulatory lub też dwóch niezależnych białek regulatorowych związanych z aktywacją przez GppNHp i NaF.

Cyklaza adenylowa z błon komórek mózgu i rdzenia nadnerczy jest trwała w obecności detergentów i nie wymaga podczas solubilizacji stabilizacji przez F^- lub GppNHp. Pozwoliło to na badanie również jej aktywności podstawowej po solubilizacji. Aktywność ta w preparacie z rdzenia nadnerczy związana jest z białkiem 160 000 (42), a z komórek mózgu z niejednorodną frakcją 199 000—265 000 (43).

Cyklazę adenyłową całkowicie oczyszczoną od białek regulatorowych uzyskano z komórek wątroby królika w wyniku solubilizacji błon cholanem sodu w roztworze soli o wysokiej sile jonowej i rozdziału białek na Ultrogel AcA (34). Aktywność tego enzymu nie była stymulowana ani przez F^- , ani przez GTP- γ -S, stymulację jednak przywracało dodanie białka regulatorowego. Enzym izolowano w formie agregatu i był on nietrwały, można go było natomiast znacznie stabilizować przez usunięcie cholanu i dodanie dwumirystydylofosfatydylocholiny (44). Stwierdzono, że po oddzieleniu białek regulatorowych zmienia się wrażliwość na jony dwuwartościowe, niezbędne przy reakcji powstawania cAMP z ATP. Skompleksowana z białkiem regulatorowym i stymulowana zarówno hormonalnie jak i przez GppNHp cyklaza adenylowa preferencyjnie używa jako substratu Mg-ATP, podczas gdy izolowana cyklaza adenylowa wymaga obecności Mn-ATP (44, 45). Ta specyficzność substratowa spowodowała, że ostatnio dla charakteryzowania aktywności podstawowej cyklazy adenylowej bada się reakcję w obecności Mn^{2+} (29). Cyklazę adenyłową częściowo oddzieloną od białek regulatorowych wydzielono również z błon komórek nerek. Stała sedymentacji tego białka, 6S jest niższa niż białka o aktywności cyklazy adenylowej wydzielonego z błon preinkubowanych z GppNHp (7,5S) (41).

Regulatorowe białko wiążące nukleotydy guanylowe zwane białkiem N wyizolowano po raz pierwszy po solubilizacji przy pomocy detergentów błon erytrocytów ptasich. Białko to wiąże również ATP, co wykorzystano przy jego identyfikacji. Oprócz detergentów do rozpuszczania białka N stosowano roztwory o niskich siłach jonowych w obecności werse-

nianu sodu, jak przy izolowaniu peryferycznych białek kurczliwych błon. W następnych preparatykach białka wiążącego nukleotydy guanylowe wykorzystano do jego znakowania reakcję z toksyną cholery. Stwierdzono bowiem, że właśnie to białko pod wpływem toksyny ulega rybozylacji w obecności ADP i NAD^+ (27, 47, 48). Białko wiążące nukleotydy guanylowe wydzielono z różnych komórek, na przykład z leukocytów, czy komórek mózgu (45). Bardzo dobrym sposobem uzyskania tego białka okazało się zastosowanie cholanu sodu przy solubilizacji błon komórek wątroby (44, 49). Białko to oczyszczono następnie 100 000 razy w stosunku do preparatu wyjściowego zawierającego sumę białek komórkowych (49). Stwierdzono, że zawiera peptydy 52 000, 45 000 i 35 000, przy czym tylko dwa pierwsze są substratem dla toksyny cholery i odpowiednikiem białka wydzielonego z komórek innego typu. Białko to jest termostabilne (46) i nie zawiera składników fosfolipidowych (44). Na podstawie stałych sedymentacji w H_2O i D_2O można wnioskować, że wiąże ono mniej detergentów niż cyklaza adenylova, czy że jest bardziej polarne niż to białko (50). Hudson i Johnson (51) wykazali duże podobieństwo mapy peptydowej białka o masie 52 000 i białka 42 000 z błon erytrocytów indyka. Stwierdzili też, że w wyniku łagodnej proteolizy z białka 52 000 można otrzymać dodatkowo jedynie drobny fragment nieobecny w białku 42 000.

Badając stałe sedymentacji białka wiążącego nukleotydy guanylowe w powiązaniu z GDP i $\text{GTP-}\gamma\text{-S}$ stwierdzono, że ciężar cząsteczkowy 42 000 odpowiada kompleksowi GTP- białko N i stałej sedymentacji 3,4 S. Po preinkubacji tego kompleksu z cyklazą adenylową uzyskuje się kompleks o większej stałej sedymentacji 7,6 S, co sugeruje utworzenie kompleksu GTP- białko N-cyklaza. Natomiast w obecności GDP białko wiążące nukleotydy guanylowe ma wyższą stałą sedymentacji niż w obecności GTP i stała ta nie zmienia się po inkubacji z cyklazą. Widać więc, że jedynie forma GTP- białko N ma powinowactwo do cyklazy, jak również, że zmiana nukleotydu z GTP na GDP w białku wiążącym te nukleotydy pociąga za sobą zmianę struktury tego białka, być może jego dimeryzację (52).

Wyniki doświadczeń Hudsona i wsp. również wskazują na różnice w budowie białka wiążącego nukleotydy po przyłączeniu $\text{GTP-}\gamma\text{-S}$ lub GDP (53). Badali oni produkty hydrolizy trypsyną tego białka i stwierdzili, że z jego kompleksu z $\text{GTP-}\gamma\text{-S}$ łatwo jest wydzielić fragment 41 000, podczas gdy z kompleksu N-GDP fragment ten nie powstaje. Fragment ten powstaje również, po inkubacji z $\text{GTP-}\gamma\text{-S}$ i trypsyną błon erytrocytów ludzkich, które zawierają białko wiążące nukleotydy i śladową aktywność cyklazy a nie zawierają receptora β -adrenergicznego. Zmiany konformacyjne w białku N zależą więc wyłącznie od przyłączenia trójfosforanu guaniny a nie od interakcji tego białka z receptorem czy cyklazą.

Białko wiążące nukleotydy guanylowe o ciężarze 42 000 (45 000)

i 52 000 jest prawdopodobnie częścią regulatorowego białka o ciężarze 126—130 000. Białko takie wydzielone z błon erytrocytów (46), komórek limfatycznych i wątrobowych (54) pozwalało na rekonstrukcję wrażliwości na GTP cyklazy adenylowej. Również na ciężar białka regulatorowego około 130 000 wskazywały doświadczenia z inaktywacją radiacyjną (31).

Stwierdzono, że białka wiążące nukleotydy guanylowe występują w komórkach w dużym nadmiarze. W erytrocytach tylko 5% (46) lub nawet tylko 1% (55) a w komórkach wątroby około 1% tych białek powoduje aktywację cyklazy przez nukleotyd.

Welton i wsp. (8) solubilizowali natywne i preinkubowane z ^{125}J -glukagonem błony wątroby szczura. Solubilizat rozdzielili na Ultragel AcA 22 i stwierdzili, że cyklaza adenylowa wrażliwa na stymulację przez GppNHp oraz kompleks glukagon-receptor-białko N eluowane są niezależnie. Wysłano wniosek, że receptor i cyklaza adenylowa jako odrębne białka związane są też z odrębnymi białkami regulatorowymi N_1 i N_2 . Odpowiadałoby to omówionej różnicy funkcjonalnej oddziaływań z różnymi nukleotydami guanylowymi. Wyniki te jednak nie wykazują bezpośrednio obecności dwóch różnych białek regulatorowych N_1 i N_2 , a mogą też wskazywać na zmianę właściwości białka regulatorowego podczas stymulacji hormonalnej. Na taki mechanizm zmian w wyniku stymulacji wskazują doświadczenia Lefkowitz a i wsp. z użyciem erytrocytów żaby (18, 56) oraz retikulocytów szczura (57). Po solubilizacji błon erytrocytów żaby w obecności hormonu (agonista β -adrenergiczny— ^3H -hydroksybenzylizoproterenol) uzyskano białko które w chromatografii powinowactwa zatrzymywane było zarówno na kolumnie z GTP-Sepharose, tak jak białko wiążące nukleotydy, jak i na Sepharose sprzężonej z lektyną z kielków pszenicy, tak jak receptor β adrenergiczny o strukturze glikoproteidowej. Jeżeli przed solubilizacją preparat błon wyznakowano z użyciem ^{32}P -ATP, znakując specyficznie białko N, to radioaktywność wykrywano w kompleksie zatrzymanym na Sepharose. Uzyskano więc z błon białko, które wykazywało cechy zarówno receptora jak i białka wiążącego nukleotydy guanylowe a więc odpowiadające kompleksowi hormon-receptor-białko N (H-R-N) (18). W znacznie mniejszej ilości kompleks ten uzyskiwano z błon nie aktywowanych hormonalnie. Po preinkubacji błon z hormonem w obecności GTP lub antagonistą hormonu kompleks hormon-receptor-białko N nie powstaje. W obecności GTP wynik negatywny jest prawdopodobnie skutkiem szybkiego rozbicia tego kompleksu. Białko wiążące nukleotydy guanylowe wyeluowano następnie z kolumny z GTP Sepharose przy pomocy GTP- γ -S. Stwierdzono, że białko to stymuluje cyklazę adenylową z błon erytrocytów indyka. Uzyskane w tym doświadczeniu wyniki wskazują wyraźnie, że w wyniku preinkubacji z hormonem w błonach erytrocytów powstaje kompleks H-R-N i występuje on niezależnie od cyklazy. Wskazują również, że to samo białko N, które wiązane

jest przez receptor, przy zmianie warunków środowiska jest odpowiedzialne za stymulację cyklazy adenylowej przez GTP.

Wyniki uzyskane przy użyciu techniki solubilizacji i rozdziału składników potwierdziły więc dane otrzymane podczas badania nienaruszonych błon. Wyniki te wskazują, że w komórce występują zarówno oddzielne białka o aktywności receptora, białka N i cyklazy jak i kompleksy receptor-białko N, cyklaza-białko N, receptor-białko N-cyklaza, a w niektórych układach również polikompleksy receptora z białkiem N. Być może w nie aktywowanej komórce występują wyłącznie oddzielne białka układu przekaźników informacji hormonalnej, a wykrywane kompleksy są skutkiem endogennej aktywacji przez hormon bądź GTP. Stymulacja egzogennym GTP lub jego niehydrolizowalną pochodną powoduje powstanie lub stabilizację kompleksu cyklaza-białko N. Stymulacja egzogennym hormonem powoduje powstanie kompleksu receptor-białko N. Wydzielenie poszczególnych komponentów układu umożliwiło dalsze próby z jego rekonstrukcją. Udane rekonstrukcje wrażliwych na stymulację hormonalną układów są potwierdzeniem trafnej charakterystyki izolowanych białek i umożliwiają opracowanie koncepcji mechanizmu przenoszenia informacji hormonalnej do komórki.

III. Rekonstrukcja układu cyklazy adenylowej

Pierwsze udane próby rekonstrukcji układu cyklazy adenylowej uzyskano metodą fuzji limfocytów mysich odpowiednio dobranych klonów. Główne prace z tej dziedziny pochodzą z pracowni A. G. Gilmana (4, 58, 59). Uzyskano tam klony komórek limfatycznych selektywnie pozbawione białka receptorowego, cyklazy adenylowej lub białka regulatorowego. Wyhodowanie takich klonów wskazuje na niezależność mutacji wywołujących zmiany w przekaźnikach informacji hormonalnej i na genetyczne zróżnicowanie układu. W pracowni tej prowadzono też doświadczenia z włączaniem fragmentów błon wyselekcjonowanych komórek przez inne, nienaruszone komórki. Używano komórki typu dzikiego S 49 oraz klonu cyc^- (inna nazwa AC^-) i klonu UNC. Pierwszy z nich cechuje niezmienną aktywność adrenergiczna i aktywna cyklaza, natomiast nie odpowiada on na bodziec hormonalny i stymulację przez toksynę cholery, co wskazuje na mutację powodującą zmiany w białku regulatorowym (48). Drugi posiada nieco zwiększoną aktywność receptorową, normalną aktywność podstawową oraz aktywność stymulowaną przez F^- i GppNHp cyklazy adenylowej, ale nie odpowiada na hormon, co wskazuje na stałe rozprężenie układu. Ponadto używano klonów komórek B 82 nie zawierające receptorów adrenergicznych, natomiast wykazujące normalną stymulację cyklazy przez stymulatory niespecyficzne i prostaglandynę E_1 . Nie udało się uzyskać klonów limfocytów nie posiadających aktywności cykla-

zy adenylowej. Dlatego używano odpowiedni klon hepatocytów HC-1 nie posiadający aktywności cyklazy adenylowej i mający niezmienną aktywność receptorową (60).

W wyniku fuzji błon komórek cyc^- , lub całych komórek cyc^- i UNC z komórkami B 82 uzyskano komórki wrażliwe na stymulację adrenergiczną. Nie uzyskano natomiast rekonstrukcji podczas fuzji komórek cyc^- i UNC, co wskazuje na niekomplementarność mutacji. Ten negatywny wynik może być skutkiem mutacji z całkowicie zmienioną strukturą lub ubytkiem jakiegoś dodatkowego elementu regulatorowego pomiędzy białkiem receptorowym a białkiem N. Na obecność takiego dodatkowego elementu wskazują również wyniki bardzo szczegółowych badań rekonstrukcji systemu po inaktywacji cieplnej ekstraktów błon z komórek różnych klonów i ich fuzji z komórkami cyc^- (4).

Doświadczenia z fuzją fragmentów błon komórkowych i komórek przynoszą też dane wskazujące na identyczność układu cyklazy adenylowej w różnych komórkach. Orly i Schramm (61) spowodowali dezaktywację cyklazy adenylowej w erytrocytach indyka przy użyciu imidu kwasu N-etylomaleinowego. Następnie za pomocą nieaktywnego wirusa Sendai spowodowali połączenie komórek tych erytrocytów z wyselekcjonowanym klonem erytrocytów nie posiadającym receptora β -adrenergicznego. Uzyskali oni w ten sposób układ wrażliwy na β -stymulację. Podobnie otrzymali aktywny układ β -adrenergiczny po połączeniu receptora glukozy z błon wątroby z wyselekcjonowanymi erytrocytami bez receptora (62). Tak więc charakterystyczna odpowiedź biologiczna komórki może być wywołana przez obcy receptor hormonalny.

Następne udane próby rekonstrukcji aktywnego układu przekaźników informacji hormonalnej przeprowadzono z użyciem jego składników wyizolowanych po solubilizacji i częściowo oczyszczonych. I tak stwierdzono, że wydzielone z błon komórek wątroby królika białko wiążące nukleotydy przywraca wyizolowanej z tej samej tkanki cyklazie adenylowej wrażliwość na stymulację hormonalną (44). Również białko N z erytrocytów umożliwia stymulację przez GppNHp cyklazy adenylowej izolowanej z erytrocytów (46, 63). Na podobieństwo regulatorowego białka N wskazują udane rekonstrukcje cyklazy w układach heterogennych, na przykład białko N z erytrocytów żabich (18) lub ludzkich (64) daje rekonstrukcję aktywnej cyklazy w erytrocytach indyka, czy też wątrobowe białko N przywraca aktywację cyklazy w limfocytach cyc^- (44, 54). Jeżeli białko wiążące nukleotydy izolowano z błon uprzednio aktywowanych hormonalnie, stwierdzano silniejszą aktywację cyklazy w obecności GTP niż w obecności białka izolowanego z błon nie aktywowanych (46). Również preinkubacja białka N z GppNHp przed dodaniem go do preparatu zawierającego cyklazę z błon komórek mózgowych przyspieszała proces następnej aktywacji układu. Strittmatter i Neer uważają, że czas potrzebny na zajście zmian konformacyjnych w regulatorowym białku N

po przyłączeniu nukleotydu może ograniczać szybkość stymulacji cyklazy (45).

IV. Obniżenie wrażliwości na hormon

Dawno stwierdzono, że długotrwałe podawanie hormonu nie powoduje zwielokrotnienia stymulacji wywołanej pojedynczą dawką. Jest to obniżenie wrażliwości na hormon, które może być ogólne lub specyficzne w stosunku do czynnika, który je wywołał. Proces specyficznego obniżania wrażliwości poznany jest lepiej, choć i tu jest jeszcze wiele znaków zapytania. W procesie tym można wyróżnić dwa etapy. Pierwszy etap następuje szybko. Już po kilkuminutowej preinkubacji z izoproterenolem limfocytów (65), erytrocytów (66, 67) i komórek astrocytoma (68, 69) obserwuje się, że podany następnie hormon powoduje stymulację cyklazy adenylowej stanowiącą 50 procent stymulacji pierwotnej. Nie obserwuje się w tym czasie zmian w ilości receptorów, natomiast wiązanie hormonu przez receptor cechuje się słabym powinowactwem (67). Ten etap obniżenia wrażliwości jest odwracalny. Usunięcie hormonu z mieszaniny inkubacyjnej przywraca układowi już po kilku minutach zdolność normalnej odpowiedzi na bodziec (69, 70). Podobne obniżenie wrażliwości cyklazy adenylowej na długotrwałą stymulację wykazano badając komórki mózgu (71), nerek (72) i wątroby (73). Na ogół nie ulegały przy tym zmianie aktywność podstawowa cyklazy adenylowej i stymulacja przez F^- . W układzie bezkomórkowym obniżenie wrażliwości na lutropinę uzyskano w błonach komórek jajowodu kurczęcia, przy czym reakcja wymagała jednocześnie obecności GTP (74). Natomiast w izolowanych błonach komórek astrocytoma, mimo dodawania obok hormonu GTP lub ATP nie udało się odtworzyć tego efektu (69).

Powyższe obserwacje wskazują, że pierwszy etap obniżenia wrażliwości na hormon wiąże się z rozprężeniem układu cyklazy adenylowej. Poszukując miejsca tego rozprężenia wykluczono cyklazę adenylową, a to na podstawie występowania niezmiennionej aktywności podstawowej oraz faktu, że obniżenie wrażliwości uzyskiwano też w komórkach HC-1, genetycznie pozbawionych tego białka (69).

Następnymi miejscami odpowiedzialnymi za rozprężenie mogłyby być zmiany w białku N lub receptorze uniemożliwiające wytworzenie kompleksu receptor-białko N. Stwierdzono bowiem, że do wytworzenia wiązania hormon-receptor o wysokim powinowactwie, a więc takiego jakiego brak w komórkach o obniżonej wrażliwości na hormon niezbędne jest niezmiennione białko regulatorowe. Niezbędny też jest niezmienniony receptor. Na zmiany zachodzące w receptorze podczas specyficznego obniżania wrażliwości wskazuje specyficzny charakter procesu. Bezpośrednim dowodem na zmiany w receptorze są wyniki doświadczeń z rekonstrukcją

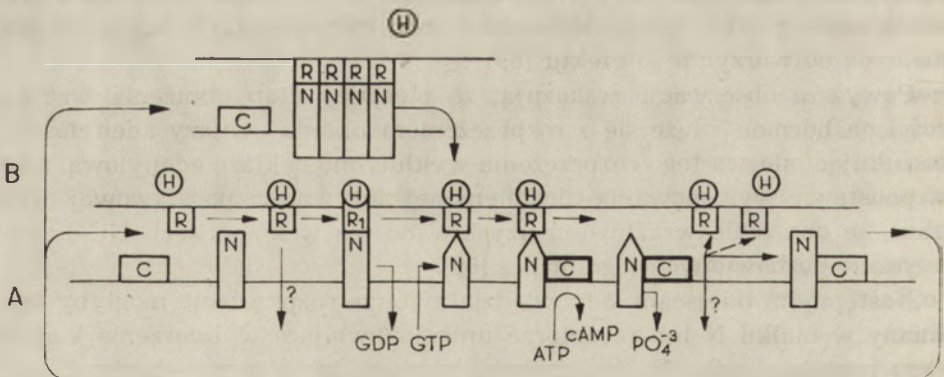
układu w komórkach limfocytarnych. I tak, jeżeli obniża się wrażliwość na hormon w komórkach dzikich S 49, to ekstrakt tych komórek nie powoduje obniżenia wrażliwości komórek cyc^- . A więc nie zaszła podczas tego procesu żadna zmiana w białku N (64). Natomiast jeżeli odwrotnie preinkubuje się komórki cyc^- z hormonem to obniżenie wrażliwości na hormon wykrywa się po ich fuzji z ekstraktem cholanowym komórek dzikich (65).

W wielu układach wykazano niezbędność ATP do obniżania wrażliwości (64), w innych natomiast niezbędną obecność GTP (74). Na tej podstawie przypuszcza się, choć nie wykazano tego eksperymentalnie, że modyfikacja receptora podczas obniżania wrażliwości polega na jego fosforylacji. Pośrednim potwierdzeniem tej sugestii jest stwierdzenie, że w błonach pęcherzyków Graffa można przywrócić wrażliwość na hormon przez preinkubację z endogenną fosfoproteiną o aktywności fosfatazy (75).

Drugi etap obniżenia wrażliwości na hormon nie jest związany bezpośrednio z przekaźnikami błonowymi i polega na zgrupowaniu i usunięciu części receptorów z błon.

V. Model działania hormonów

Szczegółowa analiza danych dotyczących budowy poszczególnych przekaźników informacji hormonalnej i ich połączeń oraz oddziaływań z agonistami, antagonistami i nukleotydami stworzyła możliwość sformułowania nowego modelu działania hormonów. Model ten przedstawiono na rysinie 1 (30, 76, 77, 78, 79, 80). Model opiera się na koncepcji kompleksu



Ryc. 1. Mechanizm hormonalnej stymulacji cyklazy adenylowej

A — schemat podstawowy: Hormon — H łączy się z receptorem — R uaktywiając go. Następuje przyłączenie wiążącego nukleotydu guanylowego regulatorowego białka — N, wzrasta powinowactwo receptora do hormonu ($R \rightarrow R_1$) i obniża się powinowactwo białka N do GDP. GDP jest uwalniane a na jego miejsce wchodzi GTP. Przyłączenie GTP wywołuje zmiany konformacyjne w białku N w wyniku których wzrasta jego powinowactwo do cyklazy adenylowej — C. Następuje przyłączenie cyklazy adenylowej z wytworzeniem kompleksu hormon-receptor-białko N (GTP)-cyklaza. W kompleksie tym maleje powinowactwo receptora do hormonu i do białka

zderzeniowego, który Tolkovsky i Levitzki nazwali „collising coupling” (81, 82). Koncepcja ta zakłada, że układ jest wieloskładnikowy a receptor ze związanym hormonem może się przesuwać wzdłuż błony komórkowej i reagować z kompleksem cyklazy oraz, że receptory różnych hormonów mogą współdziałać z tym samym białkiem katalitycznym. Aktywność cyklazy adenyłowej jest regulowana przez aktywację hormonalną oraz reakcją nazywaną „turn off”. Aktywacja polega na tym, że hormon po związaniu się z receptorem modyfikuje go zwiększając jego powinowactwo do regulatorowego białka N i tworząc kompleks hormon-receptor-białko N-GDP (H-R-N-GDP). W kompleksie tym receptor ma silniejsze powinowactwo do hormonu niż przed dołączeniem białka regulatorowego, natomiast białko regulatorowe ma osłabione powinowactwo do GDP, które jest uwalniane. Proces ten odsłania w białku N miejsce, w którym związane jest GTP (powstaje kompleks H-R-N-GTP). Przyłączenie tego nukleotydu obniża powinowactwo receptora do hormonu, który jest uwalniany. Równocześnie zachodzą zmiany konformacyjne w białku N, obniża się jego powinowactwo do receptora a zwiększa się jego powinowactwo do cyklazy. Powstaje przejściowy kompleks (receptor-białko N (GTP)-cyklaza, lub też, równocześnie z odłączeniem hormonu oddziela się też i receptor, wytwarzając bezpośrednio kompleks białko N (GTP)—cyklaza. W obu tych kompleksach cyklaza adenyłowa osiąga konformację nadającą jej najwyższą aktywność.

Aktywację hormonalną przerywa reakcja „turn off”, to jest hydroliza GTP do GDP przez białko N o aktywności GTP-azy. Enzym, cyklaza powraca wówczas do swej podstawowej aktywności.

Aktywność cyklazy adenyłowej podczas stymulacji hormonalnej oscyluje stale pomiędzy swoim stanem podstawowym a aktywnością wzbudzoną, a wzrost produkcji cAMP następuje, gdy większa ilość cząsteczek enzymu jest w formie wzbudzonej. Wszystkie cząsteczki cyklazy zostają wzbudzone podczas aktywacji przez niehydrolizowalne analogi GTP lub toksynę cholery wtedy, gdy GTP-aza jest nieaktywna. Podczas stymulacji hormonalnej natomiast cyklaza ujawnia zawsze jedynie część swoich potencjalnych możliwości, ponieważ produkcję cAMP przerywa reakcja „turn off”.

In vivo produkcja cAMP regulowana jest przede wszystkim hormonalnie za pośrednictwem receptora. Jednak przykład działania toksyny cholery wskazuje, że działanie bezpośrednio poprzez regulatorowe białko N

ka N co powoduje oddzielenie hormonu i receptora. Cyklaza adenyłowa w połączeniu z białkiem N ma najwyższą aktywność. Aktywność ta wraca do podstawowej po hydrolizie GTP związanego z białkiem N. Maleje wtedy powinowactwo białka N do cyklazy i wszystkie składniki układu występują w formie wolnej. Pojawienie się hormonu zapoczątkowuje następny cykl przemian. Przy długotrwałej stymulacji hormonalnej kompleks hormon-receptor przed, lub po omówionych przekształceniach jest usuwany z błon.

B — schemat zmian w komórkach wątrobowych: Hormon łącząc się z receptorem powoduje dysocjację kompleksu połączonych par hormon-receptor (H-R). Dalsze zmiany zachodzą zgodnie ze schematem podstawowym.

może również regulować ilość powstającego cAMP. Taką funkcję regulatorową przypisuje się działaniu prostaglandyny E_1 na układ cykazy w błonach komórek tarczycy przyjmując, że obniża ona powinowactwo białka N do GDP, które może wówczas zostać uwolnione, co ułatwia następną stymulację cykazy przez endogenne GTP (83).

Ten podstawowy schemat stymulowania komórki przez hormon można zmodyfikować nie podważając jednak kluczowej roli regulatorowego białka wiążącego nukleotydy guanylowe i przekształceń tych nukleotydów podczas stymulacji hormonalnej. Koncepcja opracowana przez *R o d b e l l a* (30,78) zakłada, że w stanie podstawowym receptor i białko N występują w formie oligomerycznego kompleksu gdzie wiele par R-N jest ściśle połączonych. W kompleksie tym nie ma wolnego miejsca pozwalającego na przyłączenie GTP. Działanie hormonu powoduje rozdzielenie poszczególnych par oligomerycznego kompleksu, co umożliwia przyłączenie GTP i zajście dalszego ciągu reakcji omówionych w schemacie podstawowym. Koncepcja ta opiera się głównie na doświadczeniach z komórkami wątroby, które, jak uprzednio opisano zawierają oligomeryczny kompleks. Ponadto znaczna odporność układu przekaźników informacji hormonalnej w błonach hepatocytów na działanie fosfolipazy świadczy o ścisłym połączeniu białek tego układu.

Obniżenie wrażliwości na hormon można chyba tłumaczyć zwiększeniem w obecności hormonu w wysokich stężeniach ilości połączeń hormon-receptor o niskim powinowactwie. Przy nadmiarze hormonu utworzony kompleks nie jest w stanie reagować z białkiem N, a po pewnym czasie mogą w nim zajść zmiany nieodwracalne, na przykład połączenie pomiędzy sobą kompleksów hormon-receptor, prowadzące w dalszym etapie do usunięcia receptorów z błony komórkowej.

VI. Hormonalne hamowanie cykazy adenylowej

Działanie niektórych hormonów prowadzi do obniżenia poziomu cAMP w komórce. W wielu komórkach wynika to z hormonalnie uwarunkowanego hamowania cykazy adenylowej, przy czym obniżona może zostać zarówno aktywność podstawowa, jak i odpowiedź na stymulację hormonalną. Wiele danych o inhibicji cykazy adenylowej zebrano w artykule przeglądowym *J a k o b s a* i wsp. (84). Hamowanie cykazy w różnych układach wykazuje wiele cech wspólnych. Wykazano na przykład, że obniżenie aktywności zachodzi tylko w środowisku o wysokim stężeniu sodu, uzależnione jest od obecności GTP w układzie i nigdy nie jest kompletne (84, 85). Od GTP zależy hamowanie cykazy przez agonistów α -adrenergicznych w wysepkach trzustki (86), płytkach krwi, komórkach tłuszczowych (85), wątrobowych (receptor adrenergiczny α_2) (87) oraz agonistów cholinergicznych w komórkach mięśnia sercowego (84). Podczas inhibicji

stwierdzono też obniżenie przez GTP, GppNHp a również i GDP powinowactwa receptorów do hormonów.

Udział nukleotydów guanylowych w hormonalnym hamowaniu cyklazy przypomina ich udział w hormonalnej stymulacji cyklazy. Są jednak istotne różnice dotyczące stężeń w których ujawnia się działanie GTP oraz inne działanie jego pochodnych. Oba te procesy różni też zależność od stężeń jonów jedno- i dwuwartościowych oraz wrażliwość na działanie enzymów proteolitycznych i zmian w ilości grup SH. Ponadto w różnych komórkach hormonalne hamowanie cyklazy przebiega różnie.

Wydaje się, że hormony hamujące cyklazę adenylową działają poprzez podobny do określonego podczas badania stymulacji układ receptor-białko regulatorowe-cyklaza przy czym zarówno receptor jak i białko regulatorowe są inne niż w procesie stymulacji (9, 84). Nie jest jednak wykluczone, że białko regulatorowe wiążące nukleotydy guanylowe w procesie stymulowania i hamowania jest tym samym białkiem, wykazującym różnice allosteryczne i funkcjonalne w połączeniu z różnymi składnikami systemu. Dotychczas bowiem nie wydzielono z błon i nie scharakteryzowano innego białka niż białko N, które wiąże specyficznie nukleotydy w obecności hormonu. Stwierdzono natomiast, że oddziaływanie hormonów z α -receptorem w płytkach krwi prowadzi do zwiększenia szybkości sedimentacji w gradiencie sacharozy. Być może więc prowadzi do powstania kompleksu receptor-białko N, analogicznego jak podczas oddziaływań agonistów β -adrenergicznych z receptorem (79).

Inny postulowany mechanizm hamującego działania adrenaliny poprzez α -receptory adrenergiczne w płytkach krwi polega na ich bezpośrednim działaniu na białko N poprzez stymulowanie jego aktywności GTP-azowej, i tym samym zwiększenie procesu „turn off” (88).

Zaakceptowano do druku 28.06.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Sutherland E. W., Robinson G. A., (1966), *Pharmacol. Rev.*, **17**, 145—161
2. Kahl A., (1972), *Post. Biochem.*, **18**, 199—224
3. Skrzypek-Osiecka I., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 373—400
4. Ross E. M., Haga T., Howlett A. C., Schwarzmeier L. S., Gilman A. G., (1978), w *Advances in cyclic nucleotide research*, red. Greengard P., Robinson G. A., t. 9, str. 53—68, Raven Press, New York
5. Richert N. D., Ryan R. J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 4851—4861
6. Stengel D., Lacombe M. L., Billon M. C., Hanoune J., (1979), *FEBS Lett.*, **107**, 105—109
7. Lad P. M., Weltona A. F., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252** 5942—5946

8. Welton A. P., Lad P. M., Newby A. C., Yamamura H., Nicosis S., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5947—5950
9. Steer M. L., Wood A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10791—10797
10. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S., Krans M. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1877—1882
11. Bilezikian J. P., Aurbach G. D., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 157—161
12. Lefkowitz R. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1006—1011
13. Ross E. M., Maquire M. E., Sturgill T. W., Bilton R. L., Gilman A. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5761—5775
14. Kimura N., Nagata N., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3451—3457
15. Kimura N., Nagata N., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3829—3835
16. Cuatrecasas P., Jacobs S., Bennet V., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 1739—1743
17. Cassel D., Selinger Z., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4155—4159
18. Stadel J. M., Shorr R. G., Limbird L. E., Lefkowitz R. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8718—8723
19. Swillens S., Juvent M., Dumont I. E., (1979), *FEBS Lett.*, **108**, 365—368
20. Birnbaumer L., Swartz T. L., Abramowitz J., Mintz P. W., Iyenger R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3542—3551
21. Cassel D., Eckstein F., Lowe M., Selinger Z., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9835—9838
22. Cassel D., Selinger Z., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3307—3311
23. Cassel D., Selinger Z., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 868—873
24. Pike L. J., Lefkowitz R. J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6860—6867
25. Kimura N., Shimada N., (1980), *FEBS Lett.*, **117**, 172—174
26. Heyningen S. V., Tait R. M., (1980), w Hormones and cell regulation red. Dumont J., Nunez J., t. 4, str. 293—309, North-Holland Publ. Co., Amsterdam
27. Gill D. M., Meren R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 3050—3054
28. Houslay M. D., Johansson A., Smith G. A., Hesketh T. R., Warren G. B., Metcalfe J. C., (1977), w Structure of biological membranes, red. Abrahamsson S., Pascher I., str. 331—344, Plenum Press, New York
29. Schlegel W., Kempner E. S., Rodbell M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5168—5176
30. Rodbell M., (1980), w Hormones and cell regulation, red. Dumont J., Nunez J., t. 4, str. 275—292, North-Holland Publ. Co., Amsterdam
31. Nielsen T. B., Lad P. M., Preston M. S., Kempner E., Schlegel W., Rodbell M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **78**, 722—726
32. Neer E. J., (1978), w Advances in cyclic nucleotide research, red. Greengard P., Robinson G. A., t. 9, str. 69—83, Raven Press, New York
33. Stengel D., Hanoune J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **102**, 21—34
34. Czarnocka B., Nauman J., Adler G., Kiełczyński W., (1979), *Acta Endocrinol.*, **92**, 512—521
35. Haga T., Haga K., Gilman A. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5776—5782
36. Ushijima Y., Finn F. M., Hofmann K., (1977), *Bioorg. Chem.*, **6**, 223—237
37. Vauquelin G., Geynet P., Hanoune J., Strosberg A. D., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, **74**, 3710—3714
38. Limbird L. E., Lefkowitz R. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 799—802
39. Asbury R. F., Cook G. H., Wolff J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5286—5292

40. Goldhammer A., Cook G. H., Wolff J., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 6918—6922
41. Guillon G., Couraud P. O., Roy C., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 855—861
42. Neer E. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6527—6531
43. Neer E. J., Echeverna D., Knox S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9782—9789
44. Ross E. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1949—1953
45. Strittmatter S., Neer E. J., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **77**, 6344—6348
46. Pfeuffer T., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7224—7234
47. Cassel D., Pfeuffer T., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 2669—2673
48. Johnson G. L., Kaslow H. R., Bourne H. R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 3113—3117
49. Northup J. K., Sternweis P. C., Smigel P. C., Schleifer L. S., Ross E. M., Gilman A. G., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **77**, 6516—6520
50. Kaslow H. R., Johnson G. L., Brothers V. M., Bourne H. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3736—3741
51. Hudson T. H., Johnson G. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7480—7486
52. Pfeuffer T., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 85—89
53. Hudson T. H., Roeber J. F., Johnson G. L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1459—1465
54. Howlett R. C., Gilman A. G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2861—2866
55. Cassel D., Selinger Z., (1977), *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **3**, 11—21
56. Limbird L. E., Lefkowitz R. J., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 228—232
57. Limbird L. E., Gill M., Lefkowitz R. J., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **77**, 775—779
58. Ross E. M., Gilman A. G., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3715—3719
59. Ross E. M., Gilman A. G., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6966—6969
60. Green D. A., Clark R. B., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2105—2108
61. Orly J., Schramm M., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **73**, 4410—4414
62. Schramm M., Orly J., Eimel S., Korner M., Schluster D., (1979), w *Molecular mechanisms of biological recognition*, red. Balaban M., str. 393—394, Elsevier, Amsterdam
63. Citri Y., Schramm M., (1980), *Nature*, **287**, 297—306
64. Lad P. M., Nielsen T. B., Rodbell M., (1980), *FEBS Lett.*, **122**, 179—183
65. Jyengar R., Bhat M., Riser M. E., Birnbaumer L., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 4810—4815
66. Mukherjee Ch., Caron M. G., Lefkowitz R. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 1945—1949
67. Stadel J. M., Lean A. D., Mullikin-Kilpatrick D., Sawyer D. D., Lefkowitz R. J., (1981), *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **7**, 37—47
68. Su Y. F., Harden T. K., Ferkins J. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 38—51
69. Su Y. F., Harden T. K., Perkins J. P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7410—7419
70. Harden T. K., Su Y. F., Perkins J. P., (1979), *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **5**, 99—106
71. Terasaki W. L., Brooker G., Vellis J. de, English D., Hsu Ch. Y., Moylan R. D., (1978), w *Advances in cyclic nucleotide research*, red. Greengard P., Robinson G. A., t. 9, str. 33—52, Raven Press, New York

72. Johnson G. S., Kimura N., Kimura N., (1981), *J. Cyclic Nucleotide Res.*, **7**, 105—115
73. Lam V., Bär H. P., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2103—2105
74. Ezra E., Salomon Y., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5377—5382
75. Hunzicker-Dunn M., Dreda D., Jungmann R. A., Birnbaumer L., (1979), *Endocrinology*, **104**, 1785—1793
76. Rodbard D., (1980), *Trends Pharmacol. Sci.*, **1**, 222—225
77. Franklin T. J., Levitzki A., Birnbaumer L., Hanoune J., Seelinger Z., (1980), *Trends Pharmacol. Sci.*, **1**, XI—XIV (No 9)
78. Rodbell M., (1980), *Nature*, **284**, 17—21
79. Limbird L. E., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 1—13
80. Spiegel A. M., Downs Jr. R. W., (1981), *Endocrine Reviews*, **2**, 275—305
81. Tolkovsky A. M., Levitzki A., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3795—3810
82. Arad H., Rimon G., Levitzki A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1593—1597
83. Friedman Y., Lang M., Burke G., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **673**, 114—123
84. Jakobs K. H., Aktories K., Lasch P., Schultz G., (1980), w Hormones and cell regulation, red. Dumont J., Nunez J., t. 4, str. 89—106, North-Holland Publ. Co., Amsterdam
85. Aktories K., Schultz G., Jakobs K. H., (1979), *FEBS Lett.*, **197**, 100—104
86. Katada T., Ui M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8310—8317
87. Jard S., Cantau B., Jakobs K. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2603—2606
88. Harwood J. P., Low H., Rodbell M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6239—6245
89. Aktories K., Jakobs K. H., (1981), *FEBS Lett.*, **130**, 235—238

HUBERT KROTKIEWSKI *)

Struktura łańcuchów cukrowych glikoprotein i metody jej badania

Structure of Sugar Chains of Glycoproteins and Methods for its Investigation

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Rodzaje wiązań chemicznych cukier-aminokwas; typy oligosacharydów w glikoproteinach
 - II-1. Wiązanie O-glikozydowe
 - II-2. Wiązanie N-glikozydowe
 - II-3. Wiązanie S-glikozydowe
- III. Metody izolowania łańcuchów oligosacharydowych z glikoprotein (glikopeptydów)
 - III-1. Łagodna degradacja alkaliczna
 - III-2. Drastyczna degradacja alkaliczna
 - III-3. Trójfluoroacetoliza
 - III-4. Hydrazynoliza
 - III-5. Zastosowanie endoglikozydaz
- IV. Metody badania struktury łańcuchów cukrowych
 - IV-1. Oznaczanie składu cukrowego oligosacharydów
 - IV-2. Analiza metylacyjna
 - IV-3. Utlenianie nadjodanem, degradacja Smitha
 - IV-4. Acetoliza i częściowa hydroliza kwaśna
 - IV-5. N-deacetylacja—deaminacja
 - IV-6. Metody enzymatyczne
 - IV-7. Metody chemiczne i optyczne
 - IV-8. Znakowanie izotopami promieniotwórczymi
 - IV-9. Oddziaływanie z lektynami
 - IV-10. Spektrometria masowa i magnetyczny rezonans jądrowy
- V. Ogólne dane o strukturze łańcuchów cukrowych glikoprotein

*) Dr, Zakład Immunochemii, Instytut Immunologii i Terapii Dośw., PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

Wykaz stosowanych skrótów: Gal — galaktoza, Man — mannoza, Fuc — fukoza, Glc — glukoza, GlcNAc — N-acetyloglukozoamina, GalNAc — N-acetylogalaktozoamina, NeuAc — kwas N-acetyloneuraminowy, NeuGc — kwas N-glikoloneuraminowy, Xyl — ksylloza, Ara — arabinoza, β -HO-Phe — β -hydroksyfenyloalanina, β -HO-Tyr — β -hydroksytyrozyna, Hyl — hydrolizyna.

- VI. Struktury złożonych oligosacharydów N-glikozydowych, podane w literaturze
 VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction**
II. Sugar-amino acid linkages; types of glycoprotein oligosaccharides
 II-1. O-glycosidic linkage
 II-2. N-glycosidic linkage
 II-3. S-glycosidic linkage
III. Methods for isolation of oligosaccharide chains from glycoproteins (glycopeptides)
 III-1. Mild alkaline degradation
 III-2. Strong alkaline degradation
 III-3. Trifluoroacetolysis
 III-4. Hydrazinolysis
 III-5. Use of endoglycosidases
IV. Methods for investigation of the structure of sugar chains
 IV-1. Estimation of sugar composition of oligosaccharides
 IV-2. Methylation analysis
 IV-3. Periodate oxidation, Smith degradation
 IV-4. Acetolysis and partial acid hydrolysis
 IV-5. N-deacetylation—deamination
 IV-6. Enzymatic methods
 IV-7. Chemical and optical methods
 IV-8. Labeling with radioisotopes
 IV-9. Interactions with lectins
 IV-10. Mass spectrometry and nuclear magnetic resonance
V. General data on the structure of glycoprotein sugar chains
VI. Structures of complex-type N-glycosidic oligosaccharides, described in literature
VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Jedną z ważnych modyfikacji chemicznych, jakim ulegają cząsteczki białek „*in vivo*”, jest glikozylacja (1). Aby dokładnie poznać budowę tak powstałych związków, zwanych glikoproteinami, należy określić strukturę łańcucha polipeptydowego oraz strukturę przyłączonych do niego łańcuchów cukrowych. W niniejszej pracy opisano typy łańcuchów cukrowych występujących w glikoproteinach oraz przedstawiono metody, które służą do badania struktury takich biopolimerów.

II. Rodzaje wiązań chemicznych cukier—aminokwas; typy oligosacharydów w glikoproteinach

II-1. Wiązanie O-glikozydowe

W bezpośrednim wiązaniu oligosacharydu z łańcuchem polipeptydowym bierze udział reszta monocukrowa, poprzez atom węgla C-1, oraz

grupa funkcyjna reszty aminokwasowej. W oligosacharydach związanych O-glikozydowo, tzn. przez mostek tlenowy, znaleziono różne układy monocukier—aminokwas; wśród nich najczęściej spotyka się układ, w którym N-acetylogalaktozoamina jest związana z seryną lub treoniną. Poniżej przedstawiono schematycznie struktury wiązania O-glikozydowego, z podaniem miejsca ich występowania (X oznacza składnik nieznany):

...GalNAc-O-Ser(Thr)	glikoproteiny ludzkie i zwierzęce (2, 3)
...Gal-O-Hyl	kolagen, błony podstawowe (2, 3)
...Gal-O-Ser(Thr)	
...Man-O-Ser(Thr)	
...Xyl-O-Ser(Thr)	
...Ara-O-Hyp	
...Gal-O-Hyp	rośliny i bakterie (2, 3)
...Fuc-O-Thr	mocz ludzki (4)
NeuAc-O-Tyr	owomukoid kurzy (5)
...X-O-β-HO-Phe	
...X-O-β-HO-Tyr	enzym grzybów roślinnych (6)
...Man-O-X	mózg szczura (7)

Oligosacharydy O-glikozydowe zawierają najczęściej do czterech monocukrów; w substancjach grupowych krwi występują tzw. megaloligosacharydy zawierające od 12 do 18 monocukrów (2, 3). Ostatnio, w mucynie o aktywności „Ii” z żołądka owcy stwierdzono nieznaną dotąd typ rozgałęzienia, w którym do redukującej reszty GalNAc są przyłączone dwie cząsteczki N-acetyloglukozoaminy wiązaniami $\beta 1 \rightarrow 3$ i $\beta 1 \rightarrow 6$ (8). Najczęściej spotykanymi składnikami oligosacharydów O-glikozydowych są galaktoza, N-acetylogalaktozoamina i kwas sjalowy; inne składniki to glukoza, N-acetyloglukozoamina i fukoza. Ksyloza, arabinoza i mannoza są składnikami rzadkimi, występującymi głównie w materiale pochodzenia roślinnego i bakteryjnego.

Wiązanie O-glikozydowe jest nietrwałe w łagodnym środowisku alkalicznym. Tę właściwość wykorzystuje się do izolowania łańcuchów oligosacharydowych (por. rozdz. III). Pewien wyjątek stanowi tu układ Glc→Gal→Hyl, spotykany w kolagenie i błonach podstawowych, gdyż jest on trwały nawet w drastycznych warunkach alkalicznych (9). Nie ustalono dotychczas, czy jest to uwarunkowane sekwencją polipeptydu wokół związanego z nim O-glikozydowo oligosacharydu. Wiadomo jedynie, że jeżeli galaktoza jest związana z hydroksylizyną, to układ aminokwasów wokół tego wiązania jest następujący: Gly—x—Hyl—Gly, gdzie x oznacza dowolny aminokwas (10).

Oligosacharydy O-glikozydowe nazywało się zwyczajowo „alkalilabilnymi”, zaś glikoproteiny zawierające takie oligosacharydy — „glikoproteinami typu mucyny”.

II-2. Wiązanie N-glikozydowe

Wiązanie tego typu występuje pomiędzy cząsteczką N-acetyloglukozaminy i resztą asparaginy (2, 3, 11, 12). Stwierdzono, że sekwencja polipeptydu wokół reszty Asn z przyłączonym oligosacharydem odpowiada strukturze —Asn—x—Ser(Thr)— (13—15). Oligosacharydy N-glikozydowe występujące u ssaków zawierają następujące monocukry: GlcNAc, Man, Gal, Fuc, NeuAc. W łańcuchach poliglikozydowych (16) oraz, co stwierdzono ostatnio, w hormonach luteinizujących krowy i owcy (17) występuje N-acetylogalaktozoamina. W roślinach istnieją oligosacharydy N-glikozydowe zawierające ksylozę (18).

Oligosacharydy N-glikozydowe nazywa się zwyczajowo „alkalistabilnymi” z powodu ich względnej odporności na degradację alkaliczną prowadzoną w łagodnych warunkach (19, 20). Glikoproteiny zawierające oligosacharydy N-glikozydowe określa się czasem jako glikoproteiny typu surowiczego (glikoproteiny osocza krwi zawierają bowiem oligosacharydy N-glikozydowe). Struktura oligosacharydów N-glikozydowych oraz ich podział ze względu na budowę są omówione w rozdz. V i VI.

II-3. Wiązanie S-glikozydowe

Wiązanie takie opisano dotychczas w dwóch przypadkach. Z moczu zdrowego człowieka wyizolowano glikopeptyd zawierający 8 aminokwasów, w którym dwusacharyd Gal-Gal był związany przez mostek siarczkowy z cysteiną (21). Szczegółów struktury dwusacharydu nie podano. W tym samym 1971 roku doniesiono o występowaniu w ludzkich erytrocytach glikopeptydu zawierającego trójsacharyd Glc-Glc-Glc związany z cysteiną (22). Ponieważ w organizmach ssaków, w tym także u człowieka, stwierdzono istnienie tioglikozydaz (23) wydaje się, że wymienione tutaj dwa glikopeptydy mogą być substratami dla takich enzymów.

III. Metody izolowania łańcuchów oligosacharydowych z glikoprotein (glikopeptydów)

Analiza struktury glikoproteiny wymaga ustalenia sekwencji polipeptydu oraz ustalenia budowy łańcuchów oligosacharydowych. Ponieważ w cząsteczce glikoproteiny mogą występować różne oligosacharydy, istnieje konieczność oddzielenia ich od części białkowej, a następnie rozdzielenia, przed przystąpieniem do badań strukturalnych. Wolne oligosacharydy można izolować według jednej z dwóch zasad:

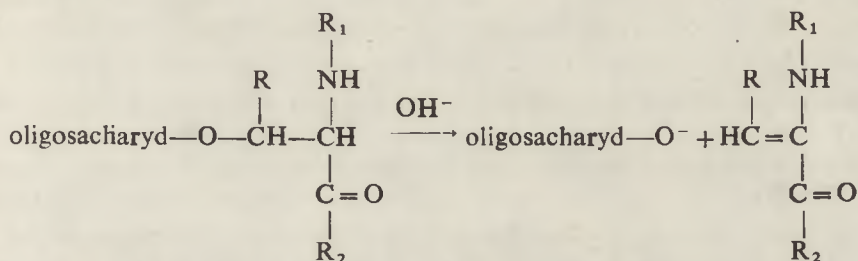
— niszczenie łańcucha polipeptydowego, z wykorzystaniem różnic w trwałości wiązań peptydowych i glikozydowych (hydrazynoliza, drastyczna degradacja alkaliczna, trójfluoroacetyliza),

— selektywne odszczepienie oligosacharydów (β -eliminacja łańcuchów O-glikozydowych, trawienie endoglikozydazami).

Należy dodać, że popularną metodą jest także trawienie glikoproteiny proteazami. Metoda taka daje najlepsze wyniki tylko wtedy, gdy można uzyskać glikopeptydy zawierające po jednym łańcuchu oligosacharydowym. Nie jest to na ogół możliwe w przypadku glikoprotein „gęsto” uglikozylowanych. Poniżej podano metody, które stosuje się do izolowania wolnych oligosacharydów z białek.

III-1. Łagodna degradacja alkaliczna

Jest to metoda, która służy do izolowania z części białkowej oligosacharydów O-glikozydowych; są one oddzielane od polipeptydu w reakcji β -eliminacji:



W wyniku reakcji powstaje anion (z części oligosacharydowej) oraz pochodna nienasycona aminokwasu. Z seryny powstaje dehydroalanina (kwas α -aminoakrylowy), z treoniny — kwas α -aminokrotonowy. Powstały anion, który można traktować jako jon bardzo słabego kwasu, ulega natychmiast protonowaniu i daje w konsekwencji oligosacharyd zakończony cukrem redukującym. W warunkach alkalicznych, w jakich zachodzi przedstawiona tu β -eliminacja, oligosacharyd mógłby ulec dalszej degradacji (tzw. „*peeling reactions*”). Aby temu zapobiec prowadzi się degradację alkaliczną w obecności czynnika redukującego, borowodoru sodu. W takim wypadku powstający cukier z wolną grupą aldehydową ulega natychmiast redukcji do alditolu, co zapobiega dalszej degradacji oligosacharydu (24, 25). Równocześnie redukcji ulega dehydroalanina, przechodząc w alaninę oraz kwas α -aminokrotonowy, przechodząc w kwas α -aminomasłowy. Obecnie dla łagodnej degradacji alkalicznej stosowane są najczęściej warunki podane przez Carlsona (26) oraz Iyera i Carlsona (27): 1 M NaBH_4 w 0.05 M NaOH , temperatura 50°C , 16 godzin. Ostatnio przeprowadzono ilościową analizę procesu degradacji alkalicznej, stosując trytowany borowodorek sodu (28).

Łagodną degradację alkaliczną często stosuje się do badania łańcuchów O-glikozydowych glikoprotein (29—33).

Uwaga. Wg opisanej tu metody ulega częściowej degradacji łańcuch polipeptydowy glikoproteiny (glikopeptydu). Ostatnio potwierdzono również uprzednie doniesienia (34), że w warunkach łagodnej degradacji alkalicznej mogą ulegać odszczepieniu od łańcucha peptydowego także oligosacharydy N-glikozydowe (19, 20). Dlatego też łagodnej degradacji alkalicznej nie można stosować bez zastrzeżeń jako metody do rozróżniania dwóch typów wiązania białko-cukier: O- lub N-glikozydowego.

III-2. Drastyczna degradacja alkaliczna

O możliwości zastosowania stężonych alkaliów do rozerwania wiązania GlcNAc-Asn doniesiono w 1971 r. (35). W rok później podano warunki reakcji, które są obecnie często stosowane: 1 M NaOH — 1 M NaBH₄, 100°C, 4—6 godzin (36). Uważa się, że działanie silnych alkaliów na wiązanie N-glikozydowe jest reakcją hydrolizy, a nie β-eliminacji (37). Podano też jeden z prawdopodobnych mechanizmów tej reakcji, połączonej z redukcją: produktem przejściowym, powstałym z reszty N-acetyloglukozoaminy, jest reszta 1-amino-GlcNAc, a produktem końcowym, powstałym z reszty asparaginy, jest homoseryna (34).

W warunkach drastycznej degradacji alkalicznej zniszczeniu ulega łańcuch polipeptydowy; w obecności borowodoru sodu uwolnione oligosacharydy N-glikozydowe uzyskuje się w postaci zredukowanej, acetamido-deoxy cukry ulegają N-deacetylacji (38). Badania przeprowadzone na związkach modelowych wykazały, że nawet w 2,5 M NaOH żadna inna modyfikacja bądź degradacja reszt monocukrowych nie zachodzi (39, 40). Reszty NeuAc obecne w oligosacharydzie nie ulegają zniszczeniu (41, 42).

W pewnych przypadkach, co zależy prawdopodobnie od sekwencji peptydu wokół reszty Asn z przyłączonym oligosacharydem N-glikozydowym, wiązanie GlcNAc-Asn nie ulega rozerwaniu i w wyniku reakcji uzyskuje się glikopeptyd zawierający kilka aminokwasów (37). Stwierdzono, że w warunkach drastycznej degradacji alkalicznej glikoproteiny M ludzkich erytrocytów (2 M NaOH — 2 M NaBH₄, 100°C, 3 godziny) uzyskuje się N-glikozydowe oligosacharydy przyłączone do reszty asparaginy (41).

Metoda drastycznej degradacji alkalicznej bywa stosowana do izolowania oligosacharydów N-glikozydowych w celu badania ich struktury (16, 42—44).

III-3. Trójfluoroacetyliza

Polega ona na traktowaniu badanego materiału roztworem kwasu trójfluorooctowego (TFA) i bezwodnika tego kwasu (TFAA) w temperaturze 100°C. Stosowany zakres proporcji TFA/TFAA waha się od 1 : 1 do 1 : 50 (45). Badania Svenssona i wsp. przeprowadzone na związkach modelowych (46—50) oraz odszajowanej fetuinie (51) pozwoliły ustalić, ja-

kim zmianom ulega glikoproteina podczas trójfluoroacetolizy. Niszczony jest, na drodze trans-amidacji, łańcuch polipeptydowy; równocześnie uwalniane zostają oligosacharydy N-glikozydowe (również na drodze trans-amidacji) i O-glikozydowe (na drodze β -eliminacji katalizowanej przez kwas (52)). Wolne oligosacharydy pozostają w roztworze w postaci pochodnych O- i N-trójfluorooctowych. Po odblokowaniu grup -OH i -NH₂, np. wodą amoniakalną w metanolu (53), materiał poddaje się N-acetylacji. Oligosacharydy N-glikozydowe ulegają podczas trójfluoroacetolizy degradacji od końca redukującego. Całkowicie są niszczone reszty N-acetyloglukozoaminy, następna reszta — β -mannozowa jest odporna na degradację, jeżeli ma podstawniki na węglach C-3 i C-6 lub ulega zniszczeniu w ok. 50%, jeżeli ma trzy podstawniki (na węglach C-3, C-4, C-6). Następne reszty cukrowe, znajdujące się za β -mannozą w stronę zakończeń nieredukujących łańcucha, mogą ulegać dalszej degradacji w zależności od sposobu ich podstawienia. Znając stopień tej degradacji, badany podczas trójfluoroacetolizy częściowo metylowanych α -metylo glukozydów (46), można na podstawie wyników analizy ustalić strukturę natywnego oligosacharydu (33, 51). Podczas trójfluoroacetolizy ulegają zniszczeniu reszty kwasu sjałowego przyłączone do węgla C-6 galaktozy, reszty przyłączone do węgla C-3 nie degradują się (54). Wobec tego badania związków cukrowych z użyciem trójfluoroacetolizy prowadzi się często po ich uprzednim odszaleniu.

Trójfluoroacetoliza pozwala izolować oligosacharydy z glikoprotein, a także z glikolipidów (45). Działając roztworem TFA-TFAA na materiał biologiczny (np. komórki) uzyskuje się niejako „ekstrakcję” oligosacharydów, które można następnie wydzielić z mieszaniny reakcyjnej w stanie czystym (55). W ten sposób wydzielono już oligosacharydy z membran ludzkich erytrocytów i dla kilku z nich, m.in. o aktywności grupowej P, potwierdzono znane struktury (56).

III-4. Hydrazynoliza

Hydrazynę zastosowano po raz pierwszy w chemii białek w roku 1952 używając jej do oznaczania C-końcowego aminokwasu łańcucha polipeptydowego (57). W procesie hydrazynolizy łańcuch polipeptydowy ulega degradacji. Metoda nadawała się zatem potencjalnie do wydzielania oligosacharydów pozbawionych części białkowej, pod warunkiem jednak, że nie ulegają one zniszczeniu na skutek działania hydrazyny. Wyniki początkowych badań w tym zakresie nie były zachęcające. Stosując hydrazynę do N-deacetylacji siarczanów chondroityny (58, 59) stwierdzono znaczne rozszczepianie wiązań glikozydowych. Dalsze badania wpływu hydrazyny na cukry przeprowadzono na glikoproteinach zawierających oligosacharydy O-glikozydowe (60—64). Stwierdzono, że grzanie tych substancji w bezwodnej hydrazynie w temperaturze 100°C powoduje znisz-

czenie reszt kwasu sjałowego oraz częściową degradację cukrów neutralnych i heksozoamin. Z aminocukrów w większym stopniu degradowała się N-acetylogalaktozoamina, w porównaniu z N-acetyloglukozoaminą; w czasie reakcji ulegały one N-deacetylacji. Jednak już w 1966 r. Y o s i z a w a i wsp. donieśli o wydzieleniu z glikoprotein oligosacharydów N-glikozydowych w stanie prawie nienaruszonym; hydrazynolizę prowadzono wówczas w obecności katalizatora — siarczanu hydrazyny (65).

Obecnie hydrazynolizie poddaje się glikoproteiny i glikolipidy, w różnym celu:

- a) do oznaczania C-końcowego aminokwasu w białku (66),
- b) do oznaczania grup N- i O-acetylowych (67),
- c) do N-deacetylacji heksozoamin (68—70),
- d) do wydzielenia oligosacharydów N-glikozydowych z glikoprotein (41, 71—79).

W wymienionych powyżej przypadkach stosuje się bezwodną hydrazynę, wodzian hydrazyny lub bezwodną hydrazynę z dodatkiem siarczanu hydrazyny, w temperaturze od 80°C do 105°C. Stosowano też hydrazynę w temperaturze wrzenia (113, 5°C) (80).

Wyniki uzyskane w doświadczeniach, w których stosowano hydrazynolizę, pozwoliły ustalić, jaki jest wpływ hydrazyny na związki cukrowe. Wnioski z tych badań można przedstawić następująco:

a) hydrazynoliza powoduje N-deacetylację heksozoamin. Dodatek siarczanu hydrazyny znacznie polepsza wydajność tej reakcji, np. dla związków modelowych reakcja zachodziła ilościowo (39, 40),

b) hydrazynoliza umożliwia izolowanie niezdegradowanych oligosacharydów N-glikozydowych z glikoprotein. Reszty kwasu sjałowego (75, 81) oraz reszty cukrów neutralnych (39, 40) w tych oligosacharydach nie ulegają żadnej zmianie. Jedynie około 40% reszt redukującej N-acetyloglukozoaminy ulega w czasie hydrazynolizy modyfikacji chemicznej (72, 82). Ostatnio S a e e d i W i l l i a m s (83) opisali produkty hydrazynolizy dwóch związków modelowych. Jeden z nich, GlcNAc β 1→Asn, odpowiada układowi występującemu w glikoproteinach. Autorzy stwierdzili, że podczas hydrazynolizy tego związku reszta GlcNAc ulega N-deacetylacji oraz wchodzi w reakcję z hydrazyną. Produkty reakcji (hydrazon i hydrazyd) w łagodnych warunkach kwaśnych ulegają przemianie w GlcNH₂, lecz proces ten nie zachodzi ilościowo. Odzysk glukozoaminy zaangażowanej w wiązanie z asparaginą nie jest więc całkowity i wynosi ok. 60—70%, co pozostaje w zgodzie z wynikami podanymi wcześniej (72, 82).

III-5. Zastosowanie endoglikozydaz

Glikopeptydaza. Od kilkunastu lat znany jest enzym, 4'-L-aspartylglikozyloaminoamidohydrolaza, występujący w roślinach, bakteriach, tkankach zwierzęcych, który hydrolizuje wiązanie N-glikozydowe pmię-

dzy niepodstawioną resztą asparaginy i mono(oligo)sacharydem (84). W roku 1977 Takahashi wykrył inny enzym, występujący w migdałach, mający zdolność hydrolizowania wiązania między oligosacharydem i asparaginą w krótkich glikopeptydach (85). Po dokładniejszym zbadaniu jego właściwości (86) okazało się, że enzym ten hydrolizuje wiązanie GlcNAc-Asn w glikopeptydach zawierających od 3 do 11 aminokwasów. Glikopeptydy te pochodziły z trzech różnych źródeł: z bromelainy pnia ananasa, albuminy jaja kurzego i transferyny jaja kurzego. Opisany enzym, glikopeptydaza, uwalniał nienaruszone oligosacharydy, a reszta asparaginy ulegała przemianie do kwasu asparaginowego. Przypuszcza się, że mechanizm reakcji jest podobny do mechanizmu reakcji opisanego wcześniej w przypadku amidohydrolazy. Produktem przejściowym jest tu oligosacharyd-1-amino GlcNAc, który rozpada się w reakcji z wodą na oligosacharyd-GlcNAc i NH_3 . Z opublikowanych dotychczas prac nie wynika, aby glikopeptydaza była uniwersalnym enzymem do uwalniania oligosacharydów N-glikozydowych z glikoprotein. Nie wiadomo na przykład, czy może ona odszczepiać z glikopeptydu oligosacharydy zawierające kwas sjałowy. Jednak w pewnych przypadkach glikopeptydaza ta jest przydatna; opisano już dokładną strukturę oligosacharydów, wydzielonych przy użyciu tego enzymu (18).

Endo- α -N-acetylogalaktozaminidaza. Obecność tego enzymu stwierdzono po raz pierwszy badając egzo-glikozydazy zawarte w hodowli bakterii *Clostridium perfringens* (87). Później wydzielono ten enzym z płynnej pożywki z hodowlą bakterii *Diplococcus pneumoniae* (88) i zbadano jego aktywność i specyficzność (89). Stwierdzono, że endo- α -N-acetylogalaktozaminidaza uwalnia z glikoprotein dwusacharyd Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, który jest połączony wiązaniem O-glikozydowym z resztą seryny lub treoniny. Podstawienie dwusacharydu jakimkolwiek monocukrem uniemożliwia odszczepienie go od polipeptydu przez enzym (90), zaś wiązanie pomiędzy resztą GalNAc i aglikonem musi mieć anomerię α . Odszczepienie dwusacharydu (reakcja hydrolizy) nie wpływa na część białkową.

Endo- β -N-acetyloglukozaminidaza. Enzym ten wykryto po raz pierwszy w płynnej pożywce zawierającej hodowlę bakterii *Diplococcus pneumoniae* (91). Później stwierdzono jego obecność w materiale pochodzenia roślinnego, bakteryjnego i zwierzęcego. Obecnie znanych jest 6 rodzajów endo- β -N-acetyloglukozaminidazy: D, H, C_I, C_{II}, L, B (90, 92, 93); różnią się one specyficznością wobec substratu. Każdy z tych enzymów działa na glikopeptyd (glikoproteinę), hydrolizując wiązanie pomiędzy dwiema resztami GlcNAc tworzącymi w oligosacharydzie N-glikozydowym układ N,N'-diacetylchitobiozowy. W wyniku reakcji jedna reszta GlcNAc pozostaje przy łańcuchu peptydowym, a nienaruszony w swej pozostałej części oligosacharyd N-glikozydowy jest uwalniany.

Chemiczne metody stosowane do wydzielania łańcuchów cukrowych z glikoprotein powodują zniszczenie części peptydowej; otrzymanie nie-

podstawionego łańcucha polipeptydowego wymagało dotychczas degradacji części cukrowej glikoproteiny. Wykrycie endoglikozydaz spowodowało nową, korzystną sytuację w badaniach struktury glikoprotein: z cząsteczki natywnej można uzyskać osobno część cukrową i białkową, obie w postaci niemal nienaruszonej.

IV. Metody badania struktury łańcuchów cukrowych

Analiza struktury łańcucha oligo- lub polisacharydowego wymaga ustalenia wielu danych. Dotyczą one:

a) rodzaju reszt monocukrowych oraz sposobu ich związania w łańcuchu. Ponieważ cząsteczka monocukru posiada kilka grup funkcyjnych, dwie reszty cukrowe mogą wiązać się ze sobą na wiele różnych sposobów; może też występować rozgałęzienie łańcucha na reszcie cukrowej,

b) stopnia polimeryzacji łańcucha cukrowego. Dla danych proporcji ilościowych składników łańcucha cukrowego stopień polimeryzacji może być różny,

c) rodzaju pierścienia (furanozowy lub piranozowy), jaki tworzy poszczególne reszta cukrowa w łańcuchu,

d) anomerii wiązań glikozydowych (α lub β) oraz konfiguracji monocukrów (D lub L).

Poniżej przedstawiono metody, które stosuje się w celu oznaczenia struktury łańcuchów cukrowych.

IV-1. Oznaczanie składu cukrowego oligosacharydów (94—97)

Przed oznaczaniem składu cukrowego poddaje się oligosacharyd hydrolizie kwaśnej. Prowadzi się ją w różnych warunkach temperatury i czasu, w kwasach mineralnych (HCl, H₂SO₄) lub organicznych (HCOOH, CH₃COOH, TFA). Do rozbicia łańcucha cukrowego stosuje się też metanolizę, która stwarza bardziej zachowawcze warunki dla uwolnionych monocukrów (98). Dobre wyniki w ustalaniu składu cukrowego poli/glikozylo/ceramidów uzyskano stosując acetolizę (99). Ogólnie biorąc — dobór warunków hydrolizy przeprowadza się doświadczalnie dla danego materiału.

Ilościowe oznaczenie uwolnionych monocukrów przeprowadza się najczęściej stosując chromatografię gazowo-cieczową (GLC), a także metody kolorymetryczne lub enzymatyczne. Aminocukry oznacza się również w analizatorze aminokwasów. Identyfikację poszczególnych cukrów przeprowadza się przez porównanie ich ze standardami w różnych metodach chromatografii lub elektroforezy. Najpewniejszą identyfikację zapewnia metoda spektrometrii masowej (100).

IV-2. Analiza metylacyjna

Jest to, stosowana obecnie powszechnie, dokładna metoda określania miejsc podstawienia monocukrów w łańcuchu oligo- lub polisacharydowym. Daje ona informację o tym, jakie jednostki strukturalne występują w łańcuchu cukrowym, nie mówi jednak o ich sekwencji ani o anomerii wiązań glikozydowych (101, 102). W celu przeprowadzenia analizy metylacyjnej badany łańcuch cukrowy poddaje się permetylacji (103, 104), tzn. chemicznemu napiętnowaniu wszystkich wolnych grup hydroksylowych, obecnych w resztach cukrowych, grupami metylowymi (ostatnio opracowano modyfikację permetylacji, która znacznie polepsza czystość chromatogramów (105, 106)). Po hydrolizie i redukcji borowodorkiem sodu, jednostki monocukrowe poddaje się wyczerpującej acetylacji. W reakcji tej zostają napiętnowane resztami acetylowymi wolne grupy -OH, które w materiale natywnym brały udział w wiązaniu glikozydowym. Otrzymane na tym etapie pochodne cukrów są lotne. Rozdziela się je metodą chromatografii gazowo-cieczowej, a następnie identyfikuje. Pełną identyfikację pochodnych metylowych monocukrów uzyskuje się w spektrometrze masowym, sprzężonym z chromatografem gazowym.

Widma masowe częściowo zmetylowanych octanów alditoli powstają według określonych, poznanych już dość dobrze reguł fragmentacji (107). Cechą charakterystyczną tych widm jest to, że nie zawierają one jonu molekularnego, tzn. jonu powstałego przez zjonizowanie całej, niezdegradowanej cząsteczki. Poza tym, widma dwóch izomerów przestrzennych tak samo podstawionych, np. galaktozy i mannozy, są praktycznie takie same. W związku z tym na podstawie widma masowego określa się, z jaką pochodną metylową monocukru mamy do czynienia. Rodzaj tego monocukru ustala się przez porównanie czasów retencji pochodnej i standardów w chromatografii gazowo-cieczowej.

Oznaczenie składu cukrowego oraz wykonanie analizy metylacyjnej dla kilkucukrowych oligosacharydów umożliwia ustalenie ich struktury. Dla większych łańcuchów cukrowych stosuje się dodatkowo inne metody, powodujące rozszczepienie oligosacharydu na mniejsze, łatwiej dające się analizować fragmenty. Metody te opisano poniżej.

IV-3. Utlenianie nadjodanem, degradacja Smitha

Utlenianie nadjodanem jest jedną z najpowszechniej stosowanych reakcji w chemii cukrów (108). Reakcję tę wykrył w 1928 r. M a l a p r a d e (109). Polega ona na tym, że kwas nadjodowy HJO_4 lub jego sole utleniają dwa sąsiednie atomy węgla w cząsteczce, zawierające wicinalne, niepodstawione grupy -OH lub grupy -OH i $-NH_2$. W wyniku działania nadjodanu zostaje rozerwane wiązanie pomiędzy utlenionymi atomami węgla,

na których powstają grupy aldehydowe. Po utlenieniu często stosuje się redukcję borowodorkiem sodu, aby uniknąć reakcji ubocznych zachodzących przy udziale grup aldehydowych. Dużą zaletą metody jest to, że utlenienie, prowadzone w odpowiednich warunkach (4°C, ciemność), zachodzi ilościowo. Kontrolując zatem zużycie nadjodanu przez pomiar absorpcji roztworu przy 223 nm, można śledzić przebieg reakcji (110).

Duży postęp w zastosowaniu utleniania nadjodanem do badań strukturalnych łańcuchów cukrowych przyniosło stwierdzenie, że utlenione nadjodanem i zredukowane borowodorkiem sodu reszty cukrowe ulegają odszczepieniu w łagodnych warunkach kwaśnych, nie naruszających innych wiązań glikozydowych. Na tym polega tzw. degradacja Smitha (111). Jest to metoda, która obejmuje utlenianie nadjodanem, redukcję borowodorkiem sodu powstałych grup aldehydowych oraz usuwanie utlenionych-zredukowanych monocukrów w warunkach łagodnej hydrolizy kwaśnej. Cykl degradacji Smitha można prowadzić na danym materiale kolejno kilka razy, usuwając w ten sposób duży procent cukrów lub niemal wszystkie cukry z glikoproteiny i nie naruszając zasadniczo struktury łańcucha polipeptydowego (112).

Badając podatność danego łańcucha cukrowego na utlenianie nadjodanem oraz oznaczając drobnocząsteczkowe fragmenty powstałe w wyniku degradacji Smitha (HCOOH, C₂-C₄ poliole, glikolaldehid, gliceraldehid), można uzyskać konkretne informacje dotyczące sposobu podstawienia i sekwencji monocukrów w łańcuchu oligo- lub polisacharydowym (113).

IV-4. Acetoliza i częściowa hydroliza kwaśna

Są to metody chemiczne, które służą do częściowego rozszczepiania łańcuchów cukrowych. Wykorzystuje się tutaj różną odporność wiązań glikozydowych na degradację, w zależności od rodzaju reszt monocukrowych i atomów węgla, zaangażowanych w dane wiązanie. Acetoliza jest prowadzona najczęściej w roztworze bezwodnika octowego w kwasie siarkowym; stosuje się także inne układy reagentów (114). Najbardziej podatne na acetolizę są wiązania glikozydowe 1→6. W wyniku reakcji otrzymuje się peracetylowane mono- i oligosacharydy, które po de-O-acetylacji można rozdzielić w chromatografii kolumnowej, bibułowej lub cienkowarstwowej. Chromatografia bibułowa pozwala uzyskać „mapy oligosacharydów”; służą one do badań porównawczych lub do izolowania w stanie czystym poszczególnych oligosacharydów (115). Ostatnio opisano analizę oligosacharydów, otrzymanych przez acetolizę związków cukrowych, z zastosowaniem metody GLC-MS (116).

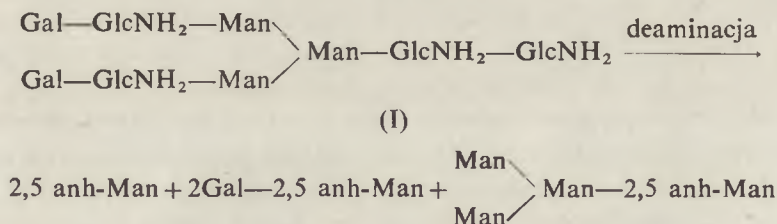
W procesie częściowej hydrolizy kwaśnej, przeciwnie niż podczas acetolizy, najtrwalsze są wiązania glikozydowe 1→6. W wyniku reakcji pro-

wadzonej w różnych warunkach stężenia kwasu, temperatury i czasu uzyskuje się z badanego łańcucha cukrowego mono- i oligosacharydy, co wskazuje na różnice w trwałości poszczególnych wiązań glikozydowych (117). Oligosacharydy te poddaje się rozdziałowi w chromatografii bibułowej i identyfikuje.

W przypadku dużych łańcuchów cukrowych obie opisane tutaj metody można stosować równocześnie, bowiem analiza małych fragmentów jest znacznie prostsza niż analiza całego polisacharydu. Porównując oligosacharydy otrzymane dwiema podanymi tu metodami, można uzyskać dane o sekwencji badanego łańcucha cukrowego. Pewną standaryzację takiej metody przeprowadzono w pracowni *Montreuil* (115).

IV-5. N-deacetylacja — deaminacja

Jest to jedna z metod selektywnego rozszczepiania wiązań glikozydowych, dotyczy ona wiązania przy węglu C-1 aminocukru. Stosuje się ją głównie do badania oligosacharydów N-glikozydowych. Łańcuch cukrowy poddaje się najpierw N-deacetylacji, najczęściej metodą hydrazynolizy, ale także metodą drastycznej degradacji alkalicznej (118). Następnie wykonuje się deaminację kwasem azotawym, w czasie której reszty glukoaminy przekształcają się w reszty 2,5-anhydromannozy (119, 120). Metoda hydrazynolizy — deaminacji, zastosowana w analizie złożonego oligosacharydu N-glikozydowego (I), daje trzy związki. Można je rozdzielić w chromatografii bibułowej i oddzielnie zidentyfikować:



Metodę hydrazynolizy—deaminacji również wystandaryzowano w pracowni *Montreuil* (115, 121).

IV-6. Metody enzymatyczne (90)

Do badania struktury łańcuchów cukrowych są stosowane egzoglikozydazy i endoglikozydazy. Pierwsze mają zdolność odszczepiania pojedynczych cząsteczek cukrów z końca nieredukującego, drugie hydrolizują wiązania glikozydowe wewnątrz łańcucha cukrowego lub wiązania pomiędzy oligosacharydem i polipeptydem (por. rozdz. III-5). Egzoglikozydazy odszczepiają cząsteczkę danego cukru pod warunkiem, że ma ona

wymaganą dla enzymu konfigurację podstawników przy węglu anome-rycznym. Znając specyficzność glikozydaz można degradować łańcuch cu-krowy kolejnymi etapami, uzyskując dane o sekwencji cukrów i anomerii wiązań glikozydowych. Użycie enzymów do badania struktury łańcuchów cukrowych wiąże się z pewnymi trudnościami, a mianowicie:

- a) stosowany enzym powinien być dobrze oczyszczony, tzn. wolny od innych aktywności glikozydazowych,
- b) substrat musi spełniać określone wymogi strukturalne.

Po enzymatycznym odszczepieniu mono- lub oligosacharydu(ów) prze-prowadza się ich identyfikację i oznaczenie ilościowe. Analizuje się także drugi produkt reakcji, tzn. łańcuch zmniejszony o uwolnione cukry.

IV-7. Metody chemiczne i optyczne

Znaną metodą chemiczną, stosowaną do oznaczania anomerii wiązań glikozydowych, jest utlenianie przy użyciu CrO_3 (122). Polega ona na tym, że oligosacharyd jest redukowany, następnie wyczerpująco acetylowany i traktowany trójtlenkiem chromu w kwasie octowym, w obecności stan-dardu wewnętrznego. Cząsteczki cukrów, które występują w oligosacha-rydzie jako anomery β , ulegają w tych warunkach utlenieniu. Cukry o anomerii α są utleniane słabo lub w ogóle nie ulegają zmianie. Przez porównanie składu oligosacharydu natywnego i utlenionego można wnio-skować o anomerii poszczególnych reszt monocukrowych (113).

Inną metodą oznaczania anomerii wiązań glikozydowych jest polary-metria. H u d s o n (123) podał reguły służące do określania anomerii mo-nocukrów w łańcuchu na podstawie pomiaru skręcalności optycznej roz-tworu danego oligosacharydu. Metodę stosuje się z powodzeniem jedynie w odniesieniu do kilkucukrowych oligosacharydów.

W 1965 r. zaobserwowano efekt Cottona w oligosacharydach zawiera-jących chromofory amidowe (124). Dało to początek zastosowania metody dyspersji skręcalności optycznej (ORD) i dichroizmu kołowego (CD) do badania struktury oligosacharydów zawierających reszty NeuAc (125) lub reszty N-acetylowanych heksozoamin (126). Widma ORD i CD takich oli-gosacharydów dają informację o anomerii wiązań i sposobie podstawienia reszt cukrowych. Opublikowano również pracę o zastosowaniu spektro-skopii w podczerwieni (IR) do określania anomerii wiązania glikozydowe-go. Do badań użyto glikozydów metylowych oraz dwucukrów (127).

IV-8. Znakowanie izotopami promieniotwórczymi

W punkcie tym przedstawiono możliwości napiętnowania izotopem promieniotwórczym reszt monocukrowych, zajmujących określoną pozy-cję w łańcuchu. Napiętnowany monocukier identyfikuje się po hydrolizie łańcucha cukrowego. Traktowanie nadjodanem powoduje utlenienie resz-

ty cukrowej znajdującej się na końcu nieredukującym oligosacharydu oraz utlenienie określonych reszt cukrowych wewnątrz łańcucha. Mogą nimi być monopodstawione reszty cukrów neutralnych lub N-deacetylowanych heksozamin, nie podstawione na węglu C-3 (podstawienie na C-3 zabezpiecza cząsteczkę cukru w formie pierścieniowej przed utlenieniem nadjodanem). Jeżeli grupy aldehydowe uzyskane w wyniku działania nadjodanu podda się redukcji przy użyciu $\text{NaB}(\text{H})_4$, wówczas uzyskuje się wbudowanie do oligosacharydu atomu(ów) trytu. W taki sposób najczęściej przeprowadza się znakowanie reszt kwasu sjałowego (128). Reszty galaktozy i N-acetylogalaktozami, znajdujące się na końcu nieredukującym łańcucha cukrowego, można napiętnować trytem także w inny sposób — utleniając je oksydazą galaktozy. Redukcja uzyskanych pochodnych przy użyciu $\text{NaB}(\text{H})_4$ daje w wyniku trytowany oligosacharyd (129, 130).

Piętnowanie reszt cukrowych, zajmujących określoną pozycję w łańcuchu, dotyczy również końca redukującego oligosacharydu. Resztę monocukrową znajdującą się na tym końcu można zmodyfikować stosując popularny czynnik redukujący — NaBH_4 , który może zawierać jeden z trzech izotopów wodoru: prot(H), deuter(D) lub tryt(T). Jeżeli do reakcji użyje się NaBH_4 , wówczas identyfikację monocukru z końca redukującego można przeprowadzić stosując elektroforezę wysokonapięciową na bibule (HVE) w buforze boranowym (131). Jeżeli do reakcji użyto NaBD_4 , identyfikację monocukru można prowadzić metodą elektroforezy w buforze boranowym lub analizując materiał w spektrometrze masowym (132—134). Widmo masowe cukru redukującego zawiera wówczas fragmenty większe o jednostkę masy w porównaniu z analogicznymi fragmentami pozostałych cukrów łańcucha. Redukcję z użyciem NaBD_4 stosowano również do określenia sposobu podstawienia cukru redukującego w oligosacharydzie (135). Jeżeli redukcję przeprowadzono przy użyciu NaBT_4 , identyfikację cukru z końca redukującego oligosacharydu prowadzi się przez umiejscowienie aktywności trytu, wobec standardów cukrowych, w elektroforezie wysokonapięciowej w buforze boranowym (131). Inną, niż redukcja borowodorkiem, modyfikację cukru redukującego w wolnym oligosacharydzie można uzyskać za pomocą związku fluoryzującego. W tym celu stosowano, na przykład, 2-amino pirydynę (136—138).

Jeżeli w badaniach dysponuje się małymi ilościami materiału zawierającego reszty cukrowe, można napiętnować komponentę cukrową izotopem promieniotwórczym by następnie, monitorując ten izotop, śledzić badaną substancję w czasie preparatyki lub analiz. Na przykład oligosacharydy N-glikozydowe, wydzielone metodą hydrazynolizy, mają N-deacetylowane aminocukry. Można je acetylować używając bezwodnika octowego znakowanego izotopem węgla ^{14}C (71). Inny sposób to piętnowanie glikoprotein podczas ich biosyntezy przy użyciu znakowanych prekursorów metabolicznych, np. $(\text{H})\text{-Fuc}$, $(^{14}\text{C})\text{-GlcNAc}$ (139).

IV-9. Oddziaływanie z lektynami

Przez porównanie oddziaływania lektyny ze związkiem badanym i związkami cukrowymi o znanej budowie można uzyskać określone dane, dotyczące struktury łańcuchów cukrowych (140). Przydatność lektyn w tego typu badaniach jest tym większa, im lepiej poznana jest ich swoistość. Oddziaływanie lektyn ze związkami wysokocząsteczkowymi lub komórkami można oznaczać bezpośrednio metodą precypitacji, aglutynacji lub przez pomiar wiązania piętnowanych lektyn z komórkami. Aktywność związków niskocząsteczkowych wobec lektyn można oznaczać metodą hamowania którejs z wyżej wymienionych reakcji lub bezpośrednio metodą dializy równowagowej.

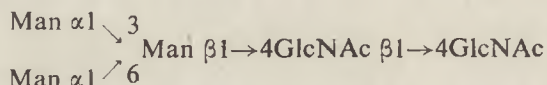
Szerokie zastosowanie mają też metody z użyciem unieruchomionych glikokoniugatów bądź lektyn. W chromatografii powinowactwa lektyna związana z nierozpuszczalnym nośnikiem stanowi wybiórczo działające wypełnienie kolumny, które może wiązać łańcuchy cukrowe o odpowiedniej budowie. W taki właśnie sposób, stosując konkanawalinę A, różnicuje się oligosacharydy N-glikozydowe pod względem liczby rozgałęzień (141, 142). W elektroforezie powinowactwa rozdział łańcuchów cukrowych odbywa się w żelu zawierającym odpowiednio dobraną lektynę.

Użycie lektyn w badaniach struktury łańcuchów cukrowych dostarcza informacji o obecności całych fragmentów łańcucha, z uwzględnieniem rodzaju monocukrów i wiązań, lub może wykluczyć obecność określonych struktur. Informacje te dotyczą najczęściej nieredukującego fragmentu łańcucha cukrowego, a w przypadku niektórych lektyn również jego fragmentu wewnętrznego.

IV-10. Spektrometria masowa (MS) i magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)

W badaniach łańcuchów cukrowych te nowoczesne metody analizy stosuje się ostatnio coraz powszechniej. Zaletą tych metod, oprócz dużej precyzji, jest to, że umożliwiają one ustalenie struktury oligosacharydu bez jego uprzedniej hydrolizy. Oligosacharyd można analizować bezpośrednio w spektrometrze masowym (143) lub stosując kombinację metod GLC-MS (144); magnetyczny rezonans jądrowy, którego zastosowanie w analizie cukrów szczególnie rozwinął Vliegenthart i wsp. (145), można również stosować jako metodę niezależną (146) lub w połączeniu ze spektrometrią masową (147). Informacje uzyskane z widma NMR protonów mówią nie tylko o anomerii wiązań glikozydowych, ale także o rodzaju monocukrów w łańcuchu i sposobie ich podstawienia (147, 148). Stosując połączone metody MS i NMR uzyskano ostatnio dane dotyczące typu monocukrów i ich sekwencji w dwunastocukrowym łańcuchu zawartym w glikolipidzie (149).

fragmentu najbliższego polipeptydowi. Fragment ten ma następującą budowę:



W zależności od rodzaju reszt cukrowych, przyłączonych do części rdzeniowej, dzieli się oligosacharydy N-glikozydowe na trzy grupy:

a) mannany. W tych łańcuchach cukrami przyłączonymi do części rdzeniowej są jedynie reszty α -mannozy. W sumie z cukrami fragmentu rdzeniowego występują one w liczbie do 8 (oligomannany), jedynie w materiale pochodzącym z bakterii lub grzybów (dobrze przebadane są drożdże) liczba ta może wynosić kilkanaście lub więcej (polimannany),

b) oligosacharydy złożone. W tych łańcuchach do części rdzeniowej są przyłączone reszty N-acetyloglukozoaminy, galaktozy, kwasu sjałowego, czasem reszty fukozy. Oligosacharydy złożone zawierają najczęściej do kilkunastu monocukrów; istnieją jednak również tzw. łańcuchy poliglikozylowe, zawierające od kilkunastu do kilkudziesięciu (ok. 60) reszt monocukrowych. Cechą charakterystyczną jest to, że posiadają one wiele powtarzających się jednostek N-acetylolaktozylowych $\rightarrow 3\text{Gal } \beta 1 \rightarrow \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow$,

c) oligosacharydy złożone będące hybrydami łańcuchów typu a) i b). W tych łańcuchach do jednej z reszt α -mannozy z części rdzeniowej przyłączone są reszty mannozy, a do drugiej takie cukry, jak N-acetyloglukozoamina i galaktoza. W literaturze opisano niewiele przykładów takich łańcuchów cukrowych, np. (164, 165).

Oligosacharydy grupy drugiej i trzeciej charakteryzuje się także uwzględniając sposób ich rozgałęzienia. Mówi się zatem o oligosacharydach „dwuantenowych”, mających dwa ramiona na końcu nieredukującym, o oligosacharydach trój- i czteroantennowych. Ostatnio doniesiono o występowaniu w komórkach nowotworowych łańcuchów N-glikozydowych posiadających 6 rozgałęzień (166).

Wśród łańcuchów N-glikozydowych najbardziej rozpowszechnione są łańcuchy złożone. Stanowią one wyraźny przykład możliwości zróżnicowania strukturalnego oligosacharydów. Z tych powodów będą one opisane szczegółowiej.

VI. Struktury złożonych oligosacharydów N-glikozydowych

W celach porównawczych przedstawiono poniżej schematy struktur złożonych oligosacharydów N-glikozydowych z podaniem glikoprotein, z których pochodzą. W zestawieniu podano metody, jakimi posługiwano się przy ustalaniu struktury oligosacharydów, uwzględniając najbardziej

popularne; dla uproszczenia nie zaznaczono anomerii wiązań glikozydowych i numerów atomów węgla uczestniczących w wiązaniach. Zastosowano poniższe symbole:

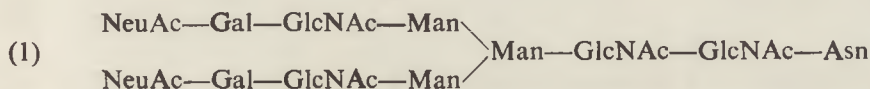
A — analiza metylacyjna, B — trawienie glikozydazami, C — utlenianie nadjodanem, D — spektroskopia NMR, E — utlenianie przy użyciu CrO_3 .

Ponadto zastosowano następujące oznaczenia:

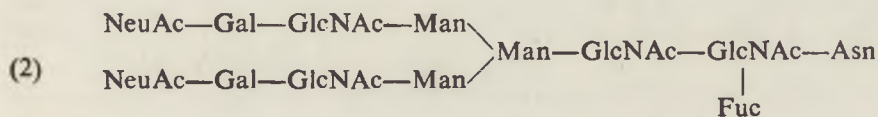
x — w pracy opisano kilka oligosacharydów, z których pewne mają taką budowę, jak podaje schemat, a inne mają częściowy brak reszt(y) NeuAc lub Fuc,

y — w pracy badano oligosacharydy po ich uprzednim odszaleniu, z — w pracy nie ustalono pewnych szczegółów struktury oligosacharydu (pozycji lub anomerii wiązań),

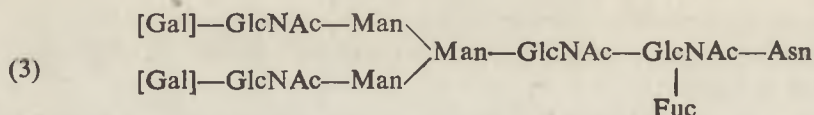
[] — w nawiasach ujęto te fragmenty łańcucha, których brak jest w części oligosacharydów występujących w danym materiale.



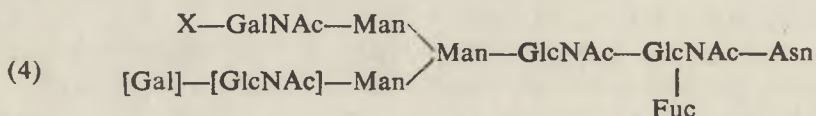
fibronektyna surowicy ludzkiej (167) — A; transferyna surowicy ludzkiej (168) — B, D; (169) — A, B; TBG surowicy ludzkiej (42) — A, B, C; składnik komplementu surowicy ludzkiej (75) — x, A, B; ludzki plazminogen (170) — x, z, A, B, C; ludzki inhibitor α_1 -proteazy (171) — A, B; (172) — A, B, C; ludzka makroglobulina Waldenströma (173) — x, A, B, C; wołowa protrombina (76) — A, B; ludzki orozomukoid (174) — y, A, D; gonadotropina kosmówki ludzkiej (72) — x, A, B; fibronektyna surowicy wołowej (175) — x, A, B; królicza transferyna (176) — A, B, C; ludzka antytrombina III (54) — A, C, E; (177) — A, B; ludzka protrombina (178) — x, A, B;



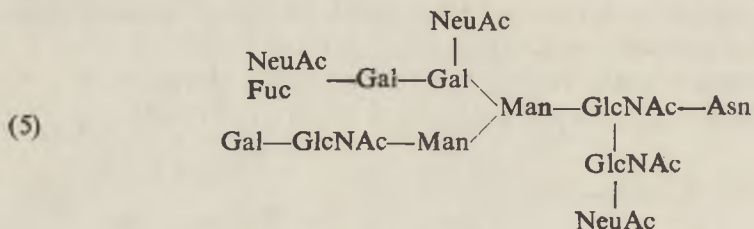
ludzka IgE (179) — x, A, B, C; glikoproteina ludzkich pęcherzyków płucnych (180) — x, A, B; gonadotropina kosmówki ludzkiej (181) — x, A, B, C; (72) — x, A, B; fibronektyna z fibroblastów embrionalnych chomika (182) — x, A, B; (183) — x, A, B; IgG₁ siary wołowej (184) — x, A, B, C; składnik komplementu surowicy ludzkiej (75) — x, A, B; rybonukleaza trzustki końskiej (185) — A, D; ludzka IgM (186) — x, z, A, B, C; szczurza α -laktoalbumina (187) — x, A, B; ludzka α -fetoproteina (188) — x, A, B; ludzka immunoglobulina monoklonalna (43) — A, B; glikoproteina błony plazmatycznej tymocytów cielęcych (189) — x, A, B, C; ludzka laktotransferyna (70) — x, A, B, D;



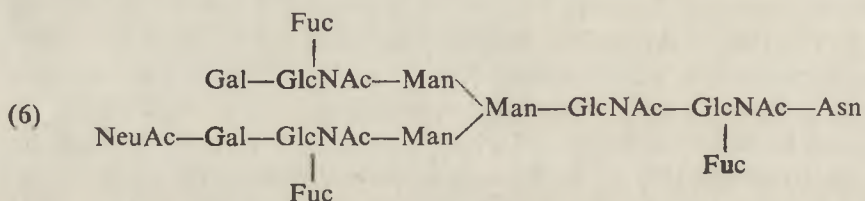
ludzka IgG szpiczaka (190) — z, A, B, C; glikoproteina błony plazmatycznej tymocytów cielęcych (165) — A, B; wołowa IgG (191) — A, B;



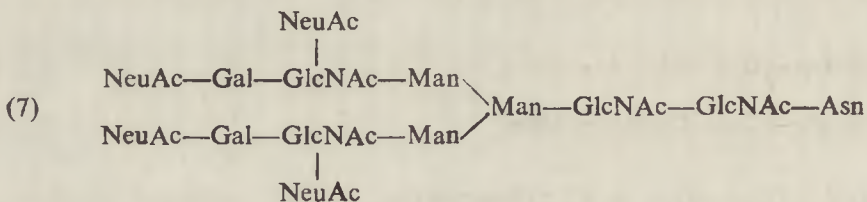
hormon luteinizujący krwi i owcy (17) — x, A, B, C;



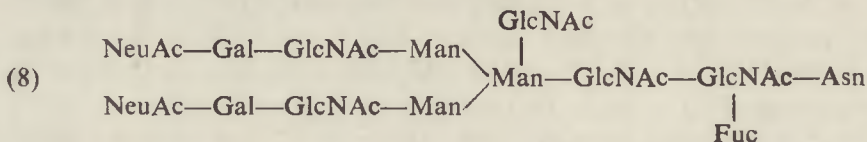
glikoproteina skóry ryby *Labeo rohita* (192) — A, B;



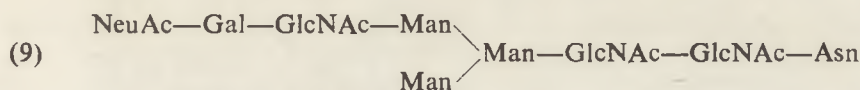
ludzka α -amylaza ze ślinianki przyusznej (193) — x, A, B; glikoproteina wirusa HVJ (194) — x, A, B, C; ludzka laktotransferyna (70) — x, A, B, D;



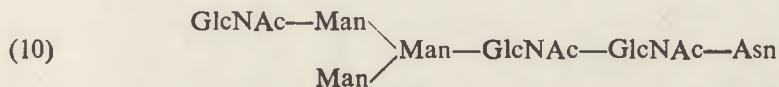
wołowy czynnik X krzepnięcia krwi (195) — x, A, B; fibronektyna plazmy wołowej (175) — x, A, B;



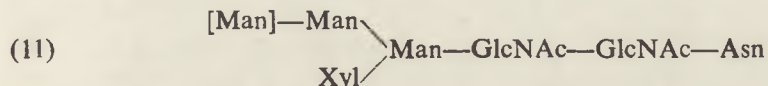
glikoforyna A (78) — x, A, B, C; (79) — x, A, B, C; ludzka IgA₁ (196) — x, A, B, C;



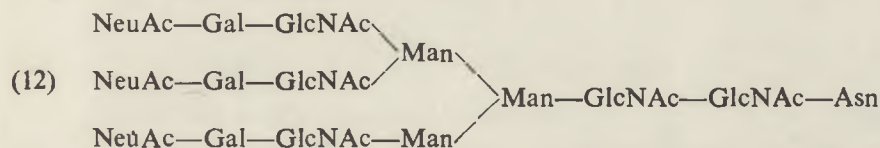
gonadotropina kosmówki ludzkiej (72) — A, B



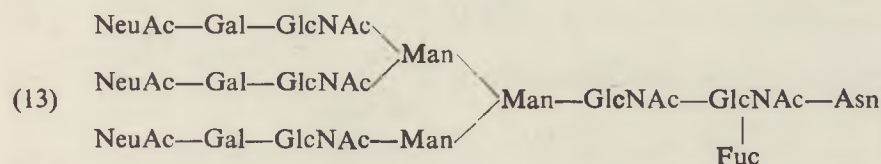
rodopsyna wołowa (74) — A, B; (197) — A, B



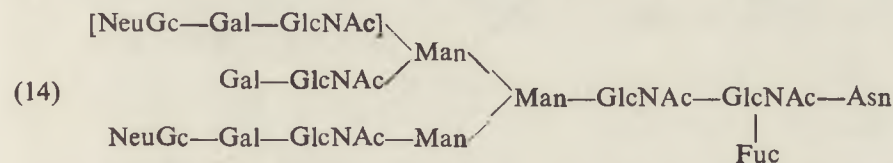
bromelaina pnia ananasa (18) — A, B;



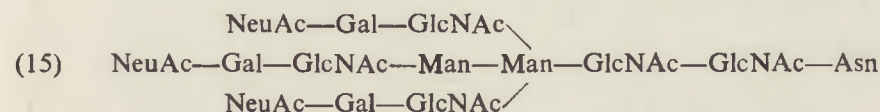
ludzki inhibitor α_1 -proteazy (171) — x, z, A, B; TBG surowicy ludzkiej (42) — z, A, B, C; fetuina (198) — A, B, C; (33) — A, C, E; ludzki orozomukoid (174) — y, A, D;



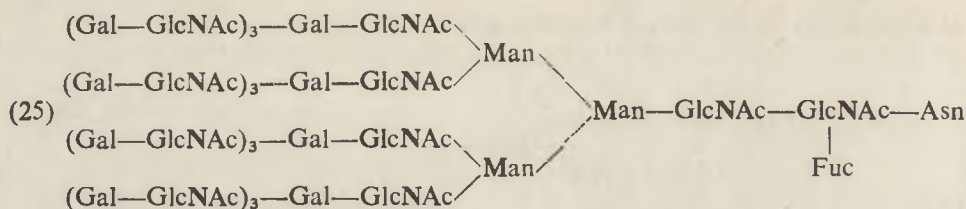
wieprzowa tyroglobulina (199) — x, A, B, C; wirus zapalenia jamy ustnej (81) — A, B, C; ludzkie hormony przysadki (200) — z, B, C; glikoproteina błony plazmatycznej tymocytów cielęcych (189) — x, A, B, C;



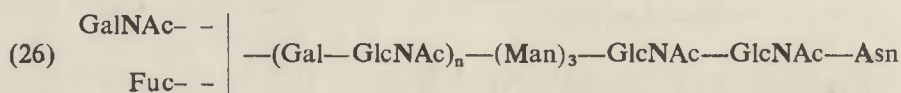
mysia IgM (201) — A, B, C;



króliczy receptor wątrobowy dla asjaloglikoprotein (202) — z, B, C;



komórki jajnika chomika (139) — z, A, B;



glikoproteina „band 3” błony ludzkich erytrocytów (207) — x, A, B.

VII. Uwagi końcowe

Badanie i ustalanie struktury łańcuchów cukrowych to problem, który dotyczy nie tylko glikoprotein, ale także innych związków biologicznych: zawierających cukry jako część składową (glikolipidy, proteoglikany, glikany bakteryjne) lub wolnych oligosacharydów (występujących np. w moczku i mleku). Artykuł ma za zadanie przybliżyć Czytelnikowi podstawowe zagadnienia związane z badaniem związków cukrowych, ze szczególnym uwzględnieniem glikoprotein. Temat ten znajduje bowiem szerokie odbicie w pracach biochemicznych, prowadzonych w ostatnich latach.

Autor pragnie wyrazić serdeczne podziękowania Pani prof. Elwirze Lisowskiej za wnikliwe uwagi dotyczące tekstu niniejszego artykułu.

Zaakceptowano do druku 24.06.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Palamarczyk, G., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 443—460.
2. Kornfeld R., Kornfeld S., (1976), *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 217—237.
3. Kornfeld R., Kornfeld S., (1980), w „The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans” red. Lennarz W. J., str. 1—34, Plenum Press, New York.
4. Hallgren P., Lundblad A., Svensson S., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5312—5314.
5. Krysteva M. A., Mancheva I. N., Dobrev I. D., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 155—161.
6. Lin T. S., Kolattukudy P. E., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 243—250.
7. Finne J., Krusius T., Margolis R. K., Margolis R. U., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10295—10300.
8. Hounsell E. F., Fukuda M., Powell M. E., Feizi T., Hakomori S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1143—1150.

9. Spiro R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4813—4823.
10. Gottschalk A., (1969), *Nature*, **222**, 452—454.
11. Montreuil J., Vliegenthart J. F. G., (1979), w „Glycoconjugate Research” red. Gregory J. D., Jeanloz R. W., Academic Press, New York, str. 35—78.
12. Montreuil J., (1980), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 157—223.
13. Aubert J. P., Biserte G., Loucheux-Lefebvre M. H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **175**, 410—418.
14. Hart G. W., Brew K., Grant G. A., Bradshaw R. A., Lennarz W. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9747—9753.
15. Struck D. K., Lennarz W. J., Brew K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5786—5794.
16. Krusius T., Finne J., Rauvala H. (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 289—300.
17. Bahl O. P., Reddy M. S., Bedi G. S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 1192—1199.
18. Ishihara H., Takahashi N., Oguri S., Tejima S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10715—10719.
19. Ogata S., Lloyd K. O., (1981), w „Glycoconjugates” red. Yamakawa T., Osawa T., Handa S., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, str. 23.
20. Rasilo M. L., Renkonen O., (1981), *FEBS Lett.*, **135**, 38—42.
21. Lote C. J., Weiss J. B., (1971), *FEBS Lett.*, **16**, 81—85.
22. Weiss J. B., Lote C. J., Bobinski H., (1971), *Nature-New Biology*, **234**, 25—26.
23. Goodman I., Fouts J. R., Bresnick E., Menegas R., Hitchings G. H., (1959), *Science*, **130**, 450—451.
24. Carlson D. M., (1973), *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.*, **221**, 249—254.
25. Pigman W., Moschera J., Downs F., Wakabayashi T., (1973), *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.*, **221**, 231—247.
26. Carlson D. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 616—626.
27. Iyer R. N., Carlson D. M., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 101—105.
28. Aminoff D., Gathmann W. D., McLean C. M., Yadomae T., (1980), *Anal. Biochem.*, **101**, 44—53.
29. Aminoff D., Gathmann W. D., Baig M. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8909—8913.
30. Hayes M. L., Castellino F. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8777—8780.
31. Kessler M. J., Mise T., Ghai R. D., Bahl O. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7909—7914.
32. Lisowska E., Duk M., Dahr W., (1980), *Carbohydr. Res.*, **79**, 103—113.
33. Nilsson B., Nordén N. E., Svensson S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4545—4553.
34. Austen B. M., Marshall R. D., (1973), *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.*, **221**, 219—230.
35. Austen B. M., Marshall R. D., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 14P—15P.
36. Lee Y. C., Scoocca J. R., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5753—5758.
37. Zinn A. B., Marshall J. S., Carlson D. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6761—6767.
38. Hanessian S., (1972), *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 208—214.
39. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., (1973), *Carbohydr. Res.*, **29**, 451—457.
40. Dmitriev B. A., Knirel Y. A., Kochetkov N. K., (1973), *Carbohydr. Res.*, **30**, 45—50.

41. Krotkiewski H., Lisowska E., (1978), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **26**, 139—144.
42. Zinn A. B., Marshall J. S., Carlson D. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6768—6773.
43. Chandrasekaran E. V., Mendicino A., Garver F. A., Mendicino J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 1549—1555.
44. Krusius T., Finne J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 395—403.
45. Svensson S., (1980), w 27th International congress of pure and applied chemistry, red. Varmavuori A., Pergamon Press, Oxford, str. 245—251.
46. Franzén L. E., Svensson S., (1979), *Carbohydr. Res.*, **73**, 309—312.
47. Franzén L. E., Svensson S., (1980), *Acta Chem. Scand.*, **B34**, 133—135.
48. Franzén L. E., Svensson S., (1980), *Carbohydr. Res.*, **79**, 147—150.
49. Nilsson B., Svensson S., (1978), *Carbohydr. Res.*, **65**, 169—171.
50. Nilsson B., Svensson S., (1979), *Carbohydr. Res.*, **69**, 292—296.
51. Nilsson B., Svensson S., (1979), *Carbohydr. Res.*, **72**, 183—190.
52. Lindberg B., Nilsson B., Norberg T., Svensson S., (1979), *Acta Chem. Scand.*, **B33**, 230—231.
53. Nilsson B., Svensson S., (1978), *Carbohydr. Res.*, **62**, 377—380.
54. Franzén L. E., Svensson S., Larm O., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5090—5093.
55. Nilsson B., Zopf D. A., (1979), w „Glycoconjugates” red. Schauer R., Georg Thieme Publishers, Stuttgart, str. 78.
56. Lundblad A., Svensson S., Löw B., Messeter L., Cedergren B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 323—330.
57. Akabori S., Ohno K., Narita K., (1952), *Bull. Chem. Soc. Japan*, **25**, 214—218.
58. Matsushima Y., Fujii N., (1957), *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 48—50.
59. Wolfrom M. L., Juliano B. O., (1960), *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2588—2592.
60. Yosizawa Z., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 588—591.
61. Yosizawa Z., Sato T., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 591—593.
62. Yosizawa Z., (1962), *J. Biochem.*, **51**, 1—11.
63. Yosizawa Z., Sato T., (1962), *J. Biochem.*, **51**, 155—161.
64. Yosizawa Z., Sato T., (1962), *J. Biochem.*, **51**, 233—241.
65. Yosizawa Z., Sato T., Schmid K., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **121**, 417—420.
66. Fraenkel-Conrat H., Tsung C. M., (1967), *Methods Enzymol.*, **11**, 151—155.
67. Phillips D. M. P., (1963), *Biochem. J.*, **86**, 397—401.
68. Niemann H., Watanabe K., Hakomori S., Childs R. A., Feizi T., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1286—1293.
69. Young W. W., MacDonald E. M. S., Nowinski R. C., Hakomori S., (1979), *J. Exp. Med.*, **150**, 1008—1019.
70. Spik G., Strecker G., Fournet B., Bouquelet S., Montreuil J., Dorland L., van Halbeek H., Vliegenthart J. F. G., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 413—419.
71. Bayard B., Kerckaert J. P., Roux D., Strecker G., (1979), w „Protides of biological fluids” red. Peeters H., Pergamon Press, New York, str. 153—156.
72. Endo Y., Yamashita K., Tachibana Y., Tojo S., Kobata A., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 669—679.
73. Hasilik A., Tanner W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 567—575.

74. Liang C. J., Yamashita K., Muellenberg C. G., Shicki H., Kobata A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6414—6418.
75. Mizuochi T., Yonemasu K., Yamashita K., Kobata A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7404—7409.
76. Mizuochi T., Yamashita K., Fujikawa K., Kisiel W., Kobata A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6419—6425.
77. Prehm P., Scheid A., Choppin P. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9669—9677.
78. Yoshima H., Furthmayr H., Kobata A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9713—9718.
79. Irimura T., Tsuji T., Tagami S., Yamamoto K., Osawa T., (1981), *Biochemistry* **20**, 560—566.
80. Aspinall G. O., Przybylski E., Ritchie R. G. S., Wong C. O., (1978), *Carbohydr. Res.*, **66**, 225—243.
81. Reading C. L., Penhoet E. E., Ballou C. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5600—5612.
82. Fukuda M., Kondo T., Osawa T., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 1223—1232.
83. Saeed M. S., Williams J. M., (1980), *Carbohydr. Res.*, **84**, 83—94.
84. Yamashina I., (1972), w „Glycoproteins” red. Gottschalk A., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, str. 1187—1200.
85. Takahashi N., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1194—1201.
86. Takahashi N., Nishibe H., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 1467—1473.
87. Huang C. C., Aminoff D., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6737—6742.
88. Bhavanandan V. P., Umemoto J., Davidson E. A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 738—745.
89. Endo Y., Kobata A., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 1—8.
90. Kobata A., (1979), *Anal. Biochem.*, **100**, 1—14.
91. Koide N., Muramatsu T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4897—4904.
92. Trimble R. B., Tarentino A. L., Evans G., Maley F., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9708—9713.
93. Bouquelet S., Strecker G., Montreuil J., Spik G., (1980), *Biochimie (Paris)*, **62**, 43—49.
94. Dutton G. G. S., (1973), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **28**, 11—160.
95. Dutton G. G. S., (1974), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **30**, 9—110.
96. Laine R. A., Esselman W. J., Sweeley C. C., (1972), *Methods. Enzymol.*, **28**, 159—167.
97. Sharon N., (1975), w „Complex carbohydrates” Addison-Wesley Publishing Company, London, str. 33—117.
98. Chambers R. E., Clamp J. R., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 1009—1018.
99. Zdebska E., Kościelak J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 517—525.
100. Chizhov O. S., Golovkina L. S., Wulfson N. S., (1966), *Izvest. Akad. Nauk SSSR, Otd. Chim. Nauk*, **11**, 1915—1926.
101. Rauvala H., Finne J., Krusius T., Kärkkäinen J., Järnefelt J., (1981), *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, **38**, 389—416.
102. Fournet B., Strecker G., Leroy Y., Montreuil J., (1981), *Anal. Biochem.*, **116**, 489—502.
103. Hakomori S., (1964), *J. Biochem.*, **55**, 205—208.
104. Stellner K., Saito H., Hakomori S., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 464—472.
105. Finne J., Krusius T., Rauvala H., (1980), *Carbohydr. Res.*, **80**, 336—339.
106. Phillips L. R., Fraser B. A., (1981), *Carbohydr. Res.*, **90**, 149—152.

107. Lönngren J., Svensson S., (1974), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **29**, 41—106.
108. Bobbitt J. M., (1956), *Adv. Carbohydr. Chem.*, **11**, 1—41.
109. Malaprade M. L., (1928), *Bull. Soc. Chim. (France)*, **43**, 683—696.
110. Dixon J. S., Lipkin D., (1954), *Anal. Chem.*, **26**, 1092—1093.
111. Goldstein I. J., Hay G. W., Lewis B. A., Smith F., (1965), *Methods Carbohydr. Chem.*, **5**, 361—370.
112. Kordowicz M., Lisowska E., (1978), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **26**, 127—132.
113. Lindberg B., Lönngren J., Svensson S., (1975), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **31**, 185—240.
114. Guthrie R. D., McCarthy J. F., (1967), *Adv. Carbohydr. Chem.*, **22**, 11—23.
115. Montreuil J., (1975), *Pure Appl. Chem.*, **42**, 431—477.
116. Fournet B., Dhalluin J. M., Strecker G., Montreuil J., (1980), *Anal. Biochem.*, **108**, 35—56.
117. Spiro R. G., (1966), *Methods Enzymol.*, **8**, 26—52.
118. Isemura M., Schmid K., (1971), *Biochem. J.*, **124**, 591—604.
119. Bayard B., Fournet B., (1976), *Carbohydr. Res.*, **46**, 75—86.
120. Järnefelt J., Rush J., Li Y. T., Laine R. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8006—8009.
121. Strecker G., Pierce-Cretel A., Fournet B., Spik G., Montreuil J., (1981), *Anal. Biochem.*, **111**, 17—26.
122. Hoffman J., Lindberg B., Svensson S., (1972), *Acta Chem. Scand.*, **26**, 661—666.
123. Hudson C. S., (1909), *J. Am. Chem. Soc.*, **31**, 66—86.
124. Beychok S., Kabat E. A., (1965), *Biochemistry*, **4**, 2565—2574.
125. Jennings H. J., Williams R. E., (1976), *Carbohydr. Res.*, **50**, 257—265.
126. Aubert J. P., Bayard B., Loucheux-Lefebvre M. H., (1976), *Carbohydr. Res.* **51**, 263—268.
127. Tul'chinsky V. M., Zurabyan S. E., Asankozhev K. A., Kogan G. A., Khorlin A. Y., (1976), *Carbohydr. Res.*, **51**, 1—8.
128. Lenten L. V., Ashwell G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1889—1894.
129. Gahmberg C. G., Hakomori S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4311—4317.
130. Gattegno L., Perret G., Fabia F., Bladier D., Cornillot P., (1981), *Carbohydr. Res.*, **95**, 283—290.
131. Takasaki S., Kobata A., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 783—789.
132. Björndal H., Lindberg B., Svensson S., (1967), *Carbohydr. Res.*, **5**, 433—440.
133. Kärkkäinen J., (1969), *Carbohydr. Res.*, **11**, 247—256.
134. Kärkkäinen J., (1970), *Carbohydr. Res.*, **14**, 27—33.
135. Yamaguchi H., Okamoto K., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 511—518.
136. Hase S., Hara S., Matsushima Y., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 217—220.
137. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 989—994.
138. Hase S., Ikenaka T., Matsushima Y., (1979), *J. Biochem.*, **85**, 995—1002.
139. Li E., Gibson R., Kornfeld S., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 393—399.
140. Petryniak J., (1979), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **33**, 147—196.
141. Krusius T., Finne J., Rauvala H., (1976), *FEBS Lett.*, **71**, 117—120.
142. Ogata S., Muramatsu T., Kobata A., (1975), *J. Biochem.*, **78**, 687—696.

143. Karlsson K. A., Pascher I., Samuelsson B. E., Finne J., Krusius T., Rauvala H., (1978), *FEBS Lett.*, **94**, 413—417.
144. Lundblad A., Svensson S., Löw B., Messeter L., Cedergren B., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **104**, 323—330.
145. Vliegenthart J. F. G., van Halbeek H., Dorland L., (1981), *Pure Appl. Chem.*, **53**, 45—77.
146. Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Strecker G., Michalski J. C., Fournet B., Spik G., Montreuil J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 323—329.
147. Karlsson K. A., Larson G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9311—9316.
148. Bradbury J. H., Collins J. G., (1979), *Carbohydr. Res.*, **71**, 15—24.
149. Breimer M. E., Falk K. E., Hansson G. C., Karlsson K. A., Larson G., Leffler H., Pascher I., Samuelsson B. E., Thuring J., Ångström J., (1979), w „Glycoconjugates” red. Schauer R., Georg Thieme Publishers, Stuttgart, str. 106—107.
150. Thomas D. B., Winzler R. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5943—5946.
151. Fukuda K., Tomita M., Hamada A., (1980), *J. Biochem.*, **87**, 687—694.
152. Baenziger J., Kornfeld S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7270—7281.
153. Pierce-Cretel A., Pamblanco M., Strecker G., Montreuil J., Spik G., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **114**, 169—178.
154. Słomiany B. L., Murty V. L. N., Słomiany A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9719—9723.
155. Van den Eijnden D. H., Evans N. A., Codington J. F., Reinhold V., Silber C., Jeanloz R. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12153—12159.
156. Farrar G. H., Harrison R., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 549—557.
157. Vandenheede J. R., Ahmed A. I., Feeney R. E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7885—7889.
158. Reisner Y., Ikehara S., Hodes M. Z., Good R. A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1164—1168.
159. Unemoto J., Bhavanandan V. P., Davidson E. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 402—410.
160. Herp A., Wu A. M., Moschera J., (1979), *Molec. Cell. Biochem.*, **23**, 27—44.
161. Fukuda K., Tomita M., Hamada A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 462—470.
162. Rovis L., Anderson B., Kabat E. A., Gruezo F., Liao J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 5340—5354.
163. Struck D. K., Lennarz W. J., (1980), w „The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans” red. Lennarz W. J., Plenum Press, New York, str. 35—84.
164. Bayard B., Montreuil J., (1973), *Colloq. Int. Centre Nat. Rech. Sci.*, **221**, 209—218.
165. Yoshima H., Takasaki S., Kobata A., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 819—827.
166. Takasaki S., Ikehira H., Kobata A., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 735—742.
167. Wrann M., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 269—274.
168. Dorland L., Haverkamp J., Schut B. L., Vliegenthart J. F. G., Spik G., Strecker G., Fournet B., Montreuil J., (1977), *FEBS Lett.*, **77**, 15—20.

169. Spik G., Bayard B., Fournet B., Strecker G., Bouquelet S., Montreuil J., (1975), *FEBS Lett.*, **50**, 296—299.
170. Hayes M. L., Castellino F. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8772—8776.
171. Hodges L. C., Laine R., Chan S. K., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8208—8212.
172. Mega T., Lujan E., Yoshida A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4057—4061.
173. Baenziger J. U., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4063—4071.
174. Fournet B., Montreuil J., Strecker G., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Binette J. P., Schmid K., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5206—5214.
175. Kobata A., Yamashita K., Takasaki S., Mizuochi T., Tachibana Y., (1979), w „Glycoconjugates” red. Schauer R., Georg Thieme Publishers, Stuttgart, str. 6—7.
176. Strickland D. K., Hamilton J. W., Hudson B. G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2549—2554.
177. Mizuochi T., Fujii J., Kurachi K., Kobata A., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 458—465.
178. Mizuochi T., Fujii J., Kisiel W., Kobata A., (1981), *J. Biochem.*, **90**, 1023—1031.
179. Baenziger J., Kornfeld S., Kochwa S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1897—1903.
180. Bhattacharyya S. N., Lynn W. S., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1172—1180.
181. Kessler M. J., Reddy M. S., Shah R. H., Bahl O. P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7901—7908.
182. Carter W. G., Hakomori S., (1979), *Biochemistry*, **18**, 730—738.
183. Fukuda M., Hakomori S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5451—5457.
184. Chéron A., Fournet B., Spik G., Montreuil J., (1976), *Biochimie (Paris)*, **58**, 927—942.
185. Schut B. L., Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Fournet B., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1223—1228.
186. Hickman S., Kornfeld R., Osterland C. K., Kornfeld S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2156—2163.
187. Prasad R., Hudson B. G., Strickland D. K., Ebner K. E., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1248—1251.
188. Yoshima H., Mizuochi T., Ishii M., Kobata A., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 4276—4281.
189. Yoshima H., Takasaki S., Kobata A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10793—10804.
190. Kornfeld R., Keller J., Baenziger J., Kornfeld S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3259—3268.
191. Tai T., Ito S., Yamashita K., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 968—974.
192. Sikder S. K., Das A., (1981), *Carbohydr. Res.*, **95**, 249—262.
193. Yamashita K., Tachibana Y., Nakayama T., Kitamura M., Endo Y., Kobata A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 5635—5642.
194. Yoshima H., Nakanishi M., Okada Y., Kobata A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 5355—5361.
195. Mizuochi T., Yamashita K., Fujikawa K., Titani K., Kobata A., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3526—3531.
196. Baenziger J., Kornfeld S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7260—7269.

197. Fukuda M. N., Papermaster D. S., Hargrave P. A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8201—8207.
198. Baenziger J. U., Fiete D., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 789—795.
199. Kondo T., Fukuda M., Osawa T., (1977), *Carbohydr. Res.*, **58**, 405—414.
200. Hara K., Rathnam P., Saxena B. B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1582—1591.
201. Brenckle R., Kornfeld R., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 160—173.
202. Kawasaki T., Ashwell G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5292—5299.
203. Purkayastha S., Rao C. V. N., Lamm M. E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 6583—6587.
204. Kornfeld R., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1415—1423.
205. Dorland L., Haverkamp J., Vliegenthart J. F. G., Spik G., Fournet B., Montreuil J., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **100**, 569—574.
206. Yoshima H., Matsumoto A., Mizuochi T., Kawasaki T., Kobata A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8476—8484.
207. Tsuji T., Irimura T., Osawa T., (1980), *Biochem. J.*, **187**, 677—686.

K O M U N I K A T

w sprawie bibliografii

W 1982 r. ukazała się „Bibliografia polskich prac biochemicznych 1945—1975”. Z myślą o kontynuacji wydawnictwa w mniejszych przedziałach czasowych Komitet Biochemii i Biofizyki PAN i Polskie Towarzystwo Biochemiczne pragnie rozpocząć pracę nad zebraniem bibliografii prac, które ukazały się w 1976—1980. W związku z tym zwróciliśmy się do kierowników placówek biochemicznych z prośbą o przysłanie spisu prac z tego okresu. Ponieważ jednak wiele prac biochemicznych powstaje w innych placówkach, prosimy ich autorów o przysłanie spisu publikacji bezpośrednio na adres:

Prof. dr hab. Janina Kwiatkowska, Katedra Biochemii AM
ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław.

Ułatwi nam bardzo pracę, jeśli notki bibliograficzne w spisie będą sporządzone dokładnie według wzorca, zastosowanego w wydanej bibliografii, a mianowicie:

Nazwisko i inicjały autorów.

Pełna nazwa placówki. W przypadku gdy współautorzy pracują w kilku instytucjach krajowych lub zagranicznych, prosimy o podanie nazw wszystkich placówek. Jeśli jednak publikacja została wykonana wyłącznie w placówce zagranicznej, to nazwę placówki krajowej, w której pracuje polski autor, należy podać w nawiasie. Podobnie, jeżeli praca została wykonana całkowicie w placówce krajowej, to nazwę placówki zagranicznej współautora należy podać w nawiasach.

Tytuł pracy w języku, w jakim ją ogłoszono.

Nazwa czasopisma, rok, tom, strona (lub tytuł książki, redaktorzy, wydawnictwo, miasto, rok, strona).

Spisy nie zawierają komunikatów zjazdowych.

Prosimy o zaznaczenie prac przeglądowych na marginesie literą B.

ZDZISŁAW KRAWCZYK *)

Oddziaływanie bakteryjnej polimerazy RNA z regionem promotora

Interaction of bacterial RNA Polymerase with the Promoter Region

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Definicja promotora
- III. Regiony homologii
- IV. Kompleksy polimerazy RNA z DNA w regionie promotora. Model inicjacji transkrypcji
- V. Moc promotora i kinetyka oddziaływania polimerazy RNA z promotorem
- VI. Czynniki modyfikujące moc promotora
 - VI-1. CAP i represor
 - VI-2. Zmiana konformacji cząsteczki polimerazy RNA
 - VI-3. Zmiana składu podjednostkowego polimerazy RNA
- VII. Promotory genów rybosomalnych
- VIII. Miejsce kontaktu polimerazy RNA z promotorem i struktura kompleksu

Contents

- I. Introduction
- II. Definition of promoter
- III. Regions of sequence homology
- IV. Complexes between RNA polymerase and DNA of the promoter region. Model of initiation of transcription
- V. Promoter strength and kinetics of RNA polymerase-promoter interactions
- VI. Factors modifying the strength of the promoter
 - VI-1. CAP and represor
 - VI-2. Changes in the RNA polymerase conformation
 - VI-3. Changes in subunit composition of RNA polymerase
- VII. Promoters of ribosomal genes
- VIII. Contacts of RNA polymerase with promoter and the spatial structure of the complex.

*) Dr; Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, ul. Armii Czerwonej 15, 44-100 Gliwice

I. Wstęp

Pierwszym etapem w procesie ekspresji informacji genetycznej jest transkrypcja. W procesie transkrypcji polimeraza RNA katalizuje syntezę RNA komplementarnego do sekwencji jednostki transkrypcyjnej. Kluczowe znaczenie w kontroli ekspresji informacji genetycznej u *Prokaryota* ma regulacja inicjacji transkrypcji. Terminem inicjacja określa się szereg oddziaływań cząsteczki polimerazy z DNA prowadzących do powstania pierwszego wiązania fosfodwuestrowego między inicjującym a kolejnym trójfosforybonukleozydem transkryptu. Podstawowym elementem koncepcji regulacji procesu transkrypcji na poziomie inicjacji jest założenie istnienia promotora — odcinka DNA sterującego wyborem miejsca inicjacji przez polimerazę RNA. Celem prezentowanej pracy przeglądowej jest przedstawienie aktualnego stanu badań nad strukturą i funkcjonowaniem promotorów u prokariotów.

II. Definicja promotora

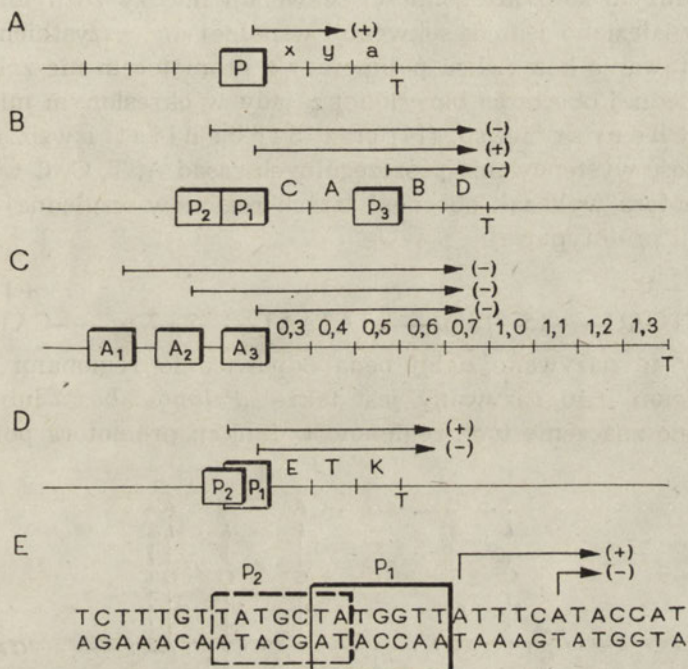
Promotor oznaczony metodami genetycznymi (test *cis-trans*) stanowi odcinek DNA w którym mutacje typu *cis* wpływają na szybkość inicjacji cząsteczki RNA (1, 2). W granicach promotora znajdują się zarówno regiony oddziaływujące z polimerazą RNA jak i z białkami regulatorowymi (3). Zamiennie z podaną wyżej definicją używane bywa określenie promotora jako sekwencji DNA pozostającej w mniej lub bardziej ścisłym kontakcie z cząsteczką polimerazy w kompleksie preinicjacyjnym. W operonie laktozowym sekwencja ta o długości około 80 par zasad zlokalizowana jest między -60 a +20 nukleotydem (4).

Umownie przyjmuje się oznaczenie liczbą +1 pierwszego (inicjującego) nukleotydu jednostki transkrypcyjnej. Numerując nukleotydy na lewo (region poprzedzający miejsce inicjacji) oraz na prawo (sekwencje kodujące) od +1 dopisuje się odpowiednio znak minus lub plus.

III. Regiony homologii

Geny mogą znajdować się pod kontrolą jednego bądź kilku promotorów. Na Ryc. 1 podano przykłady operonów bakteryjnych różniących się ilością i rozmieszczeniem promotorów oraz mechanizmem regulacji funkcji promotora. Klasycznym przykładem jednostki transkrypcyjnej posiadającej jeden promotor jest operon laktozowy Ryc. 1A. Przykładem operonu z kilkoma promotorami jest operon *deo*: Ryc. 1B. W operonie tym geny C i A znajdują się pod kontrolą dwóch promotorów P_1 i P_2 , geny B i D znajdują się pod kontrolą trzech promotorów P_1 , P_2 i P_3 . Promotory

P_1 oraz P_3 („wewnętrzny”) mogą być rozpoznawane przez polimerazę jako sekwencje swoiste lub nieswoiste, stanowiące fragment sekwencji jednostki transkrypcyjnej. Usytuowanie względem siebie promotorów kontrolujących transkrypcję tych samych genów może być różnorodne. Na przykład promotory A_1 , A_2 i A_3 wczesnych genów faga T_7 (Ryc. 1C) oddalone są od siebie o około 120 par zasad (7, 8) podczas gdy promotory P_1 i P_2 operonu galaktozowego *E. coli* pokrywają się na znacznej długości (Ryc. 1D i 1E).



Ryc. 1. Przykłady rozmieszczenia promotorów bakteryjnych i fagowych.

Prostokątami zaznaczono schematycznie promotory. Strzałkami oznaczono transkrypty, znak $(+)$ lub $(-)$ przy każdym transkrypcie oznacza zależność lub brak zależności funkcjonowania danego promotora od cAMP-CAP. Litera T poniżej jednostki transkrypcyjnej oznacza miejsca terminacji transkrypcji. Oznaczenie promotorów i genów przyjęto wg cytowanych niżej prac.

A. Operon *lac* (*E. coli*). Według Dicksona i wsp. (5).

B. Operon *deo* (*E. coli*). Według Valentin-Hansen i wsp. (6).

C. Fragment genomu faga T_7 , zawierający wczesne geny transkrybowane przez polimerazę *E. coli*. Wewnątrz genu i kodującego polimerazę T_7 , znajduje się nie zaznaczony na rycinie promotor rozpoznawany swoiście przez tę polimerazę. Według Studiera i wsp. (9).

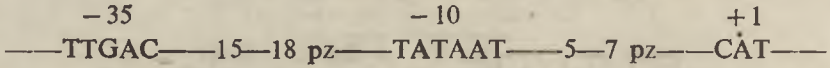
D. Operon *gal* (*E. coli*). Według Musso i wsp. (10).

E. Fragment sekwencji promotorów P_1 i P_2 operonu *gal* (*E. coli*). Prostokątami oznaczono sekwencje regionów „Pribnow box” obydwu promotorów.

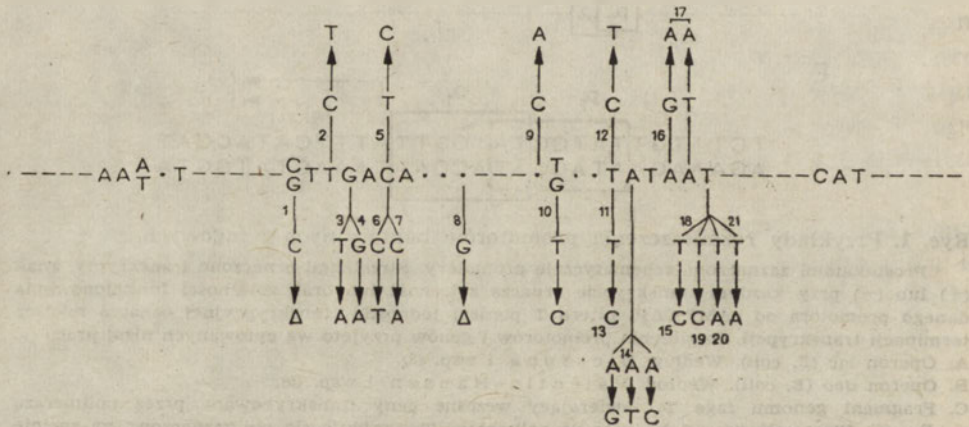
Dalsze szczegóły w tekście.

Komórki prokariotyczne posiadają jedną polimerazę RNA zależną od DNA (nukleotydylotransferaza E.C.2.7.7.6.) (11) transkrybującą geny wszystkich klas genów bakteryjnych oraz większość genów bakteriofagów. Swoistość z jaką polimeraza rozpoznaje region promotora nasunęło pytanie

czym różnią się sekwencje DNA promotora od sekwencji transkrybowanych. Porównanie pierwszych zsekwencjonowanych promotorów zwróciło uwagę Schallera i wsp. (12) oraz Pribnowa (13) na obecność regionu homologii zlokalizowanego w odległości około 10 par zasad na lewo od miejsca inicjacji. Ten fragment operonu bakteryjnego o sekwencji TATPuATPu poprzedzający jednostkę transkrypcyjną został uznany za miejsce wiązania polimerazy z promotorem. Ustalenie sekwencji nukleotydowej dalszych kilkudziesięciu promotorów potwierdziło istnienie regionów o dużym stopniu zgodności sekwencji między różnymi promotorami, nie znaleziono jednak sekwencji wspólnej dla wszystkich promotorów. Powstawanie kompleksu polimerazy z promotorem nie zależy zatem od bezwzględnej obecności określonej zasady w określonym miejscu promotora. Scherrer i wsp. (14) oraz Siebenlist i wsp. (15) analizując częstość występowania poszczególnych zasad A, T, G, C w danej pozycji promotora wykazali obecność trzech regionów względnej homologii o sekwencji prototypowej:



Regiony te nazywane dalej będą odpowiednio regionami +1, -10 i -35. Region -10 nazywany jest także „Pribnow box” lub „TATAA box”. Istotne znaczenie tych regionów w funkcji promotora potwierdzają



Ryc. 2. Mutacje w regionie promotora

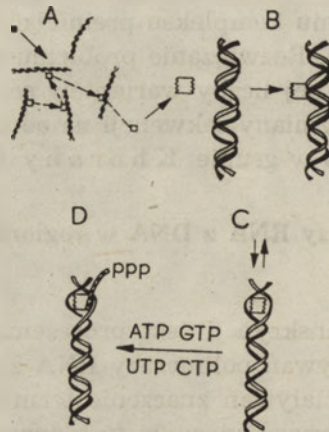
Na rycinie pokazano 21 mutacji w regionie promotorów: 1—*lac* L 305, 2—*lac* 19, 3—*lac* L 241, 4—*lambda* prm 118, 5—*lambda* prm rri, 6—*lambda* P_L sex 1, 7—*lac* L 157, 8—*tyr* T_p 11-4, 9—*lac* P_r 1a, 10—*tyr* T_p 74, 11—*tyr* 119, 12—*Trp*, 13—*lambda* c 17 scs 20, 14—*gal* P 8-3, 15—*bio* P98, 16—*lac* PsA, 17—*lac* UV 5, 18—*str* P 105, 19—*tyr* T_p 45, 20—*tyr* TP 20, 21—*lambda* c 17 scs 10. Płmiennictwo dotyczące bliższej charakterystyki podanych mutacji można znaleźć w pracy Siebenlista i wsp. (15). Mutacje oznaczono strzałkami i odniesiono do „idealnej” sekwencji promotora. Kierunek strzałek oznacza zwiększenie (↑) lub zmniejszenie (↓) mocy promotora spowodowane mutacją. Liniami ciągłymi zaznaczono zasady występujące w danej pozycji w promotorach niezmutowanych. Ponieważ odległość miejsc inicjacji od sekwencji TATAA są różne dla różnych promotorów (np. mutacje 18, 19, 20, 21 znajdują się w odległości od nukleotydu inicjującego odpowiednio o 6, 8, 8 i 7 par zasad) stąd pozycje zmutowanych zasad oznaczono jedynie schematycznie. Według Siebenlista i wsp. (15).

obserwacje zależności między wydajnością syntezy RNA a mutacjami w obrębie promotora. Zdecydowana większość punktowych mutacji promotorów wykrytych *in vivo* występuje w regionach -10 oraz -35 ; są to mutacje zwiększające (ang. *promoter-up mutations*) jak i zmniejszające (ang. *promoter-down mutations*) wydajność promotora (Ryc. 2). Można zauważyć zwiększenie się bądź zmniejszenie mocy promotora w zależności od tego czy mutacja zbliża lub oddala sekwencje promotora od sekwencji prototypowej. Pełne znaczenie funkcjonalne określonej zasady w określonej pozycji w powstawaniu kompleksu preinicjacyjnego i w procesie inicjacji nadal nie jest jasne. Rozwiązanie problemu wymagać będzie zsyntetyzowania *in vitro* znacznej liczby wariantów sekwencji promotora i określenia wpływu każdej zmiany sekwencji na oddziaływanie z polimerazą. Badania takie rozpoczęto w grupie K h o r a n y (16).

IV. Kompleksy polimerazy RNA z DNA w regionie promotora. Model inicjacji transkrypcji

Swoista inicjacja transkrypcji jest procesem wielostopniowym obejmującym szereg oddziaływań polimerazy RNA z DNA. W badaniach nad mechanizmem tych oddziaływań znaczenie terminu inicjacja ograniczono do reakcji syntezy pierwszego wiązania fosfodwuestrowego między inicjującym a kolejnym nukleotydem w tworzącym się łańcuchu RNA. Badania kinetyki powstawania i dysocjacji dwucząsteczkowego kompleksu promotor — polimeraza doprowadziły C h a m b e r l i n a (patrz (17)) do zaproponowania hipotezy o mechanizmie inicjacji transkrypcji (Ryc. 3). Chamberlin postuluje, że po szeregu nieswoistych asocjacji i dysocjacji polimerazy z przypadkowymi sekwencjami DNA enzym rozpoznaje region promotora i tworzy z jego sekwencjami kompleks „zamknięty” (ang. „*closed*” *complex*), w którym DNA znajduje się w postaci natywnej, dwuniciowej. Polimeraza znajdująca się w kompleksie „zamkniętym” nie jest zdolna do inicjacji. Kolejny etap stanowi izomeryzacja, w czasie której zachodzi rozluźnienie struktury drugorzędowej a następnie lokalne rozwinięcie helisy DNA w miejscu interakcji polimerazy z promotorem. Prowadzi to do powstania kompleksu „otwartego” (ang. „*open*” *complex*). Etap izomeryzacji odbywa się bez oddysocjowania polimerazy z DNA. Polimeraza znajdująca się w kompleksie „otwartym”, zwanym również preinicjacyjnym rozpoczyna syntezę RNA natychmiast po wprowadzeniu do środowiska reakcji nukleozydotrójfosforanów, prekursorów RNA. Istotne uzupełnienie do opisanego ciągu reakcji wnoszą badania B e l i n t s e v a i wsp., (18). Autorzy ci sugerują, że na etapie nieswoistych oddziaływań polimerazy RNA z przypadkowymi sekwencjami DNA enzym może przemieszczać się wzdłuż podwójnej helisy DNA. Mechanizm ten może istotnie wpływać na szybkość rozpoznawania swoistego miejsca wiązania jeśli asocjacja zajdzie w pobliżu promotora.

Podstawowa teza hipotezy Chamberlina postulująca rozplatanie się dwuniciowej struktury DNA w miejscu kontaktu z polimerazą (region destabilizacji) została udowodniona w sposób bezpośredni. Długość fragmentu promotora ulegającego rozpleceniu została, w zależności od stosowanej metody, określona na 7 do 15 par zasad (19—21). Pozycję regionu destabilizacji promotora A, faga T₇ określił Siebenlist (22). Wykazał on metodą metylacji adeniny, że polimeraza w kompleksie preinicjacyj-



Ryc. 3. Przebieg inicjacji transkrypcji wg Chamberlina (17)

- Asocjacja cząsteczek polimerazy RNA z przypadkowymi sekwencjami DNA — powstawanie i rozpad kompleksów nieswoistych.
 - Rozpoznawanie przez polimerazę regionu promotora — powstawanie kompleksu „zamkniętego”.
 - Isomeryzacja kompleksu polimeraza-promotor, powstanie kompleksu „otwartego” (preinicjacyjnego).
 - Inicjacja syntezy RNA.
- Prostokątami oznaczono polimerazę RNA. Szczegóły w tekście.

nym rozplata fragment promotora na długość 11 par zasad obejmując region od -9 do +2 nukleotydu. Podobną analizę wykonano dla promotora *lac UV 5* (sekwencja nukleotydu promotora UV 5, patrz Ryc. 2) wykazując, że region promotora ulegający lokalnej denaturacji występuje między -9 a +3 nukleotydem (15). Metodą metylacji można wykazać jedynie minimalną długość rozplecenia promotora. Wyniki analizy struktury DNA w kompleksie preinicjacyjnym metodą dichroizmu kołowego sugerują, że rozwinięcie podwójnej helisy może obejmować znacznie dłuższy region (23).

Różnice między strukturą swoistych i nieswoistych kompleksów dotyczą także rozmieszczenia podjednostek polimerazy względem obu łańcuchów DNA. Indukując wiązania kowalencyjne między polimerazą a DNA wykazano, że w kompleksach preinicjacyjnych jedynie podjednostki σ i β znajdują się w kontakcie z DNA, przy czym podjednostka σ wiąże się z niekodującą nicią natomiast podjednostka β nie wykazuje żadnej swoistości wiązania. Istotnie zmienia się sposób kontaktu podjednostek poli-

merazy z DNA w kompleksach nieswoistych. W tym przypadku z DNA wiąże się oprócz σ i β również β' , podjednostki te nie wykazują preferencji wiązania się z określonym łańcuchem DNA. Wydaje się, że istotną rolę w powstawaniu kompleksu „otwartego” pełni podjednostka σ , która może indukować miejscowe rozplatanie się podwójnej spirali DNA (24).

O ile nie ma wątpliwości co do istnienia kompleksów „otwartych”, to postulat o konieczności występowania formy przejściowej jaką jest kompleks „zamknięty” budzi szereg zastrzeżeń. Dotyczą one zarówno struktury kompleksu jak i jego roli w procesie swoistej inicjacji. Chamberlin (17) sugerując istnienie kompleksów „zamkniętych” opierał się na wynikach badań trwałości kompleksów polimerazy RNA z DNA powstających w warunkach niesprzyjających rozplataniu się podwójnej helisy DNA (niska temperatura i wysoka siła jonowa). Seeburg i wsp. (25) przytaczają dowody, że nieswoiste kompleksy enzymu z DNA mogą posiadać równie dużą trwałość w niskich temperaturach jak kompleksy swoiste. Jednocześnie autorzy ci sądzą, że w początkowych etapach rozpoznawania sekwencji promotora przez polimerazę następuje destabilizacja podwójnej helisy na długości kilku par zasad a całkowicie „zamknięty” kompleks nie istnieje lub jest bardzo labilny. Jako miejsce powstawania kompleksów „zamkniętych” zaproponowano region homologii promotorów -35 zlokalizowany na lewo od sekwencji „Pribnow box” (26—28) a następnie wykazano, że polimeraza znajduje się w kontakcie z tymi sekwencjami (4, 29). Mimo braku bezpośrednich dowodów na tworzenie się kompleksu „zamkniętego” w obrębie sekwencji -35 , starano się ustalić rolę tego regionu w procesie swoistej inicjacji badając wpływ zmiany sekwencji nukleotydowej na wydajność inicjacji. Modyfikacje sekwencji obejmowały mutacje punktowe, całkowite usunięcie fragmentu o określonej długości, zastępowanie usuniętego fragmentu innym o odmiennej sekwencji oraz zwiększenie odległości między „Pribnow box” a sekwencją -35 przez insercje dodatkowych sekwencji o różnej długości (30—33). Badania te wskazują, że sekwencja -35 nie ma istotnego znaczenia dla powstawania kompleksu preinicjacyjnego, natomiast jej modyfikacje zmieniają szybkość wiązania polimerazy z promotorem i w efekcie zmieniają poziom ekspresji genów *in vivo*. Nie jest wykluczone, że może istnieć gradacja znaczenia regionów -35 dla optymalnego funkcjonowania promotorów.

V. Moc promotora i kinetyka oddziaływań polimerazy RNA z promotorem

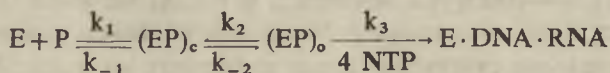
Różnice w intensywności syntezy RNA między poszczególnymi jednostkami transkrypcyjnymi wynikają z różnic w mocy ich promotorów. Moc promotora określona jest jako częstość swoistych inicjacji. Tak oznaczona moc promotora jest oczywiście wartością względną, zależy bowiem

od wielu czynników zmieniających częstość inicjacji w różnych stanach fizjologicznych komórki; zatem zmiana mocy danego promotora może być uznana jako wyraz regulacji transkrypcji na poziomie inicjacji. Porównując moc promotorów *in vitro* na ogół nie wyznacza się bezpośrednio częstości inicjacji, natomiast mierzy się parametry związane współzależnością z mocą promotora a dające się łatwiej wyznaczyć jak np. szybkość powstawania kompleksu polimeraza-promotor (34, 35) bądź szybkość inicjacji poronnej (ang. *abortive initiation*) (36, 37).

Między promotorami istnieje znaczne zróżnicowanie mocy; w przypadku niektórych promotorów fagowych różnice mocy sięgają 2-3 rzędów wielkości (38).

Teoretycznie, najsilniejszym promotorem jest taki, w którym częstość inicjacji zależy jedynie od szybkości elongacji. Przyjmując szybkość elongacji 20 nukleotydów/sek musi upłynąć około 5 sekund aby promotor stał się dostępny dla kolejnej cząsteczki polimerazy. Czas potrzebny na regenerację funkcji promotora (ang. *clearance time*) (37) jest w tym przypadku jedynym czynnikiem ograniczającym częstość inicjacji. Większość promotorów posiada jednak moc znacznie niższą od „*clearance time*”. Najsilniejszymi promotorami prokariotycznymi są promotory genów rybosomalnych (39, 40) oraz promotor operonu laktozowego (41). Ich moc zbliżona jest najbardziej do mocy opisanego wyżej najsilniejszego promotora.

Ze względu na wartość informacyjną sekwencji nukleotydowych w określaniu mocy promotora można wyróżnić dwie klasy promotorów. Do jednej zalicza się te promotory, których moc określana jest wyłącznie przez interakcję ich sekwencji z polimerazą (np. promotory faga T₇), do klasy drugiej zalicza się te promotory, których aktywność zależy od interakcji z białkami regulatorowymi (np. promotor operonu *lac*). Proces inicjacji syntezy RNA dla promotorów klasy pierwszej może być opisany ciągiem równań reakcji:



gdzie E oznacza polimerazę, P — promotor, (EP)_c — kompleks „zamknięty”, (EP)_o — kompleks „otwarty”, E·DNA·RNA — kompleks transkrypcyjny, NTP — rybonukleozydotrójfosforany, k — stałe reakcji: k₁ — szybkość powstawania kompleksu „zamkniętego”, k₋₁ szybkość dysocjacji kompleksu „zamkniętego”, k₂ szybkość izomeryzacji, k₋₂ szybkość dysocjacji kompleksu „otwartego”, k₃ — szybkość inicjacji.

Ponieważ kompleksy „otwarte” charakteryzują się dużą trwałością (czasy półtrwania wahają się od kilku minut do kilkadziesiąt godzin (25, 34) a etap inicjacji jest reakcją najszybszą w podanym ciągu reakcji (t_{1/2} < 1 sek), (42), reakcją decydującą o mocy promotora jest wiązanie polimerazy bądź (i) izomeryzacja kompleksu „zamkniętego”. Taki wniosek znalazł potwierdzenie w wynikach eksperymentalnych (25, 31, 37, 38, 43).

VI. Czynniki modyfikujące moc promotora

Na moc promotorów, oprócz opisanych w poprzednim rozdziale czynników kinetycznych, wpływają również oddziaływania licznych substancji zarówno z sekwencjami promotora jak i z cząsteczką polimerazy. Ekspresja wielu genów regulowana jest przez interakcję promotorów z białkami regulatorowymi z których najlepiej poznano CAP (ang. *catabolite-gene activator protein*) i represory laktozowy, galaktozowy λ i *cro* (44—47). Swoista stymulacja lub inhibicja transkrypcji niektórych genów związana jest z istnieniem różnych form strukturalnych polimerazy, może być również skutkiem modyfikacji podjednostek (podjednostki) cząsteczki enzymu. Czynnikiem decydującym o częstości inicjacji może być także liczba miejsc wiążących polimerazę i liczba miejsc inicjacji w strukturze promotora.

VI-1. CAP i represory

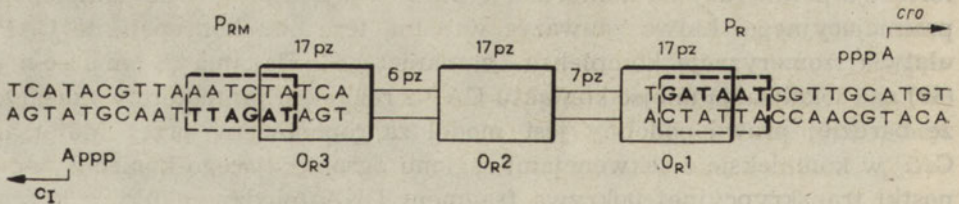
Najbardziej zaawansowane są badania nad interakcją białka CAP z promotorami *lac* i *gal*. W przypadku promotora *lac* kompleks dimeru CAP i cAMP wiąże się z DNA w regionie promotora zwiększając częstość inicjacji transkrypcji, natomiast w nieobecności CAP oddziaływanie polimerazy z promotorem jest bardzo słabe. Wpływ CAP na funkcjonowanie promotora *lac* usiłowano wyjaśnić dwojako. Dickson i wsp. (5) postulowali, że białko to wiąże się z regionem poprzedzającym sekwencje transkrybowane z dala od miejsca wiązania polimerazy tak, że kontakt z cząsteczką enzymu jest niemożliwy. Jednocześnie CAP rozluźnia strukturę dwuniciową DNA w obrębie sekwencji wiążących polimerazę ułatwiając powstanie kompleksu „otwartego”, (preinicjacyjnego). Majors (48) sugerował natomiast, iż miejsca wiązania CAP i polimerazy zbliżone są na tyle, że na skutek bezpośredniego kontaktu obu białek zmienia się konformacja polimerazy na konformację umożliwiającą powstanie kompleksu preinicjacyjnego. Łatwo zauważyć wspólną tezę obu koncepcji, że CAP ułatwia izomeryzację kompleksu „zamkniętego”. Badania Simpsona (49) nad lokalizacją miejsc kontaktu CAP z regionem promotora wykazały, że bardziej prawdopodobny jest model zaproponowany przez Majorsa. CAP w kompleksie z sekwencjami regionu ograniczającego koniec 5' jednostki transkrypcyjnej pokrywa fragment DNA między -70 a -50, co pozwala na interakcję z polimerazą, tym bardziej, że jak wykazano na modelach przestrzennych, oba białka znajdują się po tej samej stronie helisy DNA. W przypadku operonu galaktozowego posiadającego dwa promotory P₁ i P₂, CAP w kompleksie z cAMP wpływa na transkrypcję genów poprzez odmienne oddziaływanie z każdym z promotorów. CAP stymuluje aktywność promotora P₁, hamuje natomiast aktywność promotora

P_2 (10). W nieobecności CAP polimeraza wiąże się słabo z P_1 , natomiast silnie z P_2 . W kompleksie z promotorem CAP pokrywa odcinek DNA zlokalizowany między -50 a -25 , a więc z regionem -35 wiąże się jednocześnie polimeraza i CAP; istniałaby tu więc nieco odmieniona sytuacja niż w przypadku promotora operonu *lac*. T a n i g u c h i i wsp. (50) sugerują, że również operon *lac* może mieć miejsce wiązania CAP w regionie -35 , tak jak ma to miejsce w operonie *gal*. Znalaziono bowiem w okolicy tego regionu sekwencje wspólne dla promotorów obu operonów. Konieczne są jednak dalsze badania w celu wyjaśnienia mechanizmu działania CAP na transkrypcję obu operonów.

Podstawową funkcją CAP jest stymulacja transkrypcji przez zwiększenie mocy promotora, efekt przeciwny wywołany jest przez represor, który wiążąc się z operatorem uniemożliwia powstanie kompleksu inicjacyjnego.

S c h m i t z i G a l a s (4) wykazali, że związanie się represora z operatorem operonu *lac* nie uniemożliwia wiązania się polimerazy z promotorem, chociaż powierzchnia kontaktu polimerazy z sekwencjami promotora znacznie się zmniejsza. Podobnie istnienie kompleksu polimerazy z promotorem nie blokuje wiązania się represora z operatorem. Mimo, że znaczna część sekwencji operatora należy do regionu wiążącego polimerazę w kompleksie inicjacyjnym, nie wiadomo, czy i w jakim stopniu dochodzi do bezpośredniego kontaktu między oboma białkami.

Niezwykle interesujące są wyniki badań mechanizmu zmian mocy promotorów sterujących transkrypcją genów *ci* i *cro* faga λ powodowanych przez represory λ i *cro* (51—53). Badany fragment genomu faga λ (Ryc. 4) zawiera dwa zachodzące na siebie, na długości 82 par zasad, promotory P_R i P_{RM} , które kierują transkrypcją w przeciwnie strony. W regionie promotorów znajdują się trzy sekwencje operatorowe O_{R1} , O_{R2} i O_{R3} o długości 17 par zasad, do których przyłącza się represor λ oraz represor *cro*, białko niezbędne w litycznym wroście faga. Represor λ lub *cro* po związaniu z operatorem O_{R2} zwiększa moc promotora P_{RM} , zmniejszając rów-



Ryc. 4. Struktura regionu promotora dla genów *ci* i *cro* u faga λ .

Prostokątami (linia ciągła) oznaczono schematycznie regiony operatorów. Prostokątami (linia przerywana) oznaczono sekwencje „Pribnow box”. Strzałkami oznaczono początek i kierunek transkrypcji genów *cro* i *ci*. (Produktem genu *cro* jest białko *cro* pełniące funkcję represora i utrzymujące lityczny wzrost faga λ . Produktem genu *ci* jest białko nazywane represorem λ utrzymujące stan lizogenii). Pogrubionymi literami oznaczono fragment sekwencji niekodującego łańcucha DNA. Promotory przedstawiono schematycznie podając jedynie sekwencje nukleotydowe w okolicach miejsc inicjacji. Odległość wyrażono liczbą par zasad (pz).

nocześnie moc promotora P_R . Gdy jednocześnie zajęte są przez represory operatory O_{R1} i O_{R2} moc promotora P_{RM} jest maksymalna. Po związaniu się represorów z operatorem O_{R3} transkrypcja sterowana przez promotor P_{RM} zostaje zahamowana.

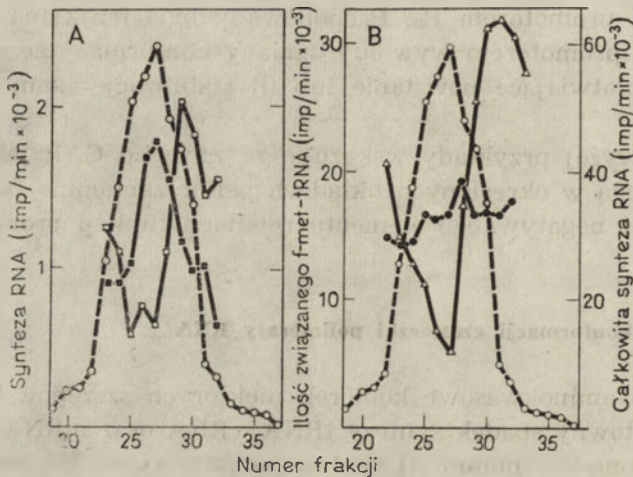
Ponieważ O_{R2} znajduje się o jedną parę zasad bliżej miejsca inicjacji P_R niż P_{RM} , Ptashne i wsp. (47) sugerują, że tak mała różnica w odległości wystarcza, aby represor znajdował się w kontakcie z polimerazą związaną z promotorem P_{RM} , uniemożliwiając jednocześnie połączenie się polimerazy z promotorem P_R . Proponowany model zakłada, że kontakt polimerazy z promotorem wywołuje zmiany konformacyjne w cząsteczce polimerazy ułatwiające powstanie lub (i) stabilizację kompleksu transkrypcyjnego.

Opisane wyżej przykłady wskazują, że zarówno CAP jak i niektóre represory mogą w określonych układach pełnić zamiennie funkcję pozytywnego bądź negatywnego elementu regulacji funkcji promotorów.

VI-2. Zmiana konformacji cząsteczki polimerazy RNA

Głodzenie aminokwasowe komórek niektórych szczepów bakterii powoduje gwałtowny spadek syntezy tRNA, rRNA oraz mRNA kodujących białka rybosomalne, natomiast synteza większości mRNA pozostaje niezmienną (54—56). Tej gwałtownej reakcji układu transkrypcyjnego na brak aminokwasów (ang. „*stringent response*”) towarzyszy znaczny wzrost stężenia nukleotydu ppGpp w komórce (57). Nukleotyd ten oddziałuje z polimerazą RNA i zmienia, w zależności od stężenia, wydajność transkrypcji różnych klas genów (58—60). Badania mechanizmu wybiórczej inhibicji syntezy rRNA *in vitro* sugerują, że polimeraza może występować w kilku formach strukturalnych o odmiennych właściwościach fizycznych i odmiennym powinowactwie do różnych klas promotorów (61, 62), (Ryc. 5). Populacje cząsteczek polimerazy o różnych konformacjach mogących przechodzić w siebie, znajdują się w równowadze, która może być naruszona przez obecność efektorów. Do efektorów indukujących zmiany konformacyjne polimerazy oprócz ppGpp należą ppApp (63) oraz czynniki biorące udział w biosyntezie białka: EE-Tu (64, 65), IF (66), formylometionylo-tRNA (fMet-tRNA) (67, 68), i przypuszczalnie EF-Ts (69). Formylometionylo-tRNA wiąże się z polimerazą hamując syntezę tRNA i rRNA z jednoczesną stymulacją niektórych mRNA podobnie jak ppGpp. Nukleotyd ppApp wywołuje natomiast efekt przeciwny do ppGpp. Czynniki IF-2 stymuluje syntezę genów rybosomalnych nie zmieniając istotnie poziomu syntezy innych klas RNA. Czynniki EF-TS hamuje aktywność polimerazy natomiast co do czynnika EF-Tu doniesienia są sprzeczne. Doniesiono zarazem o stymulacji syntezy rRNA (64, 65) jak i o braku jakiegokolwiek swoistego efektu (69).

Rozpoznanie niektórych promotorów przez określoną formę polimerazy może być skutkiem silnego powinowactwa tej formy do określonej sekwencji nukleotydowej w DNA. Poszukując wspólnych cech strukturalnych promotorów, których moc regulowana jest *in vivo* mechanizmem „stringent response” nie stwierdzono korelacji między optymalnym wykorzystywaniem promotorów przez określoną subpopulację cząsteczek po-



Ryc. 5. Heterogenność polimerazy RNA z *E. coli*.

Występowanie heterogenii konformacyjnej polimerazy RNA wykryto wirując oczyszczony preparat enzymu w gradiencie glicerolowym 15–30% i wykazując że polimeraza w różnych frakcjach gradientu posiada odmienne powinowactwo do tego samego promotora oraz różną zdolność wiązania f-Met-tRNA. Inkubacja frakcji gradientu w 37°C prowadzi do zniszczenia istniejącej równowagi między różnymi konformacjami polimerazy. (○) skala po lewej stronie, całkowita aktywność polimerazy mierzona na matrycy DNA z grasicy cielecej.

A. Synteza RNA na mieszaninie matryc zawierających promotor genu kodującego supresorowy tRNA tyrozyny (su_{11}^{\dagger} tRNA (■)) i zmutowany promotor laktozowy (*lac* UV5) (□). (Sekwencja nukleotydowa promotora UV5 patrz Ryc. 2).

B. Wiązanie się znakowanej siarką [^{35}S]fMet-tRNA z polimerazą po 1 minucie (Δ) i 30 minutach (●) inkubacji w 37°C. Według Traversa i wsp. (62).

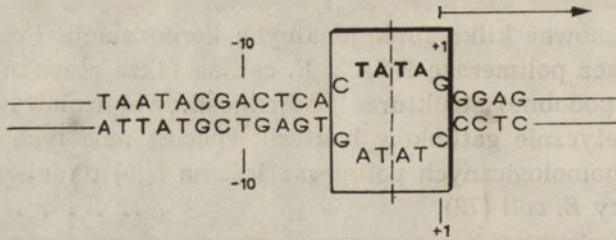
limerazy a homologią sekwencji w regionach -10 i -35 (62). Natomiast znaleziono, że promotory te posiadają w regionie od -5 do $+1$ sekwencje $\text{C}_{gg}^{\text{cc}} \text{CCC}$ o dużym stopniu homologii (od 4/6 do 6/6) podczas gdy inne promotory tej sekwencji nie mają (70, 71). W celu sprawdzenia znaczenia funkcjonalnego tej sekwencji porównano wpływ ppGpp na transkrypcję fragmentów DNA zawierających promotor tRNA^{Tyr} o sekwencji CGCCCCGCTT w regionie -5 do $+5$ i zmodyfikowany chemicznie promotor o sekwencji CGTTAAGCTT w tym regionie. Okazało się, że zmiana sekwencji pociąga za sobą zmianę w sposobie reagowania układu transkrypcyjnego na obecność ppGpp. Wykazano również, że każdy z promotorów transkrybowany jest przez odmienne subpopulacje polimerazy.

VI-3. Zmiana składu podjednostkowego polimerazy RNA

W poprzednich rozdziałach przedstawiono oddziaływania promotorów bakteryjnych i fagowych z polimerazą RNA *E. coli*, enzymem o ściśle zdefiniowanym składzie chemicznym i strukturze podjednostkowej $\beta\beta'\alpha_2\sigma$, mogącej przyjmować kilka funkcjonalnych konformacji. Promotory rozpoznawane przez polimerazę RNA z *E. coli* są także rozpoznawane przez polimerazy o podobnej strukturze podjednostkowej izolowane z innych, odległych genetycznie gatunków bakterii, chociaż moc tych promotorów względem niehomologicznych polimeraz jest na ogół mniejsza niż względem polimerazy *E. coli* (72).

Promotory niektórych genów rozpoznawane są przypuszczalnie jedynie przez cząsteczki polimerazy o zmienionym składzie podjednostkowym. Zjawisko progresywnego, selektywnego włączania i wygaszania transkrypcji określonych genów spowodowane pojawianiem się nowych form polimerazy RNA zostało najlepiej poznane u fagów SPO1, T₄ i T₇. W początkowej fazie cyklu litycznego faga SPO1 ekspresji ulegają wczesne geny (ang. *early genes*), których promotory rozpoznawane są przez niezmodyfikowane polimerazy gospodarza (*Bacillus subtilis*). Jednym z produktów wczesnej transkrypcji jest białko gp 28 o masie cząsteczkowej 37 000, które zastępuje czynnik σ w cząsteczce polimerazy gospodarza (73, 74). Zmodyfikowana polimeraza rozpoznaje swoiście promotory pośrednich genów (ang. *middle genes*) (75—78). W tej fazie transkrypcji pojawiają się między innymi produkty białkowe genów 33 i 34 faga, które wiążąc się z polimerazą powodują, że zaczyna ona transkrybować późne geny (ang. *late genes*) (79, 80). Wewnętrzna organizacja promotorów rozpoznawanych przez zmodyfikowaną polimerazę nie różni się istotnie od promotorów rozpoznawanych przez polimerazę gospodarza jednak zarówno *in vivo* jak i *in vitro* każda z form polimerazy tworzy funkcjonalne kompleksy preinicjacyjne z odmiennymi klasami promotorów (81). Podobnie u faga T₄ polimeraza gospodarza (*E. coli*) transkrybuje wczesne geny, następnie do polimerazy gospodarza przyłącza się kilka polipeptydów pochodzenia fagowego (82—84) a podjednostki α ulegają modyfikacji enzymatycznej poprzez przyłączenie do każdej z nich wiązaniem kowalencyjnym dwufosforybozyloadenozyny (85, 86). Tak zmodyfikowana polimeraza transkrybuje późne geny faga, jednocześnie inicjacja transkrypcji wielu genów gospodarza zostaje zablokowana (87). Interesujący wariant transkrypcji „zaprogramowanej” występuje u faga T₇. Wczesne geny faga T₇ podobnie jak w poprzednich przykładach transkrybowane są przez polimerazę gospodarza (*E. coli*) (88). Jednym z produktów wczesnej transkrypcji jest polimeraza T₇, polipeptyd o masie cząsteczkowej 107 000 kodowany przez gen 1 faga. Nowa polimeraza transkrybuje późne geny faga (89—92). Również *in vitro* polimeraza gospodarza i polimeraza T₇ tworzą funkcjonalne kompleksy preinicjacyjne z odmiennymi klasami promotorów (93). Usta-

lono sekwencje nukleotydowe ośmiu promotorów rozpoznawanych przez polimerazę T_7 (93—96). Posiadają one identyczną sekwencję nukleotydową o długości 22 par zasad (Ryc. 6). W porównaniu z promotorami rozpo-

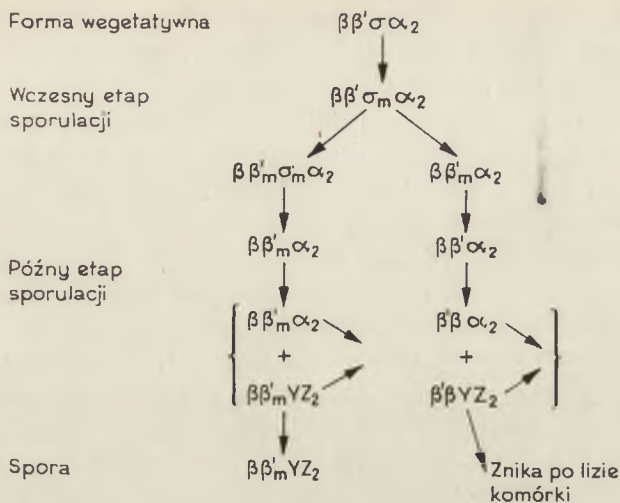


Ryc. 6. Sekwencje promotora rozpoznawanego przez polimerazę T_7 .

Prostokątami oznaczono region o podwójnej symetrii zawierający sekwencje palindromowe. Zaburzenie struktury drugorzędowej fragmentu promotora spowodowane przez powstanie kompleksu „otwartego” (97) zaznaczono rozdzieleniem łańcucha DNA. Pogrubionym drukiem zaznaczono sekwencję TATA w łańcuchu niekodującym będącą przypuszczalnie odpowiednikiem „Pribnow box” w promotorach rozpoznawanych przez polimerazę *E. coli*. Strzałką oznaczono początek i kierunek transkrypcji.

znawanymi przez polimerazę *E. coli* można zauważyć brak charakterystycznych homologicznych sekwencji w regionach -35 i -10 . Przypuszczalnie funkcje sekwencji „Pribnow box” w promotorach dla polimerazy T_7 pełni sekwencja TATA zlokalizowana między -1 a -4 nukleotydem. Sekwencja ta stanowi jednocześnie fragment promotora ulegający denaturacji w czasie powstawania kompleksu preinicjacyjnego.

Progresywną zmianę składu podjednostkowej polimerazy RNA zaobserwowano także podczas sporulacji bakterii *Bacillus thuringiensis* (98—101). W początkowym etapie sporulacji czynnik σ jest zastępowany nową podjednostką. Dalej w miarę postępu sporulacji ulega modyfikacji (prawdopodobnie na skutek proteolizy (102)) podjednostka β' , znikają podjednostki α a pojawiają się nowe polipeptydy (Ryc. 7). Hall i Denwang i Losick (104) wykazali, że zastąpienie czynnika σ przez polipeptyd p^{37} (σ' lub σ^{37}) o masie cząsteczkowej 37 000 pociąga za sobą selektywną transkrypcję *in vitro* genu aktywowanego we wczesnym etapie sporulacji (gen 0,4 kb). Również polimeraza z *Bacillus subtilis* zawierająca zmodyfikowaną podjednostkę σ^{37} rozpoznaje promotory o odmiennej sekwencji nukleotydowej w porównaniu z polimerazą niezmodyfikowaną (104). Jest zatem możliwe że każda z form strukturalnych polimerazy RNA, pojawiających się na kolejnych etapach sporulacji transkrybuje odmienne klasy genów na skutek różnego powinowactwa do promotorów tych genów. Polimerazy o zmienionej podstawowej strukturze podjednostkowej wyizolowano również z niektórych szczepów bakterii *E. coli* w warunkach głodzenia (105) oraz z wegetatywnych form bakterii *E. coli* i *B. subtilis* (106, 107). Rola modyfikacji struktury podjednostkowej polimerazy RNA w cyklu życiowym bakterii niezainfekowanych fagami nie jest w pełni



Ryc. 7. Zmiana składu podjednostkowego polimerazy RNA w czasie sporulacji bakterii *B. thuringiensis*.

Litera m przy podjednostce oznacza, że dana podjednostka uległa modyfikacji lub zmianie. Kierunki strzałek oznaczają wzrost (↗) lub spadek (↘) stężenia danej formy polimerazy. Rycina wykonana wg Klier i wsp. (99).

wyjaśniona. Nie jest wykluczone, że oprócz enzymu podstawowego istnieje szereg wariantów strukturalnych polimerazy występujących w nieznacznych ilościach lecz o istotnym znaczeniu w regulacji procesu transkrypcji.

VII. Promotory genów rybosomalnych

Jak wspomniano najsilniejszymi promotorami są promotory genów rybosomalnych. W czasie wzrostu bakterii cząsteczki polimerazy RNA transkrybującej geny rybosomalne upakowane są na matrycy bardzo gęsto tak, że szybkość syntezy RNA zależy praktycznie od szybkości elongacji (40, 108). Jednocześnie Travers (109) spostrzegł, że podczas transkrypcji genów rybosomalnych *in vitro*, wraz ze wzrostem temperatury inkubacji, liczba polimeraz inicjujących syntezę RNA nie wzrasta w sposób ciągły według krzywej sigmoidalnej jak dla innych promotorów, lecz zmiany zachodzą skokowo osiągając 5-6 dyskretnych, wzrastających wartości. Dane te wskazywały, że może istnieć szereg miejsc wiążących polimerazę (nazwanych przez Traversa subpromotorami) a regulacja transkrypcji genów rybosomalnych może być kontrolowana przez wykorzystywanie różnej liczby subpromotorów. W genomie *E. coli* znajduje się siedem operonów zawierających geny robosomalne (110, 111). Dla pięciu z nich oznaczonych *rrnB*, *rrnX*, *rrnD*, *rrnA* i *rrnE* ustalono sekwencje nukleotydowe regionów poprzedzających sekwencje kodujące RNA (112—114). Posiadają one jednakową organizację wewnętrzną a ich sekwencje w znacznym

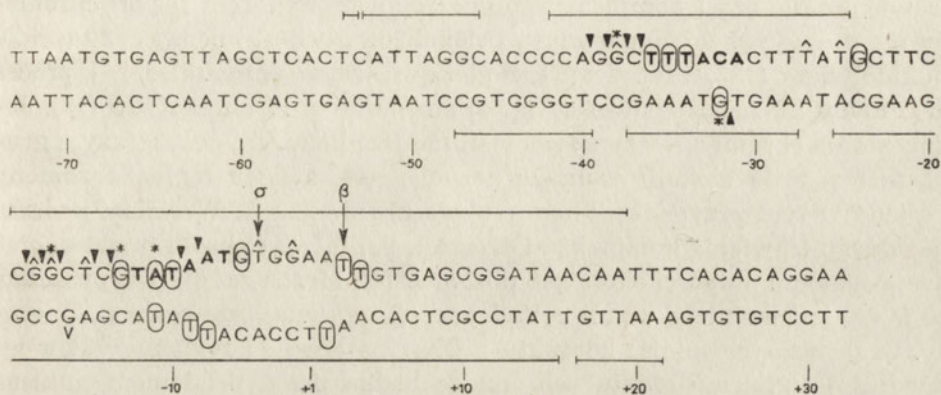
stopniu są homologiczne. W każdym operonie synteza rRNA może być inicjowana w dwóch miejscach, oznaczonych S_1 i S_2 , oddalonych od siebie o około 120 par zasad. Każde z miejsc inicjacji poprzedzone jest sekwencjami charakterystycznymi dla „Pribnow box”. Inicjacja zachodzi częściej w miejscu S_1 mimo, że polimeraza tworzy silniejszy kompleks z promotorem kierującym inicjacją w miejscu S_2 . Unikalną cechą regionów poprzedzających jednostkę transkrypcyjną warunkującą przypuszczalnie szybkość inicjacji syntezy rRNA jest istnienie wielu miejsc wiążących polimerazę RNA. Kiss i wsp. (115) metodą mikroskopii elektronowej zidentyfikowali 5 takich miejsc oddalonych od miejsca inicjacji S_1 odpowiednio o około 260, 460, 640, 820 i 1120 par zasad. Jednocześnie analizując sekwencje opisanego regionu (114) zauważono obecność stosunkowo regularnie rozmieszczonych bloków sekwencji charakterystycznych dla regionu -35 „idealnego” promotora. Nie ma jednak korelacji między lokalizacją tych sekwencji a lokalizacją miejsc wiążących polimerazę wykrytych mikroskopowo. Ponadto, nie jest jasny związek między obserwowanymi miejscami wiązania a strukturami nazwanymi przez Traversa subpromotorami, trudno zatem jednoznacznie stwierdzić czy i które z tych miejsc mają znaczenie funkcjonalne. Mimo tych niejasności przyjmuje się, że dzięki wielu miejscom wiążącym polimerazę region ograniczający koniec 5' genów rybosomalnych może jednocześnie wiązać znaczną liczbę cząsteczek polimerazy RNA. Cząsteczki polimerazy „wędrują” następnie wzdłuż cząsteczki DNA w kierunku „TATAA box”, gdzie powstaje kompleks preinicjacyjny.

VIII. Miejsca kontaktu polimerazy RNA z promotorem i struktura przestrzenna kompleksu

Struktura przestrzenna kompleksu preinicjacyjnego nie jest znana. Nieco informacji o wzajemnym rozmieszczeniu polimerazy i DNA w kompleksie uzyskano określając w sekwencji promotora pozycję tych puryn, tymin i reszt fosforanowych, które decydują o swoistości wiązania polimerazy. Wykorzystano w tym celu reakcje chemiczne modyfikujące DNA a mianowicie metylowanie azotu reszt guaninowych i adeninowych siarczanem dwumetylu (116) etylowanie grup fosforanowych etylnitrozomocznikiem (117) i reakcją fotochemicznej degradacji DNA w którym w miejsce tyminy podstawiono 5-bromouracyl (118). Prowadząc reakcje modyfikacji przed i po związaniu polimerazy z promotorem można określić grupy, które są chronione przed modyfikacją w obecności białka, grupy których reaktywność wzrasta w obecności polimerazy oraz te których modyfikacja uniemożliwia powstanie kompleksu polimerazy z promotorem.

Miejsca kontaktu tymin, puryn i fosforanów promotora *lac UV5 E. coli*

z polimerazą RNA pokazano na Ryc. 8. Analogiczne badania wykonano dla oddziaływań polimerazy z promotorem A₃ faga T₇ posiadającego odmienną niż promotor UV5 sekwencję nukleotydową (122). Analizy roz-

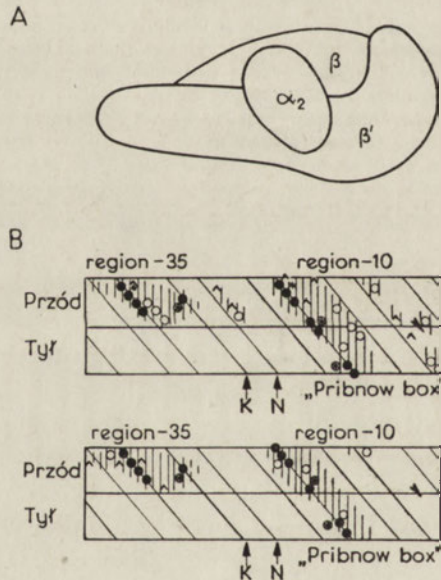


Ryc. 8. Miejsca kontaktu polimerazy RNA z DNA w regionie promotora.

Dane przedstawione na rycinie są kompilacją wyników opublikowanych w pracach (4, 15, 22, 29, 119). (\blacktriangledown) grupy fosforanowe, których etylacja blokuje wiązanie się polimerazy. (*) puryny, których metylacja blokuje wiązanie się polimerazy. (O) puryny chronione przed metylacją i tyminy (podstawione 5-bromouracylem) chronione przed reakcją fotochemiczną. (\blacktriangle) puryny o zwiększonej podatności na metylację i tyminy (podstawione 5-bromouracylem) ekspozowane na działanie promieni UV. Zaburzenie drugorzędowej struktury DNA fragmentu promotora spowodowane powstaniem kompleksu „otwartego” zaznaczono rozdzieleniem łańcuchów DNA. Tłustym drukiem wyróżniono sekwencje TATAA i sekwencję homologiczną do sekwencji regionu -35 promotora „idealnego”. Strzałkami zaznaczono pozycje tymin, których podstawienie 5-bromouracylem umożliwiła fotochemiczne związanie podjednostek σ i β z DNA. Liniami ciągłymi pod i nad sekwencją promotora zaznaczono fragmenty chronione przed działaniem DNazy I. Według Siebenlist i wsp. (15).

kładu przestrzennego miejsc kontaktu polimerazy z obu promotorami (Ryc 9B) wykazała, że zagęszczają się one w dwu obszarach, w regionie -35 i regionie zawierającym „Pribnow box”. Interesujące jest występowanie wielu miejsc kontaktu na lewo od sekwencji TATAA chociaż brak jest w tym regionie homologii między sekwencjami poznanych promotorów. Układ przestrzenny punktów kontaktu pozwala sądzić, że cząsteczka polimerazy styka się wyłącznie z jedną stroną podwójnej helisy DNA, przynajmniej na długości od -44 do -13 nukleotydu regionu, poprzedzającego miejsce inicjacji. Występują także oddziaływania polimerazy z miejscami zlokalizowanymi po drugiej stronie podwójnej helisy DNA, w regionie „Pribnow box” i na prawo od tej sekwencji. Siebenlist i wsp. (15) sądzą, że są one wyrazem zmian w przestrzennej strukturze DNA w tym regionie i do kontaktu z polimerazą dochodzi dopiero po rozpleceniu dwuniciowej struktury DNA w momencie powstawania kompleksu preinicjacyjnego („otwartego”). Ułożenie przestrzenne polimerazy względem DNA w kompleksie preinicjacyjnym może być na razie jedynie przedmiotem spekulacji. Biorąc pod uwagę rozmiary cząsteczki polimerazy

(120) wydaje się, że ułożenie polimerazy liniowe, równoległe do osi podwójnej spirali DNA jest mało prawdopodobne. Długość cząsteczki polimerazy wynosi około 150 Å (Ryc. 9A) co przy liniowym ułożeniu pozwalałoby na pokrycie około 40-45 par zasad. Rzeczywiście, przy intensywnym trawieniu DN-azą I kompleksu polimerazy z promotorem region chroniony ma długość około 40 par zasad i zlokalizowany jest między -20 a +20 nukleotydem (123, 124). Jeśli kompleks trawiono egzonukleazą I proces degradacji DNA postępował od lewej strony do -44 nukleotydu (15). Jednocześnie ci sami autorzy znajdowali miejsce kontaktu polimerazy z grupą fosforanową zlokalizowaną w pozycji -44, a więc region chroniony posiada w tym przypadku długość około 210 do 220 Å. Wreszcie, podczas łagodnego trawienia kompleksu DN-azą I, polimeraza chroni przed degradacją region o długości około 240 do 270 Å (4). Można zatem przypuszczać, że DNA jest owinięty wokół cylindrycznej, sztywnej cząsteczki polimerazy. Brak licznych miejsc kontaktu z DNA na lewo od regionu -34 a jednocześnie istnienie efektu ochronnego białka przed działaniem nukleaz może świadczyć o niezbyt silnej interakcji między polimerazą a DNA w tym regionie.



Ryc. 9. Struktura polimerazy i regiony promotorów o największym prawdopodobieństwie kontaktu z polimerazą.

- A. Schematyczny model rozmieszczenia podjednostek w cząsteczce polimerazy RNA. Według Tsui i wsp. (120).
- B. Odzworowanie na płaszczyźnie cylindrycznej powierzchni cząsteczek DNA (10,5 par zasad) skręt spirali DNA (121) zawierających promotory *lac UV 5 E. coli* (u góry) i *A₂ faga T₄* (u dołu). (N) oznacza łańcuch niekodujący, (K) — łańcuch kodujący DNA. Symbole oznaczające miejsca kontaktu polimerazy z DNA są takie same jak na Ryc. 8 z tym, że miejsca kontaktu z grupami fosforanowymi oznaczono symbolem (●). Zaciemniono regiony helisy DNA o największym prawdopodobieństwie kontaktu z polimerazą. Cząsteczki polimerazy i DNA przedstawiono względem siebie w skali 1:1. Według Siebenlist i wsp. (15).

Badania struktury przestrzennej kompleksu polimerazy z promotorem znajdują się we wstępnej fazie. Głównymi przeszkodami w szybkim postępie prac są niewątpliwie wielkość oddziaływujących ze sobą cząsteczek oraz możliwość indukowania nieokreślonych zmian konformacyjnych metodami stosowanymi w badaniach.

Zaakceptowano do druku 9.07.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Scaife J., Beckwith J. R., (1966), *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **31**, 403—408.
2. Epstein W., Beckwith J. R., (1968), *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 411—426.
3. Travers A., (1974), *Cell*, **3**, 97—104.
4. Schmitz A., Galas D. J., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 111—137.
5. Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., Reznikoff W. S., (1975), *Science*, **187**, 27—35.
6. Valentin-Hansen P., Hammer-Jespersen K., Buxton R. S., (1979), *J. Mol. Biol.*, **133**, 1—17
7. Korobko V. G., Chupilo S. A., Gracher S. A., Kolosow M. W., (1978), *Bioorg. Khim.*, **4**, 1692—1694
8. Siebenlist U., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1895—1907
9. Studier F. W., Rosenberg A. H., Simon M. N., Dunn J. J., (1979), *J. Mol. Biol.*, **135**, 917—937
10. Musso R. E., Lawro R., Adhya S., Crombrughe B., (1977), *Cell*, **12**, 847—854
11. Burgess R. R., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 711—740
12. Schaller H., Gray C., Hermann K., (1975), *Prog. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 737—741
13. Pribnow D., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 419—443
14. Scherrer G. E. F., Walkinshaw M. D., Arno H. S., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3759—3774
15. Siebenlist U., Simpson R. B., Gilbert W., (1980), *Cell*, **20**, 269—281
16. Dunn R. J., Belagaje R., Brown E. L., Khorana H. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6109—6118
17. Chamberlin M. I., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 721—775
18. Belintsev B. N., Zavriev S. K., Shemyakin M. F., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1391—1404
19. Wang J. C., Jacobson J. H., Saucier J. M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1225—1241
20. Melnikova A., Beabealashvilli R., Mirzabekov A. D., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 301—309
21. Hsieh T., Wang J. C., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3337—3345
22. Siebenlist U., (1979), *Nature*, **279**, 651—652
23. Tsui S., Takanami M., Imahori K., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 715—724
24. Par C. S., Hillel Z., Wu C. N., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5895—5912
25. Seeburg P. H., Nüsslein Ch. Schaller H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **74**, 107—113
26. Heyden B., Nüsslein C., Schaller H., (1972), *Nature New Biol.*, **240**, 9—12

27. Schaller H., Gray C., Herrmann K., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 737—741
28. Calos M., (1978), *Nature*, **273**, 762—765
29. Johnsrud L., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5314—5318
30. Stefano J. E., Ackerson J. W., Gralle J. D., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2709—2723
31. Maquat L. E., Reznikoff W. S., (1978), *J. Mol. Biol.*, **125**, 467—490
32. Okamoto T., Sugimoto K., Sugisaki H., Takanami M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 2213—2222
33. Rodriguez R. L., Wost R. W., Heyneker H. L., (1979), **6**, 3267—3287
34. Hinkle D. C., Chamberlin M. I., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 157—185
35. Nüsslein C., Schaller H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **56**, 563—569
36. McClure W. R., Cech C. L., Johnston D. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8941—8948
37. McClure W. R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 5634—5638
38. von Gabain A., Bujard H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 189—193
39. Pace N. R., (1973), *Bacteriol. Rev.*, **37**, 562—603
40. Nomura M., (1977), *Ann. Rev. Genet.*, **11**, 279—347
41. Kennel P., Reizman H., (1977), *J. Mol. Biol.*, **114**, 1—21
42. Nierman W. C., Chamberlin M. J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7921—7926
43. Stahl S. J., Chamberlin M. J., (1977), *J. Mol. Biol.*, **112**, 577—601
44. Engelsberg E., Wilcox G., (1974), *Ann. Rev. Genet.*, **8**, 219—242
45. Mitra S., Zubay G., Landy A., (1975), *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **67**, 857—863
46. Bourgeois S., Pfahl M., (1976), *Adv. Protein Chem.*, **30**, 1—99
47. Ptashne M., Jeffrey A., Johnson A. D., Maurer R., Meyer B. J., Pabo C. O., Roberts T. M., Sauer R. T., (1980), *Cell*, **19**, 1—11
48. Majors J., (1975), *Nature*, **256**, 672—674
49. Simpson R. B., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 759—766
50. Taniguchi T., O'Neill M., de Grombroughe B., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5090—5094
51. Maurer R., Meyer R. J., Ptashne M., (1980), *J. Mol. Biol.*, **139**, 147—161
52. Meyer B. J., Maurer R., Ptashne M., (1980), *J. Mol. Biol.*, **139**, 163—194
53. Meyer B. J., Ptashne M., (1980), *J. Mol. Biol.*, **139**, 195—205
54. Stomato T. D., Pettijohn D. E., (1971), *Nature New Biol.*, **234**, 99—102
55. Ikemura T., Dahlberg J. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5033—5041
56. Dennis P., Nomura M., (1975), *Nature*, **255**, 460—465
57. Cashel M., Gallant J., (1969), *Nature*, **221**, 838—841
58. Travers A. A., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **147**, 225—232
59. von Ooyen A. J. J., Gruber M., Jorgensen P., (1976), *Cell*, **8**, 123—128
60. Debenham P., Travers A. A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **72**, 515—523
61. Travers A. A., (1976), *Nature*, **263**, 641—646
62. Travers A. A., Buckland R., Debenham P. G., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1656—1662
63. Travers A. A., (1978), *FEBS Lett.*, **94**, 345—348

64. Travers A. A., Kamen R. I., Schleif R. F., (1970), *Nature New Biol.*, **228**, 748—751
65. Travers A. A., (1973), *Nature*, **244**, 15—18
66. Travers A. A., Debenham P. G., Pongs O., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1651—1656
67. Pongs O., Ulbrich N., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3064—3067
68. Debenham P. G., Pongs O., Travers A. A., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 870—874
69. Biebricher C. K., Druminski M., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 866—869
70. Travers A. A., (1980), *J. Bacteriol.*, **141**, 973—976
71. Travers A. A., (1980), *J. Mol. Biol.*, **141**, 91—97
72. Wiggs J. L., Busch J. W., Chamberlin M. J., (1979), *Cell*, **16**, 97—109
73. Pero J., Nelson J., Fox T. D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1589—1593
74. Duffy J. J., Geiduschek E. P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4530—4541
75. Fox T. D., Losick R., Pero J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **101**, 427—433
76. Duffy J. J., Geiduschek E. P., (1977), *Nature*, **270**, 28—32
77. Talkington C., Pero J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1185—1189
78. Spiegelman G. B., Whiteley H. R., (1978), *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **81**, 1058—1065
79. Fox T. D., (1976), *Nature*, **262**, 748—753
80. Tjian R., Pero J., (1976), *Nature*, **262**, 753—757
81. Talkington C., Pero J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5465—5469
82. Horvitz H. R., (1973), *Nature New Biol.*, **244**, 137—140
83. Ratner D. J., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 803—807
84. Stevens A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 603—607
85. Walter G., Seifart W., Zillig W., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **30**, 240—247
86. Goff C. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6181—6190
87. Rabussay D., Geiduschek P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5305—5309
88. Mailhammer R., Yang H. L., Reiness G., Zubay G., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4928—4932
89. Siegel R. B., Summers W. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **49**, 115
90. Chamberlin M., McGrath J., Waskell L., (1970), *Nature*, **228**, 227—231
91. Summers W. C., Siegel R. B., (1970), *Nature*, **228**, 1160—1162
92. Golomb M., Chamberlin M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2858—2863
93. Oakley J. L., Strothkamp R. E., Sarris A. H., Coleman J. E., (1979), *Biochemistry*, **18**, 528—537
94. Oakley J. L., Coleman J. E., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4266—4270
95. Rosa M. D., (1979), *Cell*, **16**, 815—825
96. Panayotatos N., Wells R. D., (1979), *Nature*, **280**, 35—39
97. Strothkamp R. E., Oakley J. L., Coleman J. E., (1980), *Biochemistry*, **19**, 1074—1080
98. Losick R., Shorenstein R. G., Sonenshein A. L., (1970), *Nature*, **227**, 910—913

99. Klier A. F., Lecadet M. M., Dedonder R., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **36**, 317—327
100. Klier A., Lecaded M. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 111—119
101. Tjian R., Losick R., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2872—2876
102. Leighton T. J., Doi R. H., Warren R. A. J., Kelln R. A., (1973), *J. Mol. Biol.*, **76**, 103—122
103. Haldenwang W. G., Losick R., (1979), *Nature*, **282**, 256—260
104. Moran C. P., Lang N., Losick R., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 5979—5986
105. Reeh S., Pederson S., Triesen J. D., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **149**, 279—289
106. Ishihama A., Saitoh T., (1979), *J. Mol. Biol.*, **129**, 517—530
107. Jaehning J. A., Wiggs J. L., Chamberlin A. J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5470—5474
108. Oostra B. A., van Ooyen A. J. J., Gruber M., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **152**, 1—6
109. Travers A. A., (1976), *Cell*, **8**, 605—609
110. Kies A., Sain B., Venetianer P., (1977), *FEBS Lett.*, **79**, 77—79
111. Kenerley M. E., Morgan E. A., Post L., Lindahl L., Nomura M., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 931—949
112. de Boer H. A., Gilbert S. F., Nomura M., (1979), *Cell*, **17**, 201—209
113. Young R. A., Steitz J. A., (1979), *Cell*, **17**, 225—234
114. Csordas-Toth E., Boros I., Venetianer P., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 2189—2197
115. Kiss I., Boros I., Udvardy A., Venetianer P., Delius H., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **609**, 435—447
116. Lawley P. D., Brooks P., (1963), *Biochem. J.*, **89**, 127—138
117. Sun L., Singer B., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1795—1802
118. Hutchinson F., (1973), *Quant. Rev. Biophys.*, **6**, 201—246
119. Simpson R. B., (1979), *Cell*, **18**, 277—285
120. Tsuji S., Imahori K., Nonomura Y., (1981), *J. Biochem.*, **89**, 1903—1912
121. Wang J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 200—203
122. Siebenlist U., Gilbert W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 122—126
123. Schaller H., Gray C., Herman R., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 737—741
124. Heyden B., Nüsslein C., Schaller H., (1972), *Nature New Biol.*, **96**, 9—12

SABINA GRÖBNER *)

Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej

The Properties and Function of High Mobility Group Proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Ogólne właściwości białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej
 - II-1. Oddziaływanie białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej z DNA
 - II-2. Wiązanie białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej z nukleosomami
- III. Funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej w chromatynie

Contents

- I. Introduction
- II. General Properties of High Mobility Group Proteins
 - II-1. Interaction between High Mobility Group Proteins and DNA
 - II-2. Binding of High Mobility Group Proteins to Nucleosomes
- III. Function of High Mobility Group Proteins in Chromatin

I. Wstęp

Heterogenne białka niehistonowe stanowią istotny składnik chromatyny. Obejmują one m.in. białka strukturalne oraz białka o charakterze enzymatycznym (1—4). Białka niehistonowe od dawna budzą zainteresowanie badaczy ze względu na potencjalną możliwość występowania wśród nich białek biorących udział w regulacji aktywności genów. Początkowe

*) Mgr biologii, Zakład Biologii Nowotworów, Instytut Onkologii, 44-100 Gliwice

Wykaz stosowanych skrótów: białka HMG — białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej (*high mobility group proteins*); białko HD — białko destabilizujące DNA (*helix destabilizing protein*).

próby izolowania białek niehistonowych z kompleksu chromatynowego kończyły się jednak niepowodzeniem. Białka niehistonowe ulegają bowiem łatwo agregacji, przechodząc w formy nierozpuszczalne. W 1973 roku Goodwin i wsp. (5) opisali metodę frakcjonowania białek niehistonowych poprzez ekstrakcję chromatyny 0,35 M roztworem chlorku sodu. W ekstrakcie autorzy wyróżnili dwie frakcje białek niehistonowych różniące się ruchliwością elektroforetyczną w 20% żelu poliakryloamidowym w pH 2,4: białka o małej ruchliwości elektroforetycznej oraz białka o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej, nazwane białkami HMG (ang. „*high mobility group*”) (5—7). Z całkowitej puli białek ekstrahujących się 0,35 M roztworem chlorku sodu oddzielono białka HMG, wykorzystując ich rozpuszczalność w 2% roztworze kwasu trójchlorooctowego. Wyizolowane białka HMG pozostają rozpuszczalne i nadają się do dalszych badań. Wczesne prace donosiły o wykryciu kilkunastu różnych białek typu HMG (5, 8). Ostatecznie wykazano, że najbardziej rozpowszechnione w chromatynie wyższych organizmów eukariotycznych są cztery białka HMG oznaczone symbolami HMG1, HMG2, HMG14, HMG17 (9—15). Źródłem zaobserwowanej początkowo niejednorodności białek HMG mogą być na przykład produkty ich degradacji (16—19), obecność ubikwityny (20, 21) lub niewielkich ilości innych dotąd nie zidentyfikowanych białek niehistonowych (22). Nie bez znaczenia wydaje się także fakt, że białka te mogą ulegać modyfikacjom, a więc acetylacji (14, 23—25), fosforylacji (8, 26—32), metylacji (33), rybozylacji (34).

II. Ogólne właściwości białek HMG

Białka HMG izoluje się ekstrahując chromatynę 0,35 M roztworem chlorku sodu. Są rozpuszczalne w 5% roztworze kwasu nadchlorowego (10, 16, 35) i 2% roztworze kwasu trójchlorooctowego (9, 36), co wykorzystuje się w procesie izolacji białek HMG. Białka HMG można odzyskać z roztworu przez wytrącenie 6 objętościami acetonu (37) lub 10% roztworem kwasu trójchlorooctowego (5). Rozdziału białek HMG na poszczególne frakcje dokonuje się metodą chromatografii jonowymiennej na kolumnach zawierających CM-Sephadex (6, 13).

Białka HMG charakteryzują się stosunkowo niewielkim ciężarem cząsteczkowym w granicach 7000 do 30 000 daltonów (38—41). Przebadano pierwszorzędową strukturę białek HMG1 i HMG2 (37, 42, 43), białka HMG14 (10), białka HMG17 (44—46) oraz białek HMG-T (36, 47) i H6 (48), stanowiących w komórkach jąder pstrąga odpowiednik białek HMG ssaków. Posiadają charakterystyczny skład aminokwasowy, zawierają bowiem w przybliżeniu 25% zasadowych i 30% kwaśnych aminokwasów (9). Występują w tkankach zwierzęcych (5, 9, 10, 13, 36, 49—53), a także drożdżach i tkankach roślin wyższych (15, 54). Cechuje je słaba specyficzność

tkankowa i gatunkowa (11, 13, 55). Wyjątkiem są tutaj wyizolowane z chromatyny jąder pstrąga dwa białka zaszeregowane na podstawie własności takich jak podatność na ekstrakcję 0,35 M roztworem chlorku sodu, skład aminokwasowy, niewielki ciężar cząsteczkowy do białek HMG (36, 56). Pierwsze, białko HMG-T, analogiczne z białkami HMG1 i HMG2 (46), posiada ciężar cząsteczkowy zbliżony do ciężaru cząsteczkowego tych białek, wynoszący 28 700 daltonów. Białko HMG-T rozdzielono ostatnio na dwie podfrakcje: HMG-T1 i HMG-T2 (57—60). Z porównania N-końcowych sekwencji białek HMG-T z odnośnymi sekwencjami białek HMG1 i HMG2 z grasicy cielęcia wynika, że z pierwszych 25 aminokwasów 21 aminokwasów jest wspólnych dla białek HMG1 i HMG2, a 12 dla białek HMG1, HMG2 i HMG-T (36, 47). Drugie, swoiste dla komórek jąder pstrąga białko H6 o ciężarze 7200 daltonów zastępuje białka HMG14 i HMG17 w komórkach jąder pstrąga (48, 61). Wykazano jednak, że odmienność białek HMG pstrąga ma raczej podłoże filogenetyczne, ponieważ występowanie takich samych białek stwierdzono w wątrobie pstrąga (62, 63) oraz w komórkach jąder flądry *Pseudopleuronectes americanus* (64). Innym specyficznym rodzajowo białkiem HMG jest zlokalizowane w erytrocytach kaczki i kurczęcia białko HMG-E (13, 55) i białko typu HMG wyizolowane z jajowodu kury (65), przy czym, jak stwierdzili Gordon i wsp. (66), występowanie białka HMG-E nie jest ograniczone do erytrocytów. Jego obecność wykazano także w kilku innych tkankach kurczęcia oraz w grasicy cielęcia. Hamana i wsp. (67, 68) stwierdzili występowanie u *Tetrahymena* białka o składzie aminokwasowym charakterystycznym dla HMG, które okazało się specyficzne dla tego gatunku. Ze względu na wysoką zawartość lizyny i kwasu glutaminowego nazwano je białkiem LG (69) i zaszeregowano do białek HMG, specyficznych dla *Tetrahymena* (70). Ilość białek LG w chromatynie *Tetrahymena* przekracza ilość białek HMG w chromatynie ssaków. W komórkach *Tetrahymena* przypada w przybliżeniu jedna cząsteczka LG na nukleosom, podczas gdy na przykład w grasicy królika przybliżona ilość wynosi jedną cząsteczkę HMG14 lub HMG17 na 10 nukleosomów (71). Jak już wspomniano, w komórkach organizmów eukariotycznych występują zasadniczo cztery białka HMG. Białka HMG1 i HMG2 mają prawie ten sam ciężar cząsteczkowy (38, 39), wykazują znaczną homologię sekwencji (17, 72) oraz znaczne podobieństwo immunologiczne (73). Białka te o ciężarach cząsteczkowych równych odpowiednio około 26 500 i 26 000 daltonów (38, 48) występują w komórce w ilości około 1 do 5% zawartości histonów (17). Molowy stosunek białek HMG1 i HMG2 do całkowitego histonu jest równy 1 : 50. Oznacza to, że na 10 nukleosomów przypada jedna cząsteczka HMG1 lub HMG2 (74). Każde z nich jest bogate w zasadowe i kwaśne aminokwasy (obie te grupy stanowią około 55% całości aminokwasów). Białka te, podobnie do histonów, wykazują wysoką zawartość argininy i lizyny, a różnią się od histonów wysoką zawartością kwasu glutaminowego. W szerokim zakresie wartości

pH białka HMG1 i HMG2 charakteryzują się stabilną strukturą trzeciorzędową o dużym udziale konformacji alfa-helix (75). W skrajnych wartościach pH cząsteczki białek ulegają rozwinięciu. Pofalowana cząsteczka nie ulega rozwinięciu w roztworach o wysokim stężeniu soli, co sugeruje niewielki udział oddziaływań jonowych w stabilizowaniu trzeciorzędowej struktury tych białek (76).

Cząsteczki białek HMG14 i HMG17 są mniejsze od cząsteczek białek HMG1 i HMG2 i wykazują do nich niewielkie podobieństwo immunologiczne (73). Charakteryzuje je znaczna homologia sekwencji (10). Cząsteczka HMG17 zawiera w całości 89 aminokwasów, z czego 24% stanowi lizyna, 4% arginina (jak w histonie H1), zaś 24% stanowią kwasy asparaginowy i glutaminowy. Goodwin i wsp. (12) wskazują w swej pracy na podobieństwo białek HMG14 i HMG17 do histonu H1. Wszystkie te białka są bogate w lizynę, alaninę i prolinę. Zasadowa, N-końcowa część cząsteczki białek HMG14 i HMG17 posiada regiony o homologicznej sekwencji z N-końcowymi regionami cząsteczki histonu H1 (44, 77). W przeciwieństwie do białek HMG1 i HMG2 białka HMG14 i HMG17 nie posiadają stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej (41, 78).

II-1. Oddziaływanie białek HMG z DNA

Białka HMG1 i HMG2 wiążą się z DNA *in vitro* (38, 39, 79). Z badań nad oddziaływaniem DNA z białkami HMG1 i HMG2 wynika, że pomiędzy zasadowymi aminokwasami białek a grupami fosforanowymi DNA powstaje wiązanie jonowe (38, 39) niespecyficzne względem pierwszorzędowej struktury DNA. Yu i wsp. (79) wykazali, że w roztworach nie zawierających soli białka HMG1 i HMG2 stabilizują DNA, co objawia się wzrostem temperatury „topnienia” DNA w obecności tych białek. W roztworach o niskich siłach jonowych regiony cząsteczki HMG1 bogate w lizynę i zawierające wszystkie reszty aromatyczne są związane z DNA, podczas gdy bardziej kwaśny region łańcucha pozostaje wolny (75, 80). Javaherian i wsp. (81) wykazali, że w obecności soli białka HMG1 i HMG2 mają zdolność destabilizacji struktury drugorzędowej DNA. Pod tym względem są one podobne do białek serii HD (ang. *helix destabilizing protein*) wyizolowanych z organizmów prokariotycznych i eukariotycznych, biorących udział w replikacji DNA (82, 83). W roztworach nie zawierających soli białka HMG1 i HMG2 nie występują w formie natywnej i zachowują się jak polikationy, które stabilizują drugorzędową strukturę DNA. W obecności soli białka HMG występują w formie natywnej i powodują destabilizację DNA. Tak więc trzeciorzędowa struktura tych białek jest ściśle związana z ich właściwościami destabilizującymi DNA. Białka HMG1 i HMG2 mają większe powinowactwo do DNA jednoniciowego (81, 84, 85). Po skompleksowaniu z kołowym DNA powodują jego super-

spiralizację (74), a w szczególnych warunkach mogą tworzyć z DNA struktury podobne do nukleosomów (86). Białko HMG1 oddziałuje z niektórymi podfrakcjami histonu H1, podczas gdy HMG2 reaguje słabiej i mniej specyficznie (87—89).

Białka HMG14 i HMG17 wiążą się z DNA w sposób jonowy, a ich przyłączenie nie powoduje zmian w strukturze DNA (41, 78). Wykazują preferencję do wiązania z jednoniciowym DNA (90).

II-2. Wiązanie białek HMG z nukleosomami

Chromatyna ma strukturę nukleosomalną (91). Dotyczy to zarówno aktywnych (92—97) jak i nieaktywnych genów (98—101) oraz odcinków replikującego DNA (102—104). Stwierdzono występowanie białek HMG w obrębie nukleosomów (16, 71, 105). Wg *Mathew* i wsp. (105) w jądrze występują dwie populacje białek HMG1 i HMG2. Jedna obejmuje białka HMG1 i HMG2 łatwo wymywane z jąder, druga zaś białka związane w sposób trwały z chromatyną. Białka te wiążą się z odcinkiem DNA łączącym poszczególne nukleosomy (106). Analogicznie, badania *Kuehla* i wsp. (60) wykazały w chromatynie jąder pstrąga obecność białek HMG-T różniących się siłą wiązania z chromatyną. Wydaje się, że o ile białka HMG1 i HMG2 łączą się raczej z odcinkiem międzynukleosomalnym chromatyny, o tyle białka HMG14 i HMG17 mają wyraźną tendencję do wiązania się z nukleosomami (106). Jak wykazali *Sandeen* i wsp. (107) we wszystkich przebadanych przez nich warunkach rdzenie nukleosomalne, złożone z DNA o długości 140 par zasad nawiniętego na rdzeń histonowy, wiązały białka HMG14 i HMG17 silniej niż wolny DNA odpowiadający długością DNA nukleosomalnemu (106). Rdzenie nukleosomalne efektywnie współzawodniczą o białka HMG14 i HMG17 i ani zmiana porządku dodawania składników, ani obniżanie stężenia soli nie wpływają na to wiązanie.

DNA rdzenia nukleosomalnego w obecności białek HMG14 i HMG17 wykazuje większą stabilność w procesie termicznej denaturacji. Te wyniki oraz analiza położenia odcinków DNA nukleosomu opornych na działanie nukleazy sugerują, że białka HMG14 i HMG17 wiążą się z końcowymi odcinkami DNA rdzenia nukleosomu. Sugestie te są zgodne z hipotezą zaproponowaną przez *Goodwina* i wsp. (71), którzy sądzą, że nukleosom zawierający białka HMG14 i HMG17 ma analogiczną strukturę z nukleosomem zawierającym histon H1. Różnica polega na zastąpieniu cząsteczki histonu H1 chroniącej oba końce DNA rdzenia przez dwie cząsteczki HMG14 i HMG17, po jednej na każde 7 do 10 par zasad długości DNA na obu jego końcach. Sugestie te znalazły potwierdzenie w pracy *Mardia* i wsp. (108), którzy wykazali, że rdzenie nukleosomalne zawierają dwa specyficzne miejsca wiążące dla białek HMG14 i HMG17. Po-

twierdzą je także wyniki uzyskane przez Albrighta i wsp. (109), którzy wykazali w eksperymentach rekonstrykcyjnych, że nukleosomy posiadają niezależne miejsca wiązania dla 2 cząsteczek HMG14 lub HMG17 i jedno dla cząsteczki histonu H1.

III. Rola białek HMG w chromatynie

Konserwatywna pierwszorzędowa struktura białek HMG oraz występowanie ich w jądrze komórkowym w znacznych ilościach upodabnia białka HMG do histonów. Dało to podstawę do sugestii, że białka HMG, podobnie jak histony, stanowią strukturalny składnik chromatyny (5, 12). Na tym jednak kończy się analogia między białkami HMG a histonami. Synteza białek HMG w komórce, w przeciwieństwie do histonów, nie zachodzi w fazie S cyklu komórkowego jednocześnie z syntezą DNA, a inhibitory syntezy DNA nie hamują syntezy białek HMG (55, 110). *Bustin et al.* (111) wykazali, że mRNA białek HMG1 i HMG2 są, podobnie jak mRNA większości białek komórkowych, poliadenylowane, czym różnią się zasadniczo od niepoliadenylowanych cząsteczek mRNA histonów. Zasadnicza różnica dotyczy jednak rozmieszczenia histonów i białek HMG w chromatynie. W odróżnieniu od histonów, coraz liczniejsze dane wskazują na związek białek HMG z chromatyną aktywną. Wyjątek stanowią tu wyniki uzyskane przez *Goodwina i Johnsa* (112), negujące specyficzną asocjację białek HMG z chromatyną aktywną transkrypcyjnie.

Jak obecnie wiadomo, struktura nukleosomalna nie stanowi wyróżnika stanu aktywności lub braku aktywności chromatyny, ponieważ cała tak aktywna, jak i nieaktywna chromatyna ma strukturę nukleosomalną. Obserwowano jednak różnice strukturalne między aktywnymi i nieaktywnymi regionami chromatyny. Aktywne regiony chromatyny mają konformację, w której są szczególnie podatne na trawienie DNAazą I (113—115). Trawieniu DNAazą I sekwencji aktywnie transkrybowanych towarzyszy uwalnianie białek niehistonowych, a wśród nich białek HMG (56, 115—120). DNAaza I trawi wybiórczo nie tylko regiony chromatyny zawierające geny aktualnie transkrybowane z dużą szybkością, lecz także geny transkrybowane rzadko, geny, które były aktywne na pewnym etapie życia komórki czy wreszcie geny potencjalnie aktywne (114, 121). DNAaza I działa więc specyficznym na regiony chromatyny o aktywnej konformacji, będącej odzwierciedleniem „potencjału transkrypcyjnego” (114) chromatyny.

Nie ulega wątpliwości, że białka HMG biorą udział w tworzeniu „aktywnej konformacji” chromatyny. Przeciwciała białek uwalnianych przez DNAazę I znakowane fluorochromowo specyficznym barwią te regiony chromosomów śliniankowych *Drosophila*, które występują lub występowały w pufach, a więc były aktywne na pewnym etapie rozwoju (122).

Jak wykazali Georgiev i wsp. (123—125) cząstki subnukleosomalne zawierające białka HMG14 i HMG17 są wzbogacone w sekwencje DNA aktywnie transkrybowane. Białka HMG14 i HMG17 mają większe powinowactwo do nukleosomów zawierających sekwencje genu aktywnego, jak wykazali w eksperymentach rekonstytucyjnych Sandeen i wsp. (107). Mocnego argumentu przemawiającego na korzyść udziału białek HMG14 i HMG17 w aktywacji genomu dostarczają prace grupy Weintrauba (126, 127), z których wynika, że obecność białek HMG14 i HMG17 jest czynnikiem koniecznym dla specyficznego wytrawienia aktywnych genów. Brak tych białek powoduje utratę zwiększonej wrażliwości tych genów na działanie DNAazy I (128).

Wyniki trawień chromatyny innymi enzymami nukleolitycznymi, a mianowicie nukleazą mikrokokalną i DNAazą II potwierdzają ścisły związek między aktywnością chromatyny, a występowaniem w aktywnym regionie białek HMG. Nukleaza mikrokokalna trawi preferencyjnie regiony międzynukleosomalne w tych fragmentach chromatyny, które zawierają transkrybowane sekwencje DNA (92, 129, 130), co prowadzi do uwolnienia z chromatyny po ograniczonym trawieniu nukleazą mikrokokalną nukleosomów zawierających DNA wzbogacone w sekwencje genów aktywnych. Obecność białek HMG we frakcji wcześniej uwalnianej przez nukleazę mikrokokalną wykazał Jackson i wsp. (106). Wykazano, że odcinki międzynukleosomalne chromatyny jąder pstrąga preferencyjnie trawione przez nukleazę mikrokokalną są zubożone w histon H1, a wzbogacone w HMG-T (131). Nukleosomy tej chromatyny są wzbogacone w białko H6 (130, 132—135). Przy ograniczonym trawieniu nukleaza mikrokokalna uwalnia z chromatyny jąder nukleosomy dwu typów. Jeden zawiera DNA o długości 140 par zasad, histony rdzeniowe oraz 90% chromatynowego H6 w ilości jedna cząsteczka H6 na oktamer histonowy. Nukleosomy drugiego typu zawierają DNA o długości w granicach 140 do 190 par zasad, histony rdzeniowe oraz histon H1. Preferencyjne uwalnianie takich nukleosomów miało związek z obecnością HMG-T w międzynukleosomalnych odcinkach zawierającej je chromatyny. Nukleosomy obydwu rodzajów zawierały DNA wzbogacony w sekwencje genów aktywnych. Oprócz sekwencji homologicznych nukleosomy każdego typu miały zestaw sekwencji odrębnych (134). Analogicznie Godwin i wsp. (71) wykazali, że w grasicy królika, w wątrobie cielęcia i jajowodzie kury ograniczone działanie nukleazy mikrokokalnej uwalnia dwa zestawy nukleosomów — jeden obejmuje odcinek DNA o długości około 145 par zasad połączony z czterema histonami rdzeniowymi, drugi zaś odcinek DNA o długości 160 par zasad zasocjowany z histonami rdzeniowymi, białkami HMG14 i HMG17 nie zawierający histonu H1, a zawierający wykrywalne ilości HMG1 i HMG2 (71). O ile jednak obecność białek HMG jest konieczna dla wystąpienia wybiórczej czułości regionów aktywnych chromatyny na DNAazę I, o tyle wybiórcze trawienie genów aktywnych nukle-

azą mikrokokalną nie jest uzależnione od występowania białek HMG (136).

Występowanie białek HMG w regionach aktywnej transkrypcyjnie chromatyny zostało potwierdzone także z zastosowaniem DNAazy II. Enzym ten wycina preferencyjne regiony chromatyny aktywnej, którą można oddzielić od pozostałej części chromatyny, wykorzystując jej rozpuszczalność w obecności jonów magnezu (137). Wykazano wzbogacenie frakcji chromatyny uwolnionej przez DNAazę II w białka HMG (133, 138).

Można przyjąć, że wyznacznikiem dostępności jakiegoś regionu chromatyny na wybiórcze trawienie DNAazą I jest obecność w tym regionie białek HMG (rozumowanie takie oparte jest na założeniu, że występowanie białek HMG ogranicza się wyłącznie do aktywnych regionów chromatyny, na co brak jak dotąd dowodów). Pewnych sugestii odnośnie mechanizmu działania białek HMG dostarcza cytowana wyżej praca Goodwina i wsp. (71). Jak już wspomniano autorzy ci opisują nukleosomy, które oprócz DNA o długości 160 par zasad i histonów rdzeniowych zawierają białka HMG14 i HMG17, wykrywalne ilości białek HMG1 i HMG2 oraz nie zawierają histonu H1. Wyniki te poparte przez innych (130, 133, 139) pozwoliły zaproponować wspomniany wcześniej model „aktywnego nukleosomu”, w którym N-końcowe regiony białek HMG14 i HMG17 wiążą się z odcinkiem DNA o długości 15 par zasad, przylegającym do odcinka rdzeniowego o długości 145 par zasad. Jednocześnie C-końcowe regiony białek HMG14 i HMG17 mogą oddziaływać z rdzeniem nukleosomalnym. Na poparcie proponowanego modelu można by przytoczyć opisywane wcześniej podobieństwa pomiędzy białkami HMG14 i HMG17 a histonem H1. Przyjmując, że białka HMG14 i HMG17 mogą zastępować histon H1 w chromatynie aktywnej można wyjaśnić zjawisko specyficznej reasocjacji białek HMG14 i HMG17 z chromatyną pozbawioną uprzednio tych białek przez ekstrakcję 0,35 M roztworem chlorku sodu. Po reasocjacji obserwowano przywrócenie chromatynie zawierającej sekwencje genu globinowego czułości na DNAazę I. Otóż 0,35 M roztwór chlorku sodu usuwa z regionów aktywnych białka HMG14 i HMG17, nie naruszając odcinków międzynukleosomalnych związanych z histonem H1, który nie ulega ekstrakcji w tej sile jonowej. W procesie rekonstrukcji białka HMG14 i HMG17 rozpoznają DNA międzynukleosomalny genów aktywnych, przywracając sekwencjom genowym swoistość trawienia DNAazą I.

Wiadomo, że przeciętnie w komórce eukariotycznej około 10% chromatyny występuje w formie aktywnej transkrypcyjnie, prawdopodobnie w stanie aktywności znajduje się około 3×10^6 nukleosomów. Przy założeniu ograniczenia występowania białek HMG do regionów aktywnych wynika, że w komórce znajduje się dostatecznie wiele cząsteczek HMG, aby na każdy aktywny nukleosom mogła przypadać jedna cząsteczka HMG14 i HMG17. Zastąpienie histonu H1 na aktywnych nukleosomach przez białka HMG14 lub HMG17 uniemożliwia interakcję między cząsteczkami histonu H1 sąsiadujących nukleosomów (140), w wyniku czego

możliwe staje się rozluźnienie solenoidalnej struktury chromatyny (141, 142), a tym samym chromatyna znajduje się w mniej upakowanej konformacji. Staje się więc zrozumiałe dlaczego białka HMG14 i HMG17 są czynnikiem warunkującym szczególną dostępność aktywnej chromatyny na działanie DNAazy I oraz dlaczego obecność białek HMG14 i HMG17 pochodzących z chromatyny aktywnej nie uczuła na DNAazę I genów nieaktywnych. Nie tylko chromatyna, ale i nukleosomy pochodzące z chromatyny aktywnej są wybiórczo trawione przez DNAazę I (113, 136). Z tego wynika, że prawdopodobnie istnieje inny czynnik (lub czynniki), który łącznie z HMG odpowiada za nadawanie pewnym regionom chromatyny cech odróżniających je od regionów nieaktywnych. Czynnik ten działa prawdopodobnie na poziomie nukleosomów i jest rozpoznawany przez białka HMG14 i HMG17, na co wskazuje specyficzne wiązanie się tych białek z nukleosomami izolowanymi z chromatyny erytrocytów ptaków, zawierającymi sekwencje genu hemoglobiny (126, 127). Natura tego czynnika (czynników) pozostaje nieznana. Wiadomo, że podjednostki zasocjowane z białkami HMG14 i HMG17 charakteryzują się mniejszą ruchliwością elektroforetyczną niż pozostałe nukleosomy. Różnica ta utrzymuje się nawet po usunięciu białek HMG14 i HMG17 (143). Liczne dane doświadczalne wskazują na związek między acetylacją histonów i aktywnością genów (144, 145). Wiadomo, że acetylacja histonów zwiększa podatność chromatyny na trawienie DNAazą I (146), a frakcje chromatyny aktywnej transkrypcyjnie są wzbogacone w histon H4 o różnym stopniu acetylacji (147, 148). Na związek między acetylacją histonów, występowaniem białek HMG14 i HMG17 z aktywnością chromatyny wskazują wyniki uzyskane przez Reeves'a i Candido (149, 150). Autorzy ci wykazali, że za aktywność hamowania deacetylaz histonowych stwierdzoną we frakcjach chromatyny uwalnianych przez DNAazę I (149) odpowiedzialne są białka HMG14 i HMG17 (150). Proces współdziałania białek HMG i acetylacji histonowych w aktywacji chromatyny można więc sobie wyobrazić następująco. Pewne odcinki chromatyny ulegają pobudzeniu przejawiającym się między innymi wzrostem poziomu acetylacji histonów rdzeniowych (151). Acetylacja histonów rdzeniowych powoduje zmiany strukturalne chromatyny. Takie zmienione odcinki chromatyny są następnie rozpoznawane przez białka HMG14 i HMG17, które dzięki zdolności hamowania deacetylaz histonowych utrwalają stan pobudzenia chromatyny. Zdolność inhibowania acetylaz histonowych przez białko HMG17 nie została jednak potwierdzona przez badania Mezquity i wsp. (152).

Udział białek HMG14 i HMG17 w aktywacji genomu wydaje się nie budzić wątpliwości. Nie wiadomo jak dotąd czy jest to ich jedyna rola. Bardziej dyskusyjne jest rozmieszczenie i rola białek HMG1 i HMG2. Wiadomo, że białka te występują w odcinkach międzynukleosomalnych chromatyny aktywnej transkrypcyjnie, ale brak ich na aktywnych nukleosomach (153). Występowanie tych białek nie ogranicza się tylko do

jądra komórkowego; pewna ich ilość występuje w cytoplazmie (154—156), skąd mogą przemieszczać się do jądra (157, 158). Z badań rozmieszczenia białek HMG1 i HMG2 wprowadzonych do komórki metodą mikroinjekcji wynika, że obecne w cytoplazmie i jądrze białka HMG1 i HMG2 znajdują się w stanie dynamicznej równowagi (159). Zaobserwowano związek między intensywnością podziałów komórkowych a poziomem białek HMG1 i HMG2 w jądrze. Po etapie intensywnych podziałów komórkowych w momencie wejścia komórek w stadium różnicowania obserwuje się w komórkach spadek poziomu białek HMG1 i HMG2 (154, 159, 160). W świetle tych danych, biorąc pod uwagę wcześniej opisane destabilizujące DNA działanie białek HMG1 i HMG2 oraz ich podobieństwo do białek HD, rozwijających DNA, prawdopodobne jest, że białka HMG1 i HMG2 biorą udział w procesie replikacji i mogą przemieszczać się z jądra do cytoplazmy lub odwrotnie, w zależności od zapotrzebowania jądra na białka destabilizujące DNA.

Zaakceptowano do druku 9.07.1982

PIŚMIENNICTWO

1. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J., (1974), *Science*, **183**, 817—824.
2. Elgin S. C. R., Weintraub H., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 725—774.
3. Douvas A. S., Harrington Ch. A., Bonner J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3902—3906.
4. Kłyszewko-Stefanowicz L., (1979), *Post. Biochem.*, **25**, 287—350.
5. Goodwin G. H., Sanders C., Johns E. W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 14—19.
6. Goodwin G. H., Johns E. W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 215—219.
7. Goodwin G. H., Johns E. W., (1972), *FEBS Lett.*, **21**, 103—104.
8. Goodwin G. H., Nicolas R. H., Johns E. W., (1975), *Biochem. Biophys. Acta*, **405**, 280—291.
9. Johns E. W., Goodwin G. H., Walker J. M., Sanders C., (1975), *Ciba Found. Symp.*, **28**, (new series), 95—107.
10. Goodwin G. H., Rabbani A., Nicolas R. H., Johns E. W., (1977), *FEBS Lett.*, **80**, 413—416.
11. Rabbani A., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 497—505.
12. Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W., (1978), w: *The Cell Nucleus* (Busch H. ed.), Academic Press.
13. Sterner R., Boffa L. C., Vidali G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3830—3836.
14. Rabbani A., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 351—358.
15. Spiker S., Mardian J. K. W., Isenberg I., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 129—135.
16. Goodwin G. H., Woodhead L., Johns E. W., (1977), *FEBS Lett.*, **73**, 85—88.

17. Sanders C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1034—1042.
18. Sterner R., Vidali G., Allfrey V. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 129—134.
19. Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W., (1978), *Biochem. Biophys. Acta*, **519**, 233—244.
20. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *FEBS Lett.*, **90**, 327—330.
21. Schlesinger D. H., Goldstein G., Niall H. D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2214—2218.
22. Ahmed K., Dawis A. T., Goveli S. A., Wilson M. J., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 326—331.
23. Sterner R., Vidali G., Henrikson R. L., Allfrey V. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7601—7604.
24. Sterner R., Vidali G., Allfrey V. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1157—1183.
25. Sterner R., Vidali G., Allfrey V. G., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8892—8895.
26. Inoue A., Tei Y., Hasuma T., Yukioka M., Morisawa S., (1980), *FEBS Lett.*, **117**, 68—73.
27. Bhorjee J. S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6944—6949.
28. Saffer J. D., Glazer R. I., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 1280—1286.
29. Sun I. Y.-C., Johnson E. M., Allfrey V. G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 742—747.
30. Arfmann A. A., Haase E., Schröter H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 137—143.
31. Levy-Wilson B., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2189—2194.
32. Saffer J. D., Glazer R. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 4655—4658.
33. Boffa L. C., Skiner R., Vidali G., Allfrey V. G., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 1322—1327.
34. Giri C. P., West M. H. P., Smullson M., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3495—3500.
35. Sanders C., Johns E. W., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 547—550.
36. Watson D. C., Peters E. H., Dixon G. H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **74**, 53—60.
37. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 461—469.
38. Shooter K. V., Goodwin G. H., Johns E. W., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 263—270.
39. Goodwin G. H., Shooter K. V., Johns E. W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 427—433.
40. Javaherian K., Amini S., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **478**, 295—304.
41. Javaherian K., Amini S., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1385—1391.
42. Walker J. M., Gooderham K., Hastings J. R. B., Mayers E., Johns E. W., (1980), *FEBS Lett.*, **122**, 264—271.
43. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., (1978), *Nature*, **271**, 281—282.
44. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 461—468.
45. Walker J. M., Stearn C., Johns E. W., (1980), *FEBS Lett.*, **112**, 207—211.

46. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., Gaastra W., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 72—78.
47. Huntley G. H., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4916—4919.
48. Watson D. C., Wong C. W., Dixon G. H., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **95**, 193—202.
49. Wigle D. T., Dixon G. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5636—5644.
50. Smith J. A., Stocken L. A., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 859—861.
51. Elgin S. R. C., Bonner J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 772—784.
52. Franco L., Montero F., Rodriguez-Molina J. J., (1977), *FEBS Lett.*, **78**, 317—320.
53. Mathew C. G. P., Goodwin G. H., Gooderham K., Walker J. M., Johns E. W., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **87**, 1243—1251.
54. Weber S., Isenberg I., (1980), *Biochemistry*, **19**, 2236—2240.
55. Romani M., Rodman T. C., Vidali G. J., Bustin M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2918—2922.
56. Levy-Wilson B., Wong N. C. W., Watson D. C., Peters E. H., Dixon G. H., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 793—801.
57. Bhullar B. S., Hewitt J., Candido E. P. M., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8801—8806.
58. Brown E., Goodwin G. H., Mayes E. L. V., Hasling J. R. B., Johns E. W., (1980), *Biochem. J.*, **191**, 661—664.
59. Davie J. R., Candido E. P. M., (1980), *FEBS Lett.*, **110**, 164—168.
60. Kuehl L., Lyness T., Watson D. C., Dixon G. H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 391—397.
61. Watson D. C., Levy Wilson B., Dixon G. H. (1978), *Nature*, **276**, 196—198.
62. Christensen M. E., Dixon G. H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7549—7556.
63. Rabbani A., Goodwin G. H., Walker J. M., Brown E., Johns E. W., (1980), *FEBS Lett.*, **109**, 294—298.
64. Kennedy B. P., Davies P. L., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2533—2539.
65. Teng C. S., Gallagher K., Teng C. T., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 1003—1006.
66. Gordon J. S., Rosenfeld B. J., Kaufan R., Williams D. L., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4395—4402.
67. Iwai K., Hamana K., Yabuki H., (1970), *J. Biochem.*, **68**, 597—601.
68. Hamana K., Iwai K., (1971), *J. Biochem.*, **69**, 1097—1111.
69. Hamana K., Iwai K., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 503—512.
70. Hamana K., Iwai K., (1979), *J. Biochem.*, **86**, 789—794.
71. Goodwin G. H., Mathew C. G. P., Wright C. A., Venkov C., Johns E. W., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1815—1835.
72. Alfagenna O. R., Rudkin G. T., Cohen L. H., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2038—2042.
73. Bustin M., Hopkins R. B., Isenberg I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1694—1699.
74. Javaherian K., Liu L. F., Wang J. C., (1978), *Science*, **199**, 1345—1346.
75. Cary P. D., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., Javaherian K., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 583—590.
76. Baker C., Isenberg I., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1645—1649.

77. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1979), *FEBS Lett.*, **100**, 394—398.
78. Abercrombie B. D., Kneale G. G., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 173—177.
79. Yu S. S., Li H. J., Goodwin G. H., Johns E. W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 497—502.
80. Walker J. M., Shooter K. V., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 88—93.
81. Javaherian K., Sadeghi M., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3569—3580.
82. Alberts B. M., Frey L., (1970), *Nature*, **227**, 1313—1318.
83. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2133—2141.
84. Isackson P. J., Fishback J. L., Bidney D. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5569—5573.
85. Bidney D. L., Reeck G. R., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1211—1218.
86. Mathis D. J., Kindelis A., Spadofora C., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1577—1590.
87. Smerdon M. J., Isenberg I., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4242—4247.
88. Yu S. H., Spring T. G., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **492**, 20—28.
89. Cary P. D., Shooter K. V., Goodwin G. H., Johns E. W., Olayemi J. Y., Hartman P. G., Bradbury E. M., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 657—662.
90. Isackson P. J., Reeck G. R., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3779—3793.
91. Kornberg R. D., (1977), *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 931—955.
92. Bellard M., Gannon P., Chambon P., (1977), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **42**, 779—791.
93. Lacy E., Axel R., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3978—3982.
94. Kuo M. T., Sahasrabudde C. G., Saunders G. F., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1572—1575.
95. Mathis D. J., Gorovsky M. A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 750—755.
96. Reeves R., (1976), *Science*, **145**, 529—532.
97. Gottesfeld J. M., Melton D. A., (1978), *Nature*, **273**, 317—319.
98. Lipchitz L., Axel R., (1976), *Cell*, **9**, 355—364.
99. Musich P. R., Brown F. L., Maio J. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3297—3301.
100. Bokhon'ko A., Reeder R. H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**, 146—152.
101. Horz W., Igo-Kemenes T., Pfeiffer W., Zachau H. G., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3213—3225.
102. McKnight S. L., Miller O. L. Jr., (1977), *Cell*, **12**, 795—804.
103. Shelton E. R., Kang J., Wasserman P. M., Pamphilis M. L., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 349—362.
104. Seale R. L., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2717—2721.
105. Mathew G. G. P., Goodwin G. H., Johns E. W., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 167—179.
106. Jackson J. B., Pollock J. M., Rill J. M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3739—3749.
107. Sandeen G., Wood W. I., Felsenfeld G., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 3757—3778.
108. Mardian J. K. W., Paton A. E., Bunick G. J., Olins D. E., (1980), *Science*, **209**, 1534—1536.

109. Albright S. C., Wiseman J. M., Lange R. A., Garrard W. T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3673—3684.
110. Kuehl L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7276—7281.
111. Bustin M., Neihart N. K., Fagan J. B., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 893—897.
112. Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Biochem. Biophys. Acta*, **519**, 279—284.
113. Weintraub H., Groudine M., (1976), *Science*, **193**, 848—856.
114. Garel A., Zolan M., Axel R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4867—4871.
115. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 883—898.
116. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., (1977), *Cell*, **12**, 409—415.
117. Levy-Wilson B., Wong N. C. W., Dixon G. H., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2810—2814.
118. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1978), *Can. J. Biochem.*, **56**, 480—491.
119. Hamana K., Zama M., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5275—5288.
120. Levy-Wilson B., Kuehl R., Dixon G. H., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2859—2869.
121. Wallace R. B., Dube S. K., Bonner J., (1977), *Science*, **198**, 1166—1168.
122. Mayfield J., Serunian L., Silvers L., Elgin S. C. R., (1978), *Cell*, **14**, 539—544.
123. Bakayev V. V., Bakayeva T. G., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **91**, 291—321.
124. Bakayev V. V., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1525—1540.
125. Bakayev V. V., Schmatchenko V. V., Georgiev G. P., (1979), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **245**, 734—736.
126. Weisbrod S., Weintraub H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 630—634.
127. Weisbrod S., Groudine M., Weintraub H., (1980), *Cell*, **19**, 289—301.
128. Gazit B., Panet A., Cedar H., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1787—1790.
129. Bloom K. S., Anderson J. N., (1978), *Cell*, **15**, 141—150.
130. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4155—4163.
131. Peters E. H., Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3358—3361.
132. Kuehl L., Lyness T., Dixon G. H., Levy-Wilson B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1090—1095.
133. Levy-Wilson B., Connor W., Dixon G. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 609—620.
134. Levy-Wilson B., Dixon G. H., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1682—1686.
135. Hutcheon T., Dixon G. H., Levy-Wilson B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 681—685.
136. Gazit B., Cedar H., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5143—5155.
137. Hendrick D., Tolstoshev P., Randlett D., (1977), *Gene*, **2**, 147—158.
138. Georgieva E. I., Pashev I. G., Tsanev R. G., (1981), *Biochem. Biophys. Acta*, **652**, 240—244.
139. Todd R. D., Garrard W. T., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3074—3083.

140. Villeponteaux B., Lasky L., Harry I., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5532—5535.
141. Carpenter B. G., Baldwin J. P., Bradbury E. M., Ibel K., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1739—1746.
142. Finch J. T., Klug A., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 1897—1901.
143. Kuehl L., Barton D. J., Dixon G. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10671—10675.
144. Ruiz-Carrillo A., Allfrey V. G., (1975), *Science*, **190**, 117—128.
145. McKnight G. S., Hager L., Palmiter R. D., (1980), *Cell*, **22**, 469—477.
146. Simpson R. T., (1978), *Cell*, **13**, 691—699.
17. Davie J. R., Candido E. P. M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3574—3577.
148. Levy-Wilson B., Watson D. C., Dixon G. H., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 259—275.
149. Reeves R., Candido E. P. M., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **89**, 571—574.
150. Reeves R., Candido E. P. M., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1947—1964.
151. Yamamoto K. R., Alberts B. M., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 721—746.
152. Mezquita J., Chiva M., Vidal S., Mezquita C., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 1781—1797.
153. Gabrielli F., Hancock R., Faber A. J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **120**, 363—369.
154. Seyedin S. M., Kistler W. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11264—11271.
155. Bustin M., Neihart N. K., (1979), *Cell*, **16**, 181—189.
156. Isackson P. J., Bidney D. L., Reeck G. R., Neihart N. K., Bustin M., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4466—4471.
157. Smith B. J., Robertson D., Birbeck M. S. C., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Expt. Cell. Res.*, **115**, 420—423.
158. Recksteiner M., Kuehl L., (1979), *Cell*, **16**, 901—908.
159. Wu L., Recksteiner M., Kuehl L., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 488—496.
160. Seyedin S. M., Pehrson J. R., Cole R. D., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 5988—5998.

SPRAWOZDANIA

III Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi (7–10. listopad 1981 r., Woudschoten, Holandia).

Od czasu II Konferencji w Male (Belgia, 1980 r., zob. „postępy Biochemii” t. 27, Nr. 1) grono jej członków rozszerzyło się. Tym razem w Konferencji brało udział 70 osób z 44 ośrodków, przedstawiono 40 komunikatów, dyskutowano podczas 5-ciu sesji plenarnych a także, jak to zazwyczaj bywa, w czasie wspólnych posiłków (smacznych!) a wieczorami przy barze.

Rozszerzył się także zakres badań oraz stan wiadomości o enzymach lizosomalnych i charakterze zmian ich właściwości, zmian prowadzących do obniżenia wewnątrzkomórkowej aktywności katabolicznej i w konsekwencji do gromadzenia nierozłożonych substratów i całego łańcucha objawów patologicznych.

Ostatnio w lizosomologii znalazło zastosowanie kilka prostych a „sprytnych” metod badawczych m.in.:

— ulepszone metody chromatografii np. użycie N-(4-nitrofenylo)szczawianu sprzęgniętego z 1,6 dwuaminoheksylosepharose'ą 4B, który wiąże białka hydrofobowe;

— uzyskiwanie trwałych linii komórkowych produkujących monoklonalne przeciwciała co pozwala na izolowanie małych ilości czystego enzymu;

— blokowanie „ładowania” enzymu do lizosomu przez dodanie do hodowli komórkowej NH_4Cl czego skutkiem jest obniżenie wewnątrz- a podwyższenie zewnątrzkomórkowej aktywności wszystkich enzymów lizosomalnych co pozwala na bezpośrednią obserwację szybkości syntezy preenzymu z ominięciem późniejszej obróbki i degradacji wewnątrzlizosomalnej;

— nieodwracalne a specyficzne hamowanie enzymu wewnątrz komórki (np. beta-galaktozydazy przy pomocy triazeno-beta-galaktozydu a katepsyn leupeptyną) co pozwala na obserwację syntezy enzymu *de novo* po usunięciu inhibitora z pożywki.

Z nowszych osiągnięć przedstawionych na Konferencji warto przytoczyć następujące obserwacje:

— w komórkach pochodzących od chorych z późną postacią choroby Pompego alfa-glukozydaza syntetyzowana jest wolniej niż w komórkach prawidłowych (Reuser i wsp., Rotterdam);

— pochodzące od chorych na mukopolidozę komórkach, w których stwierdzono obniżenie aktywności zarówno beta-galaktozydazy jak i neuraminidazy (tzw. wariant B-gal⁻/neu⁻), syntetyzującą beta-galaktozydazę z szybkością prawidłową, natomiast enzym jest niezmiernie szybko degradowany wewnątrz lizosomu; z komórek prawidłowych izolowano glikoproteinę, która inkorporowana do komórek defektywnych koryguje ich metabolizm normalizując degradację enzymu i podwyższając jego aktywność; ogrzewanie pozbawia tę glikoproteinę właściwości korekcyjnych (d'Azzo i wsp., Rotterdam);

— w przypadku wieloenzymatycznego niedoboru sulfataz (tzw. MSD, niedobór arylosulfataz A, B, C i in.) arylosulfataza A jest szybciej degradowana z czego moż-

na wnioskować, że w prawidłowych komórkach istnieje czynnik chroniący wszystkie sulfatazy przed trawieniem wewnątrzlizosomalnym i że brak tego czynnika jest przyczyną choroby (von Figura i wsp., Munster);

— w przypadku choroby Morquio B beta-galaktozydaza ma niższe powinowactwo do substratu, podczas gdy maksymalna szybkość reakcji jest niewiele niższa od prawidłowej (Czartoryska i wsp., Warszawa);

— specyficznym aktywatorem degradacji ceramidylotrójheksozydu jest białko o m.c.z. około 20.000 i pI 4,4; łańcuch polipeptydowy składa się głównie z aminokwasów hydrofilnych prócz fragmentu hydrofobowego tworzącego kieszeń, w której schować się może ceramidylotrójheksozyd a także G_{M1} - G_{M2} -ganglikozyd tworząc rozpuszczalny kompleks; białko może być zatem białkiem transportującym dla różnych lipidów ale swoiście rozpoznaje jedynie alfa-galaktozydazę (Sandhoff i wsp., Bonn);

— beta-N-acetylohekszoaminidaza A może odszczepiać także N-acetyloglukozaminę sulfonowaną na 6-tym węglu biorąc bezpośredni udział w katabolizmie siarczanu keratanu nawet przy braku odpowiedniej sulfatazy (Kresse i wsp., Munster).

Jedna z dyskusji poświęcona była trudnościom metodycznym w diagnostyce choroby Gauchera.

Pozostałe dyskusje poświęcone były wymianie doświadczeń, rozważaniom teoretycznym, a także odkrywaniom planów na przyszłość.

Gospodarzom spotkania należą się słowa podzięk i uznania za znakomitą organizację i miłą, swojską atmosferę (a także za zapewnienie prześlizgniętej pogody!) natomiast wszystkim uczestnikom za rodzinny, pogodny nastrój i szczerą wymianę doświadczeń i „kruczków” metodycznych.

Za półtora roku mamy nadzieję spotkać się znów.

B. Czartoryska

Konferencja nt. immunologicznych metod wykrywania antygenów jądrowych istotnych w procesach rakotwórczych i chemioterapii.

Paterson Laboratories, Christie Hospital and Holt Radium Institute, Manchester M20 9BX, England, 26—27 kwiecień 1982.

(Organizatorzy J. M. Boyle, R. Saffhill z Paterson Laboratories, w nawiasach poniżej podano nazwiska autorów, wygłaszających doniesienia).

Immunologiczne metody badań zastosowano do wyjaśniania dynamicznej struktury chromatyny a także do ilościowych pomiarów adduktów rakotwórczych DNA. Badania te znacznie zwiększyły stopień wykrywalności adduktów w nienaruszonej komórce jak również umożliwiły badania topografii adduktów w chromatynie a ponadto specyfikę ich występowania w podpopulacji komórek. Zwiększenie czułości metod immunologicznych, narastające zastosowanie przeciwciał monoklonalnych przyczyniły się do sukcesu tej metody badawczej. Referowany konferencję subsydiowało m.in. Brytyjskie Stowarzyszenie do Badań nad Rakiem.

Podstawą metodyczną referowanych prac była zdolność DNA do wywołania odpowiedzi immunologicznej w postaci produkcji przeciwciał w surowicy ssaka; jednopasmowe łańcuchy kwasu nukleinowego lub jego nukleozydy zmodyfikowane przez czynniki rakotwórcze stawały się antygenami po przyłączeniu do nośnika białkowego, albuminy surowiczej lub hemocyjaniny. Otrzymane przeciwciała charakteryzowano pod względem specyficzności, a następnie stosowano do ilościowych oznaczeń adduktów rakotwórczych według metod. radioimmunologicznej (*radioim-*

munoassay, RIA), immunoabsorbenta enzymu (*enzyme linked immunoabsorbent assay*, ELISA), ultraczułej metody radioimmunologicznej (*ultrasensitive enzyme radioimmunoassay*, USEREA) albo jej fluorometrycznego odpowiednika z zastosowaniem 4-metyloumbeliferylu fosforanu.

Przedstawiono metody otrzymywania i charakterystykę przeciwciał glikolu tyminy, powstającego w gamma-napromienionym DNA (Erlanger), dimerów tyminy w DNA naświetlonym UV (Strickland) a także w DNA naświetlonym UV w obecności 8-metoksypsoralenu (Zarębska). Wyjątkową specyficznością odznaczają się przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciw O⁶-alkil-deoksygwanozynie, O²-alkil-deoksytymidynie, i O⁴-alkil-deoksytymidynie (Saffhill, Rajewsky) jak również przeciwciała poliklonalne przeciw alkilowanym nukleozydom otrzymane poprzez immunizację królików (Van der Laken). Przeciwciała te posiadają ponad 10⁷ razy większą reaktywność z nukleozydami alkilowymi niż z ich odpowiednikami niezmodyfikowanymi. Stwierdzono, że pierwotnym miejscem rozpoznania przez przeciwciało jest grupa alkilowa przyłączona do odpowiedniego atomu tlenowego, drugim specyficznym miejscem jest cukier nukleozydu (Saffhill).

Otrzymano i scharakteryzowano wiele przeciwciał mono- i poliklonalnych rozpoznających addukty rakotwórcze w DNA a mianowicie: aflatoksynę B₁ (Haugen, Hertzog, Sizaret), 2-acetylofluoren (Poirier, Leng, Van der Laken, Baan), benz(a)pyrendiolepoksyd (Slor), oraz tlenek styrenu (Legreverd). Stwierdzono że przeciwciała aflatoksyny B₁ można stosować do miareczkowania jej produktów przemiany w moczu (Sizaret).

Immunooznaczenia pozwalają na wykrywanie od 0.1 do 100 femtomoli (10⁻¹⁵ M) adduktów, i co jest ważne, jest to poziom adduktów powstający przy dawkach narażenia biologicznego. Jest to stopień czułości wykrywania współzawodniczący ze stopniem wykrywania adduktów przy użyciu znakowanych izotopów.

W badaniach chromatyny stwierdzono że białka rdzenia nukleosomalnego chronią przed przyłączeniem się N-acetoksyacetyloamino-fluorenu, natomiast dodanie czynników interkalujących niweluje preferencyjne wiązanie się tego adduktu (Bases). Wykazano, że białka przerywnikowe (*spacer proteins*) kowalencyjnie związane z końcami DNA 3' i 5' tworzą skupienia łańcuchów białkowych wokół nici DNA, odcinki te są odporne na działanie alkaliów i proteaz (Werner). Przeciwciała rozpoznające ten typ białek wiążą się również z siateczką cytoplazmatyczną ale różną od zabarwienia tubuliny lub aktyny. Zauważono, że białka przerywnikowe mają tendencje do łączenia się z przeciwciałami nukleozydów alkilowanych.

Nietypowe przeciwciała otrzymano dla zygakowatej postaci DNA, Z-DNA; stwierdzono korelację stopnia wiązania się przeciwciała Z-DNA z poli(dG-dC) w warunkach stopniowego wymuszania formy Z-polimeru, w miarę wzrostu siły jonowej roztworu. Był to piękny przykład korelacji metod fizykochemicznych — widma dichroizmu kołowego z metodami immunologicznymi (Leng).

Wiele prac poświęcono otrzymywaniu przeciwciał przeciw wybranym białkom chromatyny, odgrywającym szczególną rolę w procesach pęcznienia chromatyny, poprzedzających replikację bądź transkrypcję (Bustin, Bautz, Van Regenmortel, Sommerville, Turner). Posługiwano się przy tym techniką mikroinjekcji przeciwciał do całych komórek, bądź do jądra komórkowego. W ten sposób zlokalizowano w jądrze komórkowym występowanie polimerazy II oraz hn-RNP, uwidaczniających się w zgrubieniach chromosomów politenicznych, poddanych uprzednio szokowi termicznemu (Bautz). Interesujące było uzyskanie przeciwciał, które wiążą się inaczej z komórkami HeLa w zależności od fazy ich cyklu: silnie w G₁, mniej w G₂, wcale w fazie S. Jedno z tych przeciwciał wiąże się preferencyjnie z błoną jądrową (Turner).

Wprawdzie dostępność wysoce specyficznych przeciwciał zmodyfikowanego DNA

jest ograniczona do kilku laboratoriów w świecie, jednakże nic nie stoi na przeszkodzie współpracy z innymi ośrodkami pragnącymi zastosowania immunologicznych metod wykrywania zmodyfikowanego DNA. Taką gotowość współpracy deklarowali wszyscy uczestnicy konferencji. Drugą sprawą, budzącą dyskusję ogólną, było rozważenie możliwości wykrywania adduktów DNA *in situ*. Za główną przeszkodę uznano upakowanie chromatyny w jądrze, czyniące niedostępnymi determinanty antygenowe dla przeciwciał, jako środki odsłaniające proponowano nadtrawienie pronazą, trypsyną bądź działanie alkaliami, pH 9—10. Inną przeszkodę stanowi szybkość procesów reperacyjnych, która niekiedy usuwa ponad połowę adduktów w trakcie ich wykrywania (Slor). Postulowano przyspieszenie procedur immunologicznych a w każdym razie wzięcie pod uwagę tego czynnika w metodach śledzenia procesów reperacyjnych.

Wykrywalność adduktów przy pomocy metod immunologicznych na poziomie $1/10^7$ nukleozydów czyni realnym wykrywanie adduktu na poziomie poszczególnych komórek, co stwarza obiecujące perspektywy w zastosowaniu tych metod w diagnostyce klinicznej.

Z. Zarębska

RECENZJE

Das peptiderge Neuron.

Red. M. Gersch, K. Richter

VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1981, 356 stron, cena 75 M.

Neuroendokrynologia należy do tych dziedzin neurobiologii, które ostatnio bardzo szybko rozwijają się w wielu ośrodkach naukowych. Szczególnie dużo uwagi poświęca się różnym aspektom działania i właściwości neuropeptydów, zwłaszcza enkefalin i endorfin. Szereg sympozjów i konferencji obejmuje wyżej wspomniane zagadnienia, wydawane zaś z tej okazji tomy sympozjalne przedstawiają najnowsze osiągnięcia doświadczalne. Dla przykładu wymienić tu można wartościowy 87 tom *Adv. in Exper. Medicine and Biology* p.t. „Hypothalamic Peptide Hormons and Pituitary Regulation” 1977, Plenum Press (p. Recenzja „Postępy Biochemii, t. 24, Nr 3, 1978).

Napisanie monografii „Neuron Peptydergiczny”, biorąc pod uwagę powódź ukazujących się prac, jest więc przedsięwzięciem bardzo ambitnym. Podjął się tego 15-osobowy zespół naukowców z Jeny oraz z Instytutu Fizjologii A.M. w Magdeburgu pod redakcją M. Gerscha i K. Richtera. Niedawno zmarły (jak podaje IBRO NEWS z marca b.r.) prof. emer. Manfred Gersch jest znanym badaczem w zakresie neuroendokrynologii zwierząt bezkręgowych. Piętno jego osobowości i zainteresowań ogólnobiologicznych (zwłaszcza z dziedziny ewolucjonizmu) przejawiające się w sposobie ujęcia książki, czyni ją nie tylko pożyteczną, lecz bardzo ciekawą.

Sądzę, że autorzy bardzo dobrze wywiązali się z postawionego sobie zadania. Przedstawili w sposób jasny całokształt zagadnień związanych z budową i funkcjonowaniem neuronu peptydergicznego w świecie zwierzęcym. Nie ograniczyli się, jak to dzieje się w przeważającej liczbie przypadków, do zwierząt kręgowych, lecz wprost przeciwnie położyli duży nacisk na przekazanie danych o komórkach neurosekrecyjnych u bezkręgowców. Dużą zaletą książki jest rzetelne omówienie bardzo bogatego materiału faktycznego, uporządkowanie danych szczegółowych i zestawienie obfitego piśmiennictwa do r. 1978.

Całość materiału podzielono na 12 rozdziałów, bogato ilustrowanych (95 rys.) doskonałymi zdjęciami fotograficznymi, również i z mikroskopu elektronowego, i pomysłowymi schematami. Dobre objaśnienia pod rysunkami stanowią integralną część tekstu i bardzo ułatwiają jego zrozumienie. Liczne tabele i zestawienia (23) mogą być dla czytelnika źródłem informacji na temat szeregu zagadnień. Np. porównanie neuropeptydów występujących u zwierząt kręgowych i bezkręgowców; wyczerpujące zestawienie (12 str. druku) różnych neuropeptydów z podaniem ich budowy aminokwasowej (o ile jest znana), występowaniem u różnych gatunków zwierzęcych, danych bibliograficznych na temat ich właściwości, metod wyizolowania.

W specjalnych rozdziałach omówiono morfologię i elektrofizjologiczne właściwości neuronu peptydergicznego. Kilka następných rozdziałów poświęcono technice immunohistochemicznej, metodom izolowania i oznaczania peptydów neurosekrecyjnych oraz ich syntezie i modyfikacji. Jest zrozumiałym, że przeczytanie tych rozdziałów nie może zastąpić zaznajomienia się z szeroko cytowanymi pracami oryginalnymi.

nalnymi, na podstawie których można przeprowadzać własne badania doświadczalne. Jednakże wymienione rozdziały są bardzo pożyteczne, dają dobre podstawy do zrozumienia różnych metod, dla przykładu można przytoczyć test radioimmunologiczny stosowany przy oznaczaniu endorfiny.

Szczegółowo omówiono funkcje sterujące neuronów peptyderygicznych i neuro-peptydów oraz próby wyjaśnienia mechanizmu ich działania, jak rolę receptorów, funkcje cyklicznych nukleotydów.

Najważniejsze w recenzowanej książce są wg mnie interesujące uogólnienia i interpretacja danych doświadczalnych. Pozwoliło to na wysunięcie szeregu hipotez, zwłaszcza z dziedziny ewolucji układu neurohormonalnego. Szczególnie cennym jest rozdział zatytułowany „Ogólne i filogenetyczne poglądy”, w którym M. Gersch ustosunkowuje się do dotychczasowego pojęcia hormon, wskazując na konieczność rozszerzenia definicji, zgodnie zresztą z sugestią Guillemin (1978). Guillemin proponuje wprowadzenie terminu „cyberniny” dla substancji, które przekazują informacje w ustroju. Byłyby to zarówno hormony w klasycznym znaczeniu tego słowa, jak i substancje wytwarzane w neuronach i komórkach neurosekrecyjnych przenoszone drogą transportu intraneuronalnego do miejsca ich działania, jak i neurotransmitery, neuro-modulatory. M. Gersch dużo uwagi poświęca problemowi związanemu ze wspólnym ektodermalnym pochodzeniem komórek wydzielających peptydy, niezależnie od tego czy komórki te zgrupowane są w układzie nerwowym czy też w innych narządach ciała. Wiąże się to z tzw. hipotezą APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*), która choć w wielu wypadkach wymaga dalszego uzupełnienia doświadczalnego, to tym nie mniej już okazała się bardzo użyteczna i dała impuls do szeregu badań np. nad homologią peptydów występujących w skórze płazów i w różnych narządach ssaków.

Podsumowując, recenzowana książka jest bardzo cenną monografią, która powinna zainteresować zarówno endokrynologów, jak biochemików, zwłaszcza neurochemików, jak też każdego biologa, który chciałby poszerzyć swój zasób wiedzy.

S. Niemierko

„Natural Sulfur Compounds” Novel Biochemical and Structural Aspects

Red. D. Cavallini i V. Zappia
Plenum Press, 1979, New York i London, stron 552

Recenzowana książka zawiera 47 referatów wygłoszonych na III Międzynarodowej Konferencji na temat niskocząsteczkowych naturalnych związków zawierających siarkę, odbytej w Rzymie 18--21 czerwca 1979 r. Wszyscy autorzy oprócz ostatnich wyników własnych prac szeroko omawiają poszczególne tematy, przedstawiając bardzo wartościowe opracowania monograficzne. Pierwsza grupa artykułów dotyczy procesów transmetylacji opartych na S-metyloadenozylometioninie. Omówiono tu stereochemiczne aspekty metylacji hemocysteiny, catecholamin i histaminy: metylację DNA, mRNA i rRNA; biosyntezę fosfatydylocholino w mikrosomach komórek nerwowych mózgu; oraz metylację białek. W tej ostatniej pracy wykazano, że w wiązaniu się donora grup metylowych z metylowanym peptydem biorą udział zarówno grupa aminowa i karboksylowa metioniny jak i grupa aminowa adeniny. Na uwagę zasługuje silne hamowanie tych procesów przez S-adenozylhomocysteinę i 5-metylotioadenozynę będące produktami omawianych reakcji. Stąd z kolei wynika znaczenie hydrolazy S-adenozylhomocysteiny i jej inhibitorów. Jednym z ta-

kich inhibitorów hydrolazy S-adenozylhomocysteiny jest 3-deazaadenozyna hamująca procesy proliferacji komórkowej i propagacji niektórych wirusów.

W kolejnych artykułach omówiono biosyntezę w roślinach homocysteiny z O-fosfohomoseryny oraz hamowanie syntezy glutationu, glutaminy i kwasu glutaminowego przez sulfoksiminowe pochodne metioniny.

Następnym tematem jest zróżnicowanie metabolizmu aminokwasów w trakcie rozwoju osobniczego i wynikającego stąd zapotrzebowania na cysteinę i taurynę u noworodków. Omówiono tu także znaczenie dekarboksylacji S-adenozylometioniny w biosyntezie poliamin, ważnych dla biosyntezy DNA i podziałów komórkowych. Tu należy zaznaczyć, że przeciwnowotworowe działanie bis-guanylohydrazonu metylogliksalu przypisywane jest hamowaniu przez ten związek właśnie dekarboksylazy adenozylometioniny.

Wysoce interesujące jest stwierdzenie hamowania transhydrometylasy serynowej, wytwarzającej 5, 10-metyleno-tetrahydrofolian przez DL-penicylaminę i cis-2,5-bis(aminooksymetylo)piperazyno-3,6-dion. Być może obserwacja ta wyjaśnia przeciwwzpalne działanie penicyloaminy. Kolejnym zagadnieniem jest metabolizm 5'-metylotioadenozyny, jednego z głównych produktów metabolizmu S-adenozylometioniny. Okazało się, że związek ten i niektóre jego analogi posiadają działanie antymitotyczne.

Dalsze artykuły dotyczą metabolizmu i fizjologicznego znaczenia tauryny i hypotauryny. Ostatnio stwierdzono, że tauryna jest niezbędna dla rozwoju ssaków, utrzymania aktywności serca oraz zachowania funkcji siatkówki oka. Ponadto związek ten stabilizuje błony komórkowe i działa jako neurotransmitter. Niezbędny jest on także dla rozwoju mózgu. Wykazano trzy drogi powstawania tauryny: przez dekarboksylację kwasu cysteiniosulfonowego powstającego z cysteiny pod działaniem jej oksygenazy i późniejsze jego utlenianie; przez utlenianie cysteaminy specyficzną oksygenazą; przez inkorporację nieorganicznego siarczanu w postaci fosfoadenozylfosfosiarczanu. Innym znaczącym odkryciem jest stwierdzenie niezbędności tauryny dla niemowląt. Mleko ludzkie zawiera znaczne ilości tauryny w przeciwieństwie do mleka krowiego, czego nie uwzględniają jeszcze receptury na mieszanki pokarmowe dla niemowląt. Szczególną wrażliwość na brak tauryny wykazują noworodki kocie.

Kolejnym zagadnieniem była rola izetionianu kwasu 2-hydroksyetylosulfonowego w aksonach nerwów wątroby. Dalej znajdujemy omówienie hamowania biosyntezy białka przez tializynę, tiazoleucynę i tiaprolinę (aminokwasy o zastąpionej grupie CH_2 przez atom siarki); omówienie siarkowych alkaloidów lilij wodnej (J. T. Wróbel i wsp. z Wydziału Chemii UW); oraz omówienie pochodnych 1,2-tiolanu o działaniu przeciwbakteryjnym i owadobójczym.

Duże zainteresowanie musi wzbudzić efektywność penicyloaminy i tiopirydoksyny w doświadczalnej terapii gośćca. Przedstawione wyniki wskazują, że penicyloamina jest nie tylko czynnikiem przeciwwzpalnym lecz działa także jako rzeczywisty czynnik przeciwgośćcowy hamując reumatoidalną erozję chrząstki i kości oraz deformacje stawów.

Wśród pozostałych kilkunastu artykułów znajdujemy jeszcze omówienie mechanizmu powstawania wiązania C-S w trakcie biosyntezy biotyny, biosyntezę kwasu liponowego w wątrobie szczura; niektóre nowe aspekty metabolizmu witamin zawierających siarkę (kwas liponowy, biotyna, cysteinoryboflawina); wpływ panteiny (prekursora CoA) na hiperlipidemię w eksperymentalnej cukrzycy; wpływ leków wywołujących hypolipidemię (klofibrat: etylo-alfa-p-chlorofenoksyizomaślan) na biosyntezę CoA w wątrobie szczura; oraz opracowanie kliniczno-analitycznych metod dla merkaptomleczanu, tiosiarczanu i tiocyjanianu.

Drugi artykuł z naszego kraju (A. Koj, Uniwersytet Jagielloński) dotyczy we-

wnątrzkomórkowego rozmieszczenia i biologicznych funkcji sulfurotransferazy merkaptopirogronianu i rodenazy. Chemików zajmujących się syntezą półsyntetycznych penicylin zainteresuje artykuł o półsyntetycznych cefalosporinach.

Omawiany tom zamyka wartościowe podsumowanie licznych jeszcze białych plam w enzymologii organicznych związków siarki przedstawione przez D. Cavallini i wsp.

S. Bitny-Szlachto

NATO Advanced Study Institutes Series, Vol. A26: „Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications”.

Red. Richard T. Walker, Erik De Clerq i Fritz Eckstein, Plenum Press, New York, London, 1979, stron 459, cena \$ 39,50

Pochodne nukleozydowe należą do związków potencjalnie aktywnych jako środki przeciwwirusowe oraz przeciwnowotworowe. Szereg związków z tej grupy stosowanych jest już z powodzeniem w klinice, inne poddawane są testom klinicznym. Stale jednak postępy badań nad chemiczną syntezą pochodnych nukleozydowych znacznie wyprzedzają poznawanie ich działania biologicznego, a w szczególności możliwości ich klinicznego zastosowania. Jest to wynikiem niedostatecznej współpracy między chemikami, biochemikami, farmakologami i klinicystami.

Recenzowana książka jest zbiorem wykładów przeglądowych wygłoszonych na kursie zorganizowanym w Sogesta we Włoszech w 1979 roku. Celem tego kursu, zorganizowanego wspólnie przez NATO Advanced Study Institute i FEBS Advanced Study Course, było zgromadzenie specjalistów z różnych dziedzin, zaangażowanych w projektowanie, syntezę, testowanie i stosowanie w klinice oraz taka dyskusja problemów poszczególnych dziedzin, która ułatwiłaby wzajemne zrozumienie i wzmocniła przepływ informacji. Książka zawiera 15 wykładów, których forma podporządkowana jest powyższemu celowi: Konformacje nukleotydów; reguły i wyjątki (W. Saenger). Badania właściwości konformacyjnych nukleotydów przy zastosowaniu metody magnetycznego rezonansu jądrowego (S. S. Danyluk), Metody syntezy nukleotydów (H. Vorbrüggen), Transformacje chemiczne reszty cukrowej nukleotydów (J. G. Moffat), Chemia nukleotydów pirymidynowych i ich pochodnych występujących w naturze (M. J. Robins), Chemia reszty heterocyklicznej nukleotydów purynowych i niektórych ich bliskich analogów (L. B. Townsend), Mechanizmy hamowania wzrostu komórek oraz rozmnażania wirusów przez aranukleozydy i aranukleotydy (S. S. Cohen), Pobieranie i metabolizm nukleotydów purynowych i ich analogów przez komórki (W. E. G. Müller), Podstawy wybiórczej aktywności antywirusowej i antynowotworowej analogów nukleotydów pirymidynowych (W. H. Prusoff i P. H. Fischer), Otrzymywanie antymetabolitów skierowanych przeciwko wirusom *Herpes*, wykorzystujących enzymy indukowane przez te wirusy (Y. C. Cheng, M. Ostrander, D. Derse i J.-Y. Chen), Układy testowe wartościujące aktywność antywirusową analogów nukleotydowych (R. W. Sidwell), Układy testowe wartościujące aktywność antynowotworową analogów nukleotydowych (F. M. Schabel, Jr.), Powodzenie terapii antywirusowej wymaga współdziałania odpowiedzi immunologicznej (T. C. Merigan i H. E. Renis), Zastosowanie kliniczne analogów nukleotydowych w chorobie nowotworowej (A. Rossi). Poszczególne wykłady ilustrowane są bogato schematami i zawierają przegląd literatury.

Omawiana książka jest cennym interdyscyplinarnym przeglądem stanu wiedzy na temat analogów nukleotydowych.

W. Rode

Entstehung und molekulare Evolution des Lebens; H. Reinbothe und G.-J. Krauß

G. Fischer Verl., Jena 1982, str. 306, tablic 65, rycin 7, tabel 21; cena 17 M

Wydawnictwo G. Fischera podjęło ostatnio inicjatywę edytorską trzynomowej serii kieszonkowych książek z zakresu ewolucji biologicznej. W 1979 r. wyszło 3. wydanie *Historii rozwoju rodowego człowieka* A. Feustela, zaś w 1980 r. B. Fukarka i G. Kämpfego *Ewolucja i historia rozwoju rodowego organizmów*. Trzecią pozycją jest właśnie *Powstanie i ewolucja molekularna życia*, napisana przez prof. dra Horsta Reinbothe, biochemika i dra Gerda-Joachima Kraussa, wykładowcę z tegoż uniwersytetu w Halle.

Omawiana książka nie jest pomyślana jako podręcznik. Jest to raczej specjalistyczna publikacja popularyzacyjna, odpowiadająca poziomem tym trudniejszym spośród tomików naszej serii „Omega”. Jak wyniknie z dalszych moich uwag — nie jest to bynajmniej tekst popularny, choć autorzy piszą we wstępie, iż „odbiegając od ścisłej normy naukowego sposobu wypowiedzi wybierali częstokroć podejście teleologiczne, w którym cząsteczki, żywe komórki i organizmy, albo natura w ogóle — pozwalają się traktować jako podmioty obdarzone zdolnością rozumienia”. Miało to w ich mniemaniu przybliżyć czytelnikowi sprawy z natury swojej odległe przez ich abstrakcyjność.

Ujęciem treści książki przypomina wiele opracowań z zakresu egzobiologii (tzn. dotyczących domniemanego życia we Wszechświecie pozaziemskim). Tam pytanie o życie w Kosmosie bywa zwykle pretekstem do wyłożenia ogólnych zagadnień biologii. I tak obszerna część I książki, zatytułowana „Fakty i zapytania”, a obejmująca równe 130 stron (z 257 stron właściwego tekstu), stanowi właśnie rodzaj *vademecum* biologiczno-biochemicznego ukierunkowanego na zagadnienia ewolucji biologicznej. W trzech rozdziałach — „Życie i istota żywa”, „Jak funkcjonuje życie?” oraz „Jak powstało życie?” — znajdujemy różnorodne informacje, pogrupowane w dziewięciu paragrafach, z których niektóre obejmują z kolei ustępy niższej rangi. Odpowiadają one różnemu stopniowi pogłębienia poszczególnych aspektów odnosnych tematów. Z natury rzeczy więcej uwagi poświęcono zagadnieniom związanym z budową komórki, bion biologicznych, problemowi przemiany materii i procesom genetycznym — zwłaszcza od strony biologii molekularnej — oraz mechanizmom ewolucji (mutacjom i doborowi).

Punkt wyjścia do rozważań w części drugiej uzupełniają ogólne stwierdzenia dotyczące — życia i rozwoju materii. Znajdujemy tu więc zarys termodynamiki układów otwartych oraz informacje o nowym międzydyscyplinarnym dziale nauki, opartym na termodynamicznej teorii procesów nieodwracalnych I. Prigogine'a — synergetyce. Ta nowa dziedzina, zapoczątkowana przez pracę H. Hakena (1977: *Synergetyka. Wprowadzenie. Niezrównoważone przejścia fazowe i samoorganizacja w fizyce, chemii i biologii*), wykorzystuje elementy zarówno teorii układów, jak i informacji. Jak piszą autorzy (s. 133), „przez wzmocnienie statystycznych wahań elementów układu w nieliniowych układach niezrównoważonych — które utrzymują się daleko od stanu równowagi termodynamicznej — rozwijają się struktury dyssypatywne”. Dalej stwierdzają, że „synergetyka opisuje efekty kooperacyjne samoorganizującej się materii”. Temu zagadnieniu poświęcono ok. 10 stron tekstu, prowadzącego do modelu M. Eigena — hipercyklu jako zasady naturalnej samoorganizacji.

Powstaje pytanie, jak wymienione rozważania nawiązują do tytułowego pojęcia życia. Obok filozoficznej definicji marksistowskiej: „życie jest szczególną formą ru-

* W słowniczku na końcu książki można znaleźć (w dwóch hasłach), że są to dynamiczne stany uporządkowane w układach otwartych, utrzymujące się podczas dyssypacji energii — czyli jej rozsiewania połączonego ze wzrostem entropii.

chu materii” — znajdujemy też sformułowania o większym stopniu przyrodniczej konkretności mogące więc tym samym bliżej wiązać się z przyrodniczymi faktami omawianymi w książce.

A więc — „biosfera [...] jest w sensie termodynamicznym specjalnym stanem (quasi-)stacjonarnym materii. Dyssypacja «gorących» kwantów światła o temp. ok. 6000 K wpadających ze Słońca do biosfery stwarza strumień negentropii, który podtrzymuje struktury dyssypatywne: fale, wiry, turbulencje i również złożone struktury przestrzenne i czasowe ziemskiego życia (P. DECKER)” (s. 15).

Jako ogólne cechy życia autorzy wymieniają tylko rozród połączony z dziedzicznością oraz dziedziczną zmienność (mutacja). Uzupełnia to nieco dyskusja pojęcia „żywy” i wprowadzonego pojęcia istoty żyjącej. Jego określenie nawiązuje zarówno do sformułowań już podanych, jak i prowadzi do problematyki ewolucyjnej. A więc — „istoty żywe są szczególnym rodzajem struktur dyssypatywnych, których swoistość polega na ich jednostkowości (= indywidualizacji), na ich ciągłości w wyniku następstwa pokoleń oraz na tym, że informacja zmagazynowana w specjalnych rodzajach reakcji jest bardzo duża”. Układy żywe zatem, to znaczy zindywidualizowane układy fizykochemiczne, które odznaczają się zdolnością dziedziczenia i zmienności dziedzicznej, rozmnażają się i selektywnie dostosowują do środowiska przez dobór najlepiej przystosowanego („fittest” DARWINA). „Istoty żywe są więc układami zdolnymi do ewolucji” (s. 15). Są to (s. 16) „układy otwarte i zarazem cybernetyczne (P. DECKER). Przez to można by je przyporządkować klasie struktur dyssypatywnych, które określono (DECKER) jako „bioidy”. Układy żywe — w tej terminologii — są uzyskaną ewolucyjnie specyficzną formą bioidów, które posługują się nukleoproteidowym mechanizmem zakodowanej obróbki informacji [?! — przyp. J. C.], tzn. informację magazynują w kwasie desoksyrybonukleinowym (DNA) i realizują przez syntezę białek”. Widać tu jasno punkt wyjścia autorów do dalszych rozważań biochemicznych, genetycznych i ewolucyjnych. Tekst tej części I uzupełnia 8 tabel oraz 38 rycin. Niektóre z nich przedstawiają schematy mające rozbudować wywody prowadzone w tekście.

Druga część tomiku, zatytułowana nieco kryminalistycznie — „Zabezpieczanie śladów i eksperymenty modelowe”, nosi odmienny charakter. Jest tu wprawdzie nadal wiele informacji faktycznych. Należy do nich np. rys geologii historycznej, opis najstarszych śladów życia czy „leksykon kodu genetycznego”. Najistotniejszym wszakże składnikiem są hipotezy oraz — stojące między obiema grupami rozważań — opisy doświadczeń biochemicznych i z biologii molekularnej dotyczących powstania życia (rozd. 5).

Punktem wyjścia do tych eksperymentów są rozważania ekstrapolujące wstecz, w okres ewolucji prebiotycznej, warunki geochemiczne i geofizyczne. Na przykład na wykresie (Ryc. 43) możemy znaleźć opis ilościowy źródeł energii dla prebiotycznej syntezy na Ziemi w jej wczesnym okresie. Bardziej ku hipotezom zbliżają się opisy czterech stadiów ewolucji atmosfery ziemskiej, poprzedzających jej stan obecny (ss. 148, 158—160). Dowiadujemy się, że pierwotna atmosfera — składająca się z podobnych do gazu cząsteczek protoplanetarnej chmury pyłowo-gazowej, stosunkowo bogata w wodór, hel i inne gazy szlachetne, metan, amoniak itp. — uleciała w przestrzeń międzyplanetarną. Bardzo wczesna Ziemia została więc chwilowo bez atmosfery. Pierwsza prawdziwa atmosfera zaczęła otaczać ochładzającą się planetę ok. 4 mld lat temu, gdy wyodrębniła się hydrosfera (nb. obecnie najczęściej przyjmuje się, że Układ Słoneczny wraz z Ziemią powstał ok. 4,6 mld lat temu, a cały Wszechświat — ok. 20 mld lat temu). Ta tzw. drugorzędowa atmosfera powstała z wyziewów wulkanicznych gazów. „Powietrze” zawierało wówczas, jak dowiadujemy się dalej z książki, prócz dominującego wodoru — metan, amoniak i parę wodną, nadto H_2S i HCN ; było to środowisko beztlenowe, redukujące. Wskutek pro-

cesów zachodzących pod wpływem ultrafioletu, a zwłaszcza rozpadu wody — po ok. miliardzie lat nastąpiła era atmosfery trzeciorzędowej, z przewagą CO_2 i N_2 , a zanikiem wolnego wodoru. Stopniowo, przed ca 1,8—1,4 mld lat, wykształciła się czwartorzędowa atmosfera oksydacyjna. Jednak zawartość w niej tlenu osiągnęła zaledwie ok. 0,01 dzisiejszej wartości. Dalszy proces był już tylko „mikroewolucją” tej atmosfery, zachodzącą pod wpływem biosfery, zwłaszcza organizmów fotosyntetyzujących. Podane poglądy na etapy w rozwoju atmosfery Ziemi są podbudowane danymi o atmosferach innych planet naszego Układu Słonecznego (np. drugorzędowa jest porównywalna z jowiszową).

W tej części książki znajdujemy tabelę — Ryc. 45 — podającą informacje o praoorganizmach i wczesnych formach żywych, a mianowicie prekambryjskie skamieniałości chemiczne i organiczne. Podobna do niej, suplementarna tabela — nie numerowana, na sztywnej ruchomej wkładce — podaje chronologię zmian atmosfery, pojawu organizmów z pięciu grup *Prokaryota* oraz z trzech grup *Eukaryota* (tj. glonów jednokomórkowych, „makroskopowych” i zwierząt bezkręgowych).

Swego rodzaju układ odniesienia do rozważań na temat ewolucji chemicznej oraz okazji do dyskusji problemu „dyspersji” życia w Kosmosie (tj. jakby nowej wersji hipotezy panspermii Svante Arrheniusa) stanowi opis związków chemicznych (H_2O , CO , HCN , H_2CO , HCOOH , NH_2CHO i in.) — stwierdzonych spektroskopowo w mgławicach gazowych oraz związków znalezionych w niektórych meteoroidach kamiennych zwanych chondrytami węglowymi. W tych ostatnich jak wiadomo, znaleziono liczne aminokwasy (np. 18 w meteorycie Murchison) i kwasy organiczne oraz mikrostruktury*). Podobne do tych ostatnich, znalezione na Ziemi — a określone wyżej mianem „skamieniałości chemicznych” — sięgają wieku 3,8 mld lat (np. 3—30 μm *Isuasphaera*, zbliżona do drożdży, z pokładów kwarcytu Isua w pd.-zach. Grenlandii).

Omówione w książce „biochemiczne i molekularno-biologiczne doświadczenia dotyczące powstania życia” (rozdz. 5), prócz problematyki wzmiankowanego już kodu genetycznego dotyczą prób syntezy biomolekuł w prebiotycznym okresie Ziemi. Chodzi tu o tzw. eksperymenty symulacyjne w tym słowa znaczeniu, że w laboratorium utrzymuje się sztucznie przypuszczalne prymitywne warunki ziemskie — zwłaszcza w zakresie wyładowań elektrycznych, napromieniania ultrafioletem i składu chemicznego „atmosfery”. Do tego celu prowadziły właśnie rozważania nad ewolucją naszej atmosfery.

Najpierw znajdujemy informacje o reakcjach prowadzących do powstania z „pracząsteczek” takich prostych związków jak węglowodory czy hydrazyna — oraz do wytworzenia monomerów. Jest tu więc abiogenna synteza aminokwasów, składników kwasów nukleinowych, puryny i pirymidyny, nukleozydów i nukleotydów, cukrów, lipidów i porfiryn. Z kolei poświęcono uwagę abiogennej syntezie makrocząsteczek — protenoidów, polinukleotydów i polisacharydów.

Integralną część książki stanowią tabele i rysunki. Większość z tych ostatnich ma charakter schematów — nie tylko ilustrujących budowę — np. komórki, mitochondrium, błony biologicznej czy kwasu nukleinowego, ale też często ilustrujących przebieg procesów, jak przepływ energii w organizmie żywym lub przepływ informacji i procesy morfogenetyczne w ontogenezie tkankowca. Prócz indeksu i wykazu piśmiennictwa w języku niemieckim i angielskim (właściwym dla oryginału — jak przy C. Darwinie!), podzielonego na części nawiązujące do poszczególnych roz-

* Wykaz dziesięciu spośród nich można znaleźć w Tabeli 2, w książce Z. Ilczuka pt.: „Na tropach życia pozaziemskiego”, „Iskry”, Warszawa 1981; Tabela 3 wymienia 16 kwasów organicznych, zaś Tabela 1 — przykłady podobnych do skamieniałości mikrostruktur z chondrytów węglowych.

działów — na końcu tomiku znajdujemy 17 stron „ABC ważniejszych wyrazów fachowych” z ok. 170 hasłami.

Tak pomyślana i zrealizowana praca nie jest wolna od braków. O niektórych z nich mogą zorientować wcześniejsze fragmenty naszego omówienia.

Na przykład przytoczony obszerniejszy fragment tekstu dotyczący synergetyki ilustruje chyba dobitnie najważniejszy bodaj mankament książki: ciężkość jej „telegraficznego” stylu. Zdaniem recenzenta stawia ona pod poważnym znakiem zapytania całą zamierzoną przez autora popularność wykładu.

W koncepcji treści daje się odczuć brak powiązania między termodynamiczną cechą istot żywych jaką jest ich quasi-stacjonarność (tj. utrzymywanie stosunkowo niskiego poziomu entropii) a ich strukturą, zorganizowaniem — wszak są one właśnie „organizmami”! Logiczne przejście do konieczności ich zorganizowania morfologiczno-strukturalnego umożliwiłoby uprzednie rozwinięcie uwag o teorii układów, zwrócenie uwagi na to, że układ quasi-stacjonarny jest wszak homeostatem, a to przy większych rozmiarach (zwłaszcza istot wielokomórkowych, ale problem rozpoczyna się już w komórce) może być osiągnięte tylko przy odpowiednim rozmieszczeniu elementów w przestrzeni i uporządkowaniu procesów w czasie. Tymczasem ani pojęcia homeostazy ani homeorezy w książce nie ma. W tej sytuacji podane przez autorów ogólne cechy życia są tylko tymi, które umożliwiają jego kontynuację (rozmród) i zmiany jego form (dziedziczność, zmienność). Pomijają natomiast, paradoksalnie, cechę najistotniejszą dla ogólnej definicji życia, umożliwiającą trwanie owego „dyssypatywnego układu”, organizmu — zdolność homeostatyczną. Tak więc zarówno struktura życia, jak i metabolizm zawisły w książce w logicznej próżni — mimo całego termodynamicznego wstępu. Aż chciałoby się w tym miejscu życzyć, by autorzy zaczęli choćby parę cytatów z bardziej w tym względzie spójnych logicznie co do toku wyводу — choć bardziej popularnych, a na pewno miejscami bardziej kontrowersyjnych — książek H. von Ditleurtha! W obecnym stanie tekstu teoria układów jest do niego jak gdyby „przyczepiona” w postaci dwóch trudnych do zrozumienia rysunków (2 i 3) i... hasła „układ (*System*)” w słowniczku.

W odniesieniu do omówienia hipotetycznych dróg ewolucji, gdzie wszak nie brakuje opisu równie hipotetycznych jej warunków, odczuwa się brak jakiegokolwiek wzmianki o znanych przecież losach magnetosfery, tego płaszcza ochronnego biosfery ziemskiej przed wpływem wysokoenergetycznych cząstek — choć wiatr słoneczny i promienie kosmiczne wymieniono na Ryc. 43 wśród źródeł energii dla prebiotycznej syntezy organicznej. Ale też i rola promieniowania jonizującego w indukowaniu mutacji nie znalazła dostatecznego odbicia w tekście.

Do drobniejszych „grymasów” recenzenta można zaliczyć jego dyskomfort płynący z niezgodności chronologii zmian atmosfery na wykresie (bez numeru) na wkładce z podaną w tekście. Można by też chyba odżałować tablicę 2a, b, przedstawiającą fotogrametryczne zdjęcie ze sputnika powierzchni pewnego obszaru NRD i plan użytkowania ziemi mniej więcej tego samego obszaru. Potrzeba takiej ilustracji jest w ogóle niejasna. Brak zaś kompletnej odpowiedniości obu obrazów zamiast ilustrować korzyści zdjęć z kosmosu prowadzi czytelnika na swego rodzaju manowce: skłania do szukania, ile też jest między tymi ilustracjami różnic, a ile podobieństw...

Podsumowując: książka nadaje się raczej chyba dla wykładowców czy autorów odczytów naukowych jako swoisty „bryk” — z jakich korzystało się czasem w szkole — niż dla czytelnika-niespecjalisty, pragnącego poznać zagadnienie powstania i molekularnej ewolucji życia. Tego ostatniego może snadnie przytłoczyć nadmiar różnorodnych, szczegółowych informacji.

J. A. Chmurzyński

DIE ZELLE — Atlas der Ultrastruktur; Red. Joachim Ude, Michael Koch

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982, str. 269, cena 45.- M

Dynamiczny rozwój mikroskopii elektronowej jaki miał miejsce w ostatnim trzydziestoleciu przyczynił się do głębokiego poznania i zrozumienia struktury i funkcji komórki będącej elementarną cząstką żywego organizmu. Technika ta, bez przesady rzecz można, położyła pomost między ogromnymi dziedzinami wiedzy, biologią i biochemią, między ultrastrukturą widzianą w mikroskopie elektronowym a złożoną strukturą molekularną związków chemicznych, z których poszczególne elementy komórkowe są zbudowane. Nadal jednak wysokie kwalifikacje badaczy podejmujących trudną interpretację wyników uzyskanych przy zastosowaniu mikroskopii elektronowej, jak również względy techniczne i wysoki koszt eksploatacji aparatury, czynią tę technikę ekskluzywną pomimo jej wielkiej popularności i użyteczności. Istnieje potrzeba udostępnienia osiągnięć tą techniką uzyskanych w sposób prosty i przemawiający do wyobraźni, a jednocześnie rzetelnie oddający istotę zjawisk.

Tego zadania z doskonałym efektem podjęli się autorzy recenzowanej książki. Postawili oni sobie za cel zilustrowanie wnętrza komórki w sposób taki, by jego złożony i płaski w przekroju obraz widziany w mikroskopie elektronowym, trudny często do zrozumienia, ujawnił się czytelnikowi w pełnej trójwymiarowej postaci. By obraz ten nałożony na schematy reakcji chemicznych zachodzących we wnętrzu licznych i jakże zróżnicowanych struktur komórkowych pozwolił zrozumieć ich funkcję będącą oczywistą konsekwencją pozornie martwych form morfologicznych.

Zaprezentowany atlas struktur komórkowych zawiera bogaty materiał zdjęciowy (198 zdjęć z mikroskopu elektronowego, zestawionych w 78 tabelach) oraz schematy (39 tablic i 20 rysunków), które — w fascynujący sposób przekonująco plastyczny i barwny — przetwarzają płaskie i szare obrazy z mikroskopu elektronowego nadając im strukturę przestrzenną, a tę wypełniając molekularnymi strukturami przebiegających w niej reakcji biochemicznych. Wszystkie zdjęcia i schematy opatrzone są zwięzłym tekstem opisującym zarówno morfologię prezentowanych struktur komórkowych z nawiązaniem do pełnionych przez nie funkcji, jak również przebieg podstawowych procesów chemicznych u podstawy tych funkcji leżących. Ponadto, autorzy odsyłają czytelnika do licznych pozycji literaturowych. Przedstawiony materiał jest tak dobrany by prezentując daną strukturę w wielorakich formach — w jakich w różnych typach komórek występuje — poównać komórki prokariotów i eukariotów, komórki roślinne i zwierzęce, wreszcie wyspecjalizowane komórki różnych tkanek (na przykład komórki wydzielnicze) wyjaśniając istotę obserwowanych różnic.

Szeroki zakres ilustrowanego w książce materiału nie pozwolił autorom zapewne na prezentację wielu aktualnych szczegółów, które każdy dzień badań naukowych dodaje do skarbcza naszego poznania. Syntetyczny natomiast sposób w jaki materiał ten został zestawiony i zaprezentowany sprawia, że książka stanowi cenne uzupełnienie podręczników biologii i biochemii, a w szczególności histologii i cytologii roślin, zwierząt i człowieka. Korzystać z niego mogą zarówno studenci biologii i medycyny, weterynarii i wyższych szkół rolniczych, jak lekarze i nauczyciele biologii szkół średnich oraz nauczyciele akademicki. Wartości poznawcze i dydaktyczne tej książki są niezaprzeczone.

B. Skoczylas

PIERWSZY KOMUNIKAT
III-ego MIĘDZYNARODOWEGO KONGRESU BIOLOGII
KOMÓRKI

III Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki odbędzie się w dniach 26—31 sierpnia 1984 r. na terenie Keio Plaza Hotel w Tokio.

Członkowie IFCB otrzymują drugie zawiadomienie w połowie 1983 r. Osoby zainteresowane Kongresem, nie będące członkami IFBC proszone są o skontaktowanie się z Sekretariatem Kongresu:

Secretary General — Dr. T. Okigaki
Congress Secretariat — Shigei Medical Research Institute
2117 Yamada, Okayama, 701-02
Japan

SPIS TREŚCI — TOM 28, 1982

ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

J. Fronk — Geny mozaikowe — struktura, ekspresja, ewolucja	3
J. Jaruzelska, R. Słomski — Metabolizm i funkcja biologiczna niskocząsteczkowych jądrowych RNA	25
J. Stawiński — Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej	45
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Polipeptydowe czynniki wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych	71
A. M. Rychter — Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych	89
A. E. Liczmański — Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe	113
J. Gniot-Szulżycka — Wodorosiarczan kwasu askorbinowego	
W. Bednarski, S. Poznański — Synteza plastein w hydrolizatach białkowych	145
A. Paszewski — Immunoglobuliny — zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem	175
M. J. Nałęcz, L. Wojtczak — Ładunek powierzchniowy błon biologicznych i jego funkcje regulacyjne	191
P. Krysiński — Zastosowanie impulsowych technik pomiarowych w badaniach sztucznych błon lipidowych	227
E. Herzyk — Fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich	251
E. I. Wałajtys-Rode — Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych	279
E. Bańkowski — Polimorfizm molekularny kolagenu kręgowców	301
E. Włoch, St. Więckowski — Karotenoidy aparatu fotosyntetycznego	331
W. M. Przybyszewski, J. Malec — Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika	353
J. Kwiatkowska — Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy	401
G. Adler — Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cykazy adenylowej	413
H. Krotkiewski — Struktura łańcuchów cukrowych glikoprotein i metody jej badania	433
Z. Krawczyk — Oddziaływanie bakteryjnej polimerazy RNA z regionem promotora	465
S. Gröbner — Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej	487

NOWE W BIOCHEMII

B. Grzelakowska-Sztabert — Kokancerogen jako czynnik zwiększający częstotliwość mutacji odpowiedzialnej za oporność komórek na antyfoliany	391
J. Barciszewski — Transferowe kwasy rybonukleinowe. Właściwości i struktura	395

RECENZJE KSIĄŻEK

B. Jacó rzyński — Biochemia w cukrownictwie. M. Z. Chelemski, M. L. Pelc, I. P. Sapożnikowa, WNT, Warszawa, 1981	165
J. S. Knypl — Aspects of Photosynthesis. D. Das. Publ. Mitra Das, Calcutta, 1981	166
K. Włodarski — Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression. Biomechanische Modellversuche und tierexperimentelle Untersuchungen. G. Mayer. VEB Georg Thieme, Leipzig, 1981	167
B. Kędzierska — The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Red. W. J. Lennarz. Plenum Press, New York, London, 1980	168
A. Przełęcka — Freeze-etching — Methods and application in membrane research. Wyd. H. W. Meyer, XXIII Suplement czasopisma Acta Histochemica, 1981	373
Z. Zielińska — Cellular Immunology — selected readings and critical commentary Wyd. L. Vicky Sato i Malcolm L. Gefter. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, 1981	374
T. Badzio — Pathobiochemie der Leber. R. J. Haschen. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981	375
L. Wojtczak — Bioenergetics — An Introduction to the Chemiosmotic Theory. David G. Nicholls. Academic Press, London—New York, 1982	377
L. Wojtczak — Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. Rolf Dargel. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981	377
S. Niemierko — Das peptiderge Neuron. Red. M. Gersch, K. Richter. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981	507
S. Bitny-Szlachto — Natural Sulfur Compounds. Novel Biochemical and Structural Aspects. Red. D. Cavallini i V. Zappia. Plenum Press, 1979, New York	508
W. Rode — NATO Advanced Study Institutes Series, Vol. A26. Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications. Red. R. T. Walker, E. De Clerq i F. Eckstein, Plenum Press, New York, 1979	510
J. A. Chmurzyński — Entstehung und molekulare Evolution des Lebens. H. Reinbothe und G. J. Krauss. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982	511
B. Skoczylas — Die Zelle — Atlas der Ultrastruktur; Red. J. Ude, M. Koch, Jena, 1982	515

KRONIKA

Sprawozdanie — z 11th Linderström-Lang Conference nt. Poliaminy jako regulatory komórkowe, Helsinki, 1981, (K. Kamiński)	155
Sprawozdanie — FEBS Advanced Course No. 81 — nt. Control and Processing in the Biosynthesis of Macromolecules, Spetses (Grecja), 1981, (K. Szyfter)	156
Sprawozdanie — z VIII Międzynarodowego Zjazdu Towarzystwa Neurochemicznego (Anglia), 1981, (B. Oderfeld-Nowak, A. Potempska, J. Skangiel-Kramaska)	158
Sprawozdanie — z XVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 1981, (A. Morawiecki, J. Kwiatkowska)	161
Prof. dr Józef Heller — (1896—1982)	386
Wspomnienie o Profesorze Józefie Hellerze	387

Sprawozdanie — z III Konferencji Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi (Holandia), 1981, (B. Czartoryska)	503
Sprawozdanie — z Konferencji n.t. immunologicznych metody wykrywania antygenów jądrowych istotnych w procesach rakotwórczych i chemioterapii (Anglia), 1982, (Z. Zarębska)	504
Komunikat — III Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki (Tokio)	516

INDEKS AUTORÓW — TOM 28, 1982

A

Adler G. — Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cyklu adenylowej	413
--	-----

B

Badzio T. — Recenzja książki — Pathobiochemie der Leber. R. J. Haschen. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1981	375
Bańkowski E. — Polimorfizm molekularny kolagenu kręgowców	301
Barciszewski J. — Transferowe kwasy rybonukleinowe. Właściwości i struktura	395
Bednarski W., Poznański S. — Synteza plastein w hydrolizatach białkowych	145
Bitny-Szlachto S. — Recenzja książki — Natural Sulfur Compounds. Novel Biochemical and Structural Aspects. Red. D. Cavallini i V. Zappia. Plenum Press, New York, 1979	508

C

Chmurzyński J. A. — Entstehung und molekulare Evolution des Lebens. H. Reinbothe und G. J. Krauss. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1982	511
Czartoryska B. — Sprawozdanie z III Konferencji Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi (Holandia), 1981	503

F

Farbiszewski R., Gabryel H. — Polipeptydowe czynniki wzrostu komórek prawidłowych i nowotworowych	71
Fronk J. — Geny mozaikowe — struktura, ekspresja, ewolucja	3

G

Gabryel H. — (patrz Farbiszewski R., Gabryel H.)	71
Gniot-Szulżycka J. — Wodorosiarczan kwasu askorbinowego	
Gröbner S. — Właściwości i funkcje białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej	487
Grzelakowska-Sztábert B. — Kokancerogen jako czynnik zwiększający częstotliwość mutacji odpowiedzialnej za oporność komórek na antyfoliany	391

H

Herzyk E. — Fosforylacja białek błony komórkowej erytrocytów ludzkich	251
---	-----

J

Jacórzyski B. — Recenzja książki — Biochemia w cukrownictwie. M. Z. Chelemski, M. L. Pelc, I. P. Sapoźnikowa. WNT, Warszawa, 1981	165
---	-----

Jaruzelska J., Słomski R. — Metabolizm i funkcja biologiczna nisko-cząsteczkowych jądrowych RNA	25
K	
Kamiński K. — Sprawozdanie z 11th Linderström-Lang Conference n.t. Poliaminy jako regulatory komórkowe, Helsinki, 1981	155
Kędzierska B. — Recenzja książki — The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. Red. W. J. Lennarz. Plenum Press, New York, London, 1980	168
Knypl J. S. — Recenzja książki — Aspects of Photosynthesis. D. Das. Publ. Mitra Das, Calcutta, 1981	166
Krawczyk Z. — Oddziaływanie bakteryjnej polimerazy RNA z regionem promotora	465
Krotkiewski H. — Struktura łańcuchów cukrowych glikoprotein i metody jej badania	433
Krysiński P. — Zastosowanie impulsowych technik pomiarowych w badaniach sztucznych błon lipidowych	227
Kwiatkowska J. — (patrz Morawiecki A., Kwiatkowska J.)	
Kwiatkowska J. — Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy	401
L	
Liczmański A. E. — Roślinne dysmutazy ponadtlenkowe	113
M	
Malec J. — (patrz Przybyszewski W. M., Malec J.)	353
Morawiecki A., Kwiatkowska J. — Sprawozdanie z XVIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, 1981	
N	
Nałęcz M. J., Wojtczak L. — Ładunek powierzchniowy błon biologicznych i jego funkcje regulacyjne	191
Niemierko S. — Recenzja książki — Das peptiderge Neuron. Red. M. Gersch, K. Richter. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981	507
O	
Oderfeld-Nowak B., Potempska A., Skangiel-Kramska J. — Sprawozdanie z VIII Międzynarodowego Zjazdu Towarzystwa Neurochemicznego (Anglia), 1981	158
P	
Paszewski A. — Immunoglobuliny — zmiany genetyczne związane z ich powstawaniem i różnicowaniem	175
Potempska A. — (patrz Oderfeld-Nowak B., Potempska A., Skangiel-Kramska J.)	
Poznański S. — (patrz Bednarski W., Poznański S.)	145
Przełęcka A. — Recenzja książki — Freeze-etching — Methods and application in membrane research. Wyd. H. W. Meyer. XXIII Supplement czasopisma Acta Histochemica, 1981	373
Przybyszewski W. M., Malec J. — Molekularne i komórkowe efekty działania hydroksymocznika	353
Rode W. — Recenzja książki — NATO Advanced Study Institutes Series, Vol. A26. Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications. Red. R. T. Walker, E. De Clerq i F. Eckstein, Plenum Press, New York, 1979	510

R

- Rychter A. M. — Alternatywna droga oddechowa w roślinach wyższych 89
 Słomski R. — (patrz Jaruzelska J., Słomski R.) 25
 Skangiel-Kramska J. — (patrz Oderfeld-Nowak B., Potempska A., Skangiel-Kramska J.)
 Stawiński J. — Zastosowanie syntetycznych fragmentów DNA w biologii molekularnej 45

S

- Szyfter K. — Sprawozdanie z FEBS Advanced Course No. 81 — n.t. Control and Processing in the Biosynthesis of Macromolecules, Spetses (Grecja), 1981 156

W

- Wałajtys-Rode E. — Regulacja kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej w tkankach zwierzęcych 279
 Więckowski St. — (patrz Włoch E., Więckowski St.) 331
 Włoch E., Więckowski St. — Karotenoidy aparatu fotosyntetycznego 331
 Włodarski K. — Recenzja książki — Das Stabilitätsverhalten von Osteosynthesen mit äusserer Knochenfixation und Kompression. Biomechanische Modellversuche und tierexperimentelle Untersuchungen. G. Mayer. VEB Georg Thieme, Leipzig, 1981
 Wojtczak L. — (patrz M. J. Nałęcz, L. Wojtczak) 191
 Wojtczak L. — Recenzja książki — Bioenergetics — An Introduction to the chemiosmotic Theory. David D. Nicholls, Academic Press, London—New York, 1982 377
 Wojtczak L. — Recenzja książki — Mitochondrialer Elektronentransport und oxidative Phosphorylierung. Rolf Dargel. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1981 377
 Zarębska Z. — Sprawozdanie z Konferencji n.t. immunologicznych metod wykrywania antygenów jądrowych istotnych w procesach rakotwórczych i chemioterapii (Anglia), 1982 504
 Zielińska Z. — Recenzja książki — Cellular Immunology — selected readings and critical commentary. Wyd. L. Vicky Sato i Malcolm L. Gefter. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, 1981 374

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or introductory paragraph.

Main body of faint, illegible text, appearing to be several paragraphs of a document.

SPIS TREŚCI

Prof. dr Józef Heller — (1896—1982)	386
Wspomnienie o Profesorze Józefie Hellerze	387

Nowe w biochemii:

B. Grzelakowska-Sztabert — Kokancerogen jako czynnik zwiększającą częstotliwość mutacji odpowiedzialnej za oporność komórek na antyfoliany	391
J. Barciszewski — Transferowe kwasy rybonukleinowe. Właściwości i struktura	395

Artykuły monograficzne:

J. Kwiatkowska — Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy	401
G. Adler — Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cykazy adenylowej	413
H. Krotkiewski — Struktura łańcuchów cukrowych glikoprotein i metody jej badania	433
Z. Krawczyk — Oddziaływanie bakteryjnej polimerazy RNA z regionem promotora	465
S. Gröbner — Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej	487

Sprawozdania:

III Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Woudschoten, Holandia (B. Czartoryska)	503
Konferencja n. t. immunologicznych metod wykrywania antygenów jądrowych istotnych w procesach rakotwórczych i chemioterapii (Anglia), (Z. Zarębska)	504

Recenzje:

Das peptidgerge Neuron	507
„Natural Sulfur Compounds”. Novel Biochemical and Structural Aspects	508
Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications	510
Entstehung und molekulare Evolution des Lebens	511
Die Zelle — Atlas der Ultrastruktur	515

Komunikaty:

III Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki (Tokio)	516
Spis treści — Tom 28, 1982	517
Indeks autorów — Tom 28, 1982	519

POSTĘPY BIOCHEMII

December 1982

ARTICLES IN POLISH

Volume 28

Number 4

Prof. Dr Józef Heller — (1896—1982) — Obituary note	386
In memory of Professor Józef Heller	387

News in biochemistry:

B. Grzelakowska-Sztabert — Cocarcinogen as a factor stimulating frequency of mutation responsible for cell resistance to antifolates (Nencki Institute of Experimental Biology, Warszawa)	391
J. Barciszewski — Transfer ribonucleic acids. The properties and structure (Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Acad. Sci., Poznań)	395

Articles:

J. Kwiatkowska — Fructose-2,6-bisphosphate, a novel Effector of Glucose Metabolism (Institute of Biochemistry and Biophysics, Medical School, Wrocław)	401
G. Adler — The Function of Nucleotide binding Protein in hormonal Regulation of Adenylate Cyclase (Dept. Biochem., Medical Center of Postgraduate Education, Warszawa)	413
H. Krotkiewski — Structure of Sugar Chains of Glycoproteins and Methods for its Investigation (Institute of Immunology and Exp. Therapy, Pol. Acad. Sci., Wrocław)	433
Z. Krawczyk — Interaction of bacterial RNA Polymerase with the Promoter Region (Dept. of Tumor Biology, Institute of Oncology, Gliwice)	465
S. Gröbner — The Properties and Function of High Mobility Group Proteins (Dept. of Tumor Biology, Institute of Oncology, Gliwice)	487
Meetings reports	505
Book reviews	507
Contents of the Volume 28 (1982)	517
Index of the Authors in Vol. 28 (1982)	518

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 nie uporządkowane 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) i 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 tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki ujmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

SPIS TREŚCI

Prof. dr Józef Heller — (1896—1982)	386
Wspomnienie o Profesorze Józefie Hellerze	387
Nowe w biochemii:	
B. Grzelakowska-Sztabert — Kokancerogen jako czynnik zwiększający częstotliwość mutacji odpowiedzialnej za oporność komórek na antyfoliany	391
J. Barciszewski — Transferowe kwasy rybonukleinowe. Właściwości i struktura	395
Artykuły monograficzne:	
J. Kwiatkowska — Fruktozo-2,6-bisfosforan, nowy efektor przemiany glukozy	401
G. Adler — Udział białek wiążących nukleotydy guanylowe w hormonalnej regulacji cykazy adenylowej	413
H. Krotkiewski — Struktura łańcuchów cukrowych glikoprotein i metody jej badania	433
Z. Krawczyk — Oddziaływanie bakteryjnej polimerazy RNA z regionem promotora	465
S. Gröbner — Właściwości i funkcja białek niehistonowych o wysokiej ruchliwości elektroforetycznej	487
Sprawozdania:	
III Konferencja Europejskiej Grupy Studiów nad Chorobami Lizosomalnymi, Woudschoten, Holandia (B. Czartoryska)	503
Konferencja n. t. immunologicznych metod wykrywania antygenów jądrowych istotnych w procesach raktwórczych i chemioterapii (Anglia), (Z. Zarębska)	504
Recenzje:	
Das peptiderge Neuron	507
„Natural Sulfur Compounds”. Novel Biochemical and Structural Aspects	508
Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology, and Medical Applications	510
Entstehung und molekulare Evolution des Lebens	511
Die Zelle — Atlas der Ultrastruktur	515
Komunikaty:	
III Międzynarodowy Kongres Biologii Komórki (Tokio)	516
Spis treści — Tom 28, 1982	517
Indeks autorów — Tom 28, 1982	519