

*stb* POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE *Stulecie*

# Postępy Biochemii

POSTBAH 32 (4)  
(1-240) (1986)

1986

tom 32 nr 4  
PL ISSN 0032-5422



PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy, oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny w sposób syntetyczny omawiać wybrany temat na podstawie możliwie pełnego piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu na podstawie piśmiennictwa z ostatnich dwóch lat. Objętość takich artykułów nie powinna przekraczać 20 stron maszynopisu (nie licząc ilustracji i piśmiennictwa). Kwartalnik publikuje także artykuły typu *minireviews*, do 10 stron maszynopisu, z dziedziny zainteresowań autora, opracowane na podstawie najnowszego piśmiennictwa, wystarczającego dla zilustrowania problemu. Ponadto kwartalnik publikuje krótkie noty, do 5 stron maszynopisu, informujące o nowych interesujących osiągnięciach biochemii i nauk pokrewnych, oraz noty przybliżające historię badań w zakresie różnych dziedzin biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innych czasopismach, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska: poprawki wynikające z błędów drukarni nanosimy ołówkiem; niezbędne zmiany autorskie nanosimy niebieskim atramentem. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

**Układ maszynopisu:** strona okładowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakład(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencje, 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 informować rzeczowo winny o przedstawionych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1. Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku, np. kwas glutaminowy (I).

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 32 ZESZYT 4

1986

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 32 (4)  
393-488 (1986)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca przewodniczącego: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

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

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

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

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

*Instytut Biologii Doświadczalnej PAN*  
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

## SEKRETARZ REDAKCJI

J. Tepińska

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

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1986

Nakład 1730 (1637+93)	Oddano do składania 26.05.1986 r.
Ark. wyd. 7,75, ark. dru. 6,0	Podpisano do druku w styczniu 1987 r.
Papier offs. kl. III, 80 g 70×100	Druk ukończono w lutym 1987 r.
Zam. 2529/86	Cena zł 140,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

<http://rcin.org.pl>

## Z HISTORII BIOCHEMII

HANNA WEHR \*

### Nagroda Nobla w roku 1985 za osiągnięcia z dziedziny Fizjologii lub Medycyny

#### The Nobel Prize for Physiology or Medicine 1985

14 października 1985 roku Komisja Nagród Nobla w Sztokholmie przyznała nagrodę dwu amerykańskim lekarzom-biochemikom z Dallas M. S. Brownowi i J. L. Goldsteinowi za ich odkrycia dotyczące regulacji metabolizmu cholesterolu. W uzasadnieniu określono wyniki badań laureatów jako rewolucjonizujące wiedzę w tej dziedzinie i stwarzające nowe podstawy leczenia i zapobiegania miażdżycy naczyń krwionośnych.

Oprócz wyjaśnienia wielu faktów dotyczących regulacji metabolizmu cholesterolu prace Browna i Goldsteina przyczyniły się również w znacznym stopniu do poznania ogólnego przebiegu endocytozy komórkowej różnych białek.

W 1972 roku Brown i Goldstein podjęli próby wyjaśnienia błędu metabolicznego w dziedzicznie uwarunkowanej chorobie metabolicznej — hipercholesterolemii rodzinnej. Występuje ona w lżejszej — heterozygotycznej postaci u 1 na 500 osób większości badanych populacji i w ciężkiej — homozygotycznej u 1 na milion osób. Jej cechą charakterystyczną jest wysoki poziom w osoczu głównej frakcji lipoproteinowej transportującej cholesterol — lipoprotein o niskiej gęstości (LDL). Choroba doprowadza do wczesnej miażdżycy tętnic.

Brown i Goldstein ze współpracownikami stwierdzili, że w hodowli fibroblastów skóry synteza cholesterolu zmniejsza się w odpowiedzi na dodanie LDL do pożywki. Komórki pochodzące od homozygot hipercholesterolemii rodzinnej są pozbawione tej zdolności regulacyjnej. Wkrótce potem udało im się wykazać, że przyczyną braku reakcji jest niedobór specyficznego białka błony komórkowej. Jest nim receptor o wysokim powinowactwie do głównego białka LDL — apolipoproteiny B (1). W późniejszych badaniach okazało się, że ten receptor wiąże również apolipoproteinę E (2).

W krótkim czasie po odkryciu receptora w pracowni Browna i Goldsteina wyjaśniono, że wiązane mechanizmem wysokiego powinowactwa cząsteczki LDL wnikają do komórek i są rozkładane w lizosomach. Powstają produkty degradacji białka LDL i uwalnia się cholesterol, który wywiera trzy ważne efekty metaboliczne: hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA — enzymu decydującego o szybkości syntezy cholesterolu, aktywuje enzym katalizujący estryfikację cholesterolu

\* Doc. dr hab. Zakład Genetyki, Instytut Psychoneurologiczny, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: LDL — lipoproteiny o niskiej gęstości, reduktaza HMG-CoA — reduktaza  $\beta$ -hydroksy- $\beta$ -metyloglurylokoenzymu A.

oraz hamuje syntezę receptora LDL przez co zmniejsza się ilość tych receptorów w błonie komórkowej (3).

W taki sposób obecność receptora warunkuje równowagę między syntezą cholesterolu w komórce a jego dostarczaniem z zewnątrz, z krwioobiegu. Nadmiar cholesterolu odkładany jest w postaci estrów. Przy niedoborze receptora, jak to ma miejsce w hipercholesterolemii rodzinnej, ten mechanizm regulacyjny zawodzi.

Okazało się, że zjawiska wykryte w fibroblastach występują z niewielkimi różnicami w wielu komórkach ustroju. Ważną ilościowo rolę w katabolizmie LDL odgrywa wątroba (4). Szczególne znaczenie wątrobowego receptora LDL poznane zostało w pracach wykorzystujących zwierzęcy model hipercholesterolemii rodzinnej, a mianowicie wyhodowane przez badaczy japońskich króliki WHHL (ang. *Watanabe heritable hyperlipemic rabbit*). Stwierdzono, że przy niedoborze receptora zahamowany jest nie tylko katabolizm LDL. Zmniejsza się również usuwanie, pobieranych normalnie z dużą szybkością przez komórki wątroby, lżejszych lipoprotein — prekursorów LDL. Pozostają one dłużej w krwioobiegu i więcej ich zamienia się w LDL. Szybsze powstawanie i wolniejsze usuwanie LDL prowadzą do znacznego wzrostu ich poziomu w osoczu.

Niedobór receptora utrudnia wejście zawartego w lipoproteinach cholesterolu do komórek, nie wywiera on działania hamującego na HMG-CoA reduktazę i syntezę cholesterolu w komórkach wzrasta.

Wiązanie LDL oraz dalsze ich losy w komórce są bardzo podobne do mechanizmów, przy pomocy których wnikają do komórek inne związki wielkocząsteczkowe (np. asjaloglikoproteiny, insulina, enzymy lizosomalne i wiele innych). Reakcja LDL z receptorami okazała się dogodnym modelem umożliwiającym śledzenie tych zjawisk. Połączenie LDL z ferrytyną pozwoliło zaobserwować w mikroskopie elektronowym, że receptory występują w wyspecjalizowanych miejscach błony komórkowej, tak zwanych okrytych zagłębieniach (ang. *coated pits*) (6). Zagłębienia te zawierają białko klatrynę (ang. *clathrin*). Receptor z ligandem wędruje do wnętrza komórki w tworzących się z wyżej wspomnianych zagłębień pęcherzykach. Liczne pęcherzyki łączą się tworząc endosomy. Dzięki obniżeniu pH następuje tu dysocjacja ligandu, który wchodzi do lizosomu a uwolniony receptor wraca na powierzchnię komórki i może przenosić następne cząsteczki w powtarzających się cyklach endocytozy. Proces ten nazwano ogólnie endocytozą, w której pośredniczą receptory (ang. *receptor mediated endocytosis* — RME) a biorące w nim udział elementy komórkowe zalicza się do organeli komórkowych.

Receptor LDL został całkowicie oczyszczony w 1982 roku (7). Jest to glikoproteina o ciężarze cząsteczkowym 164 000 i punkcie izoelektrycznym pH 4,6 zawierająca dużo ujemnie naładowanych reszt węglowodanowych. Receptor syntetyzowany jest w postaci prekursora o ciężarze cząsteczkowym 120 000. Reszty węglowodanowe przyłączane są O-glikozydowo i N-glikozydowo w złożonym procesie posttranslacyjnym (8).

Uzyskanie antyreceptorowych przeciwciał monoklonalnych dało możliwość śledzenia przebiegu ich reakcji z receptorem, przyczyniło się też znacznie do postępu badań nad genem receptora (9). Użycie przeciwciał specyficznych tylko wobec receptora ludzkiego a niespecyficznych wobec receptora mysiego, oraz użycie hybryd komórkowych, pozwoliło na zlokalizowanie genu receptora na ludzkim chromosomie 19-tym. (10).

cdNA wzbogacony we fragmenty kodujące receptor uzyskano początkowo w procesie odwrotnej transkrypcji z mRNA nadnerczy wołu. Budowa animokwasowa receptora nie była jeszcze całkowicie poznana, można było jednak na podstawie częściowo znanej sekwencji zsyntetyzować krótkie odcinki nukleotydowe

służące jako sondy hybrydyzacyjne. Z „biblioteki” cDNA wołu a następnie z „biblioteki” cDNA nadnerczy płodu ludzkiego uzyskano fragmenty kodujące części receptora. Przy pomocy fuzji skonstruowano cały odcinek cDNA odpowiadający mRNA ludzkiego receptora LDL. W ten sposób stało się możliwe całkowite poznanie jego budowy (11).

Receptor zawiera pięć domen strukturalnych. Pierwsza domena od końca NH<sub>2</sub> składa się z 292 aminokwasów. Powtarzają się w niej siedmiokrotnie 40-aminokwasowe fragmenty, każdy z nich zawiera po sześć związanych dwusiarczkowo reszt cysteinowych. Można sądzić, że cecha ta warunkuje dużą trwałość receptora potrzebną mu w licznych „wędrowkach” we wnętrzu komórki. Na końcu COOH każdego 40-aminokwasowego fragmentu znajduje się skupienie reszt o dodatnim ładunku. Są to prawdopodobnie miejsca wiążące, ponieważ wiązanie apolipoprotein B i E wymaga wolnych reszt argininy i lizyny w tych białkach.

Cechą charakterystyczną drugiej, 400-to aminokwasowej domeny, jest duże podobieństwo jej fragmentów do prekursora naskórkowego czynnika wzrostu (EGF). Trzecia — zbudowana z 58 aminokwasów zawiera liczne reszty seryny i treoniny. W tych miejscach przyłączają się w procesie postranslacyjnym reszty cukrowe.

Trzy wspomniane wyżej domeny znajdują się na zewnątrz błony komórkowej. 22 hydrofobowe aminokwasy czwartej domeny przenikają błonę, stwierdzono to na podstawie doświadczeń z trawieniem proteazami. Wreszcie piąta domena to ogon cytoplazmatyczny. 80 aminokwasów od końca COOH, o prawie identycznym składzie w receptorach wielu gatunków zwierzęcych, warunkuje przyłączenie się ich do białka w wyspecjalizowanych w funkcji receptorowej miejscach błony.

Obecnie poznana została już w całości budowa genu ludzkiego receptora LDL. Zawiera on 45 tysięcy par zasad i składa się z 18 eksonów przedzielonych 17 intronami. Cechą charakterystyczną niekodującej części końca COOH są bardzo liczne sekwencje należące do tak zwanej ludzkiej rodziny Alu.

Złożona budowa receptora jak również jego skomplikowane losy w komórce powodują, że możliwość mutacji uszkadzających jego funkcjonowanie jest bardzo duża. Niektóre mutacje powodują całkowity brak syntezy receptora. Rezultatem innych są nieprawidłowości w przebiegu procesów posttranskrypcyjnych, co ma ten skutek, że receptor nie jest transportowany z aparatu Golgiego na powierzchnię komórki. W jeszcze innych transport nie jest zakłócony, ale receptor nie posiada zdolności wiązania LDL. Ciekawą grupę mutacji stanowią te, w których receptor występuje w nieprawidłowych miejscach błony komórkowej. Defekty budowy spowodowane delecjami w odcinku genu kodującego piątą domenę uniemożliwiają mu rozpoznanie zagłębień zawierających białko klatrynę. Taki receptor może wiązać LDL, ale dalsze jego funkcje są zakłócone, nie dochodzi do internalizacji LDL (12).

Poznanie mutacji dotyczących różnych domen białka receptora dopomogło w zrozumieniu poszczególnych etapów jego funkcjonowania. W chwili obecnej poznano na poziomie molekularnym mutacje u 9 rodzin z hipercholesterolemią, każda z mutacji była inna.

Oznaczenie ilości receptorów w celach diagnostycznych wykonuje się w limfocytach krwi obwodowej i w hodowlach fibroblastów skóry. Możliwe jest również badanie hodowli komórek płodowych. W 1978 roku rozpoznano homozygotyczną postać hipercholesterolemii rodzinnej w diagnozie prenatalnej. (13). Ostatnio proponuje się wykorzystanie do celów diagnostycznych analizy DNA.

W jaki sposób poznanie budowy i funkcji receptora LDL oraz mechanizmu regulacji jego syntezy wiąże się z praktycznymi zagadnieniami zapobiegania i leczenia chorób? Przy niedoborze receptora poziom LDL w osoczu jest wysoki. Wiadomo, że wpływa to niekorzystnie na ściany naczyń krwionośnych, chociaż mechanizm

tego zjawiska nie został jeszcze całkowicie wyjaśniony. Badania epidemiologiczne oraz obserwacje pacjentów z hipercholesterolemią rodzinną pokazują, że jest to jeden z głównych czynników zwiększających ryzyko miażdżycy i zawału mięśnia sercowego.

Dieta niskocholesterolowa oraz podawanie środków zmniejszających dopływ cholesterolu do wątroby (żywice wiążące cholesterol w przewodzie pokarmowym) wpływają na zmniejszenie jego zawartości w komórkach wątroby. Wpływa to na wzrost syntezy receptora LDL. Jeszcze lepiej w tym samym kierunku działają środki hamujące syntezę cholesterolu, inhibitory reduktazy HMG-CoA /14/.

Różne mutacje powodujące hipercholesterolemię rodzinną prowadzą do takich samych skutków metabolicznych. O ile jednak w większości przypadków — u heterozygot — można przez podawanie leków zwiększyć syntezę receptorów, to u homozygot jest to niemożliwe, jeżeli receptor w ogóle nie funkcjonuje. W tych sytuacjach stosowane muszą być inne sposoby zmierzające do zmniejszenia pobierania cholesterolu z przewodu pokarmowego. Zarówno przesłanki teoretyczne jak i praktyka pokazują, że również w najczęstszej w krajach rozwiniętych postaci hipercholesterolemii — a mianowicie uwarunkowanej wieloczynnikowo — zwiększenie aktywności receptora jest bardzo korzystne.

W swoich badaniach Brown i Goldstein współpracowali z bardzo wieloma ośrodkami zajmującymi się metabolizmem lipoprotein osocza i jego patologią. Fakt ten podkreślił prof. Mutt ze Sztokholmu w przemówieniu poprzedzającym wręczenie nagrody widząc w tym postępowanie godne naśladowania.

Na zakończenie można przypomnieć, że Nobel 1985 nie jest pierwszą taką nagrodą za badania nad cholesterolem. W 1928 roku Wieland i Windaus uzyskali ją za badania nad strukturą cholesterolu i kwasów żółciowych, a w 1964 roku Bloch za wyjaśnienia przebiegu syntezy cholesterolu w komórce.

## PIŚMIENICTWO

1. Brown M. S., Goldstein J. L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 788—792.
2. Innerarity T. L., Mahley R. W., (1979), *Biochemistry*, **17**, 1440—1447.
3. Brown M. S., Goldstein J. L., (1976), *Science*, **191**, 149—154.
4. Steinberg D., (1979), *Progr. Biochem. Pharmacol.*, **15**, 166—199.
5. Kita T., Brown M. S., Bilheimer D., Goldstein J. L., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 5693—5697.
6. Goldstein J. L., Anderson R. G. W., Brown M. S., (1979), *Nature*, **279**, 679—685.
7. Schneider W. J., Beisiegel V., Goldstein J. L., Brown M. S., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 2664—2673.
8. Cummings R. D., Kornfeld S., Schneider W. J., Hobgood K. K., Tollenshaug H., Brown M. S., Goldstein J. L., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 15261—15273.
9. Beisiegel V., Schneider W. J., Goldstein J. L., Anderson R. G. W., Brown M. S., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 11923—11931.
10. Francke U., Brown M. S., Goldstein J. L., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 2826—2830.
11. Yamamoto T., Davis C. G., Brown M. S., Schneider W. J., Casey M. L., Goldstein J. L., Russel D. W., (1984), *Cell*, **39**, 27—38.
12. Lehman M. A., Schneider W. J., Sudhof T. C., Brown M. S., Goldstein J. L., Russel D. W., (1985), *Science*, **227**, 140—146.



13. Brown M. S., Goldstein J. L., Vandenberghe K., Fryna J. P., Kovanen P. T., Eeckels R., van den Berghe H., Cassiman J. J., (1978), *Lancet*, **8063**, 526—529.
14. Brown M. S., Goldstein J. L., (1981), *New Engl. J. Med.*, **305**, 515—517.

Przy opracowaniu artykułu korzystałam również z materiałów Fundacji Nobla. Za udostępnienie ich bardzo dziękuję p. Janowi Nybergowi — Sekretarzowi Ambasady Szwedzkiej w Warszawie.



## ARTYKUŁY

*Pracę tę dedykuję pamięci  
mojego Mistrza i Przyjaciela  
Docenta Karela Slavika  
z Uniwersytetu Karola w Pradze.*

WOJCIECH RODE \*

### **Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych**

**Thymidylate biosynthesis: biological role and regulation  
in animal cells**

#### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Biosynteza i rola biologiczna tymidylanu
- III. Regulacja biosyntezy dUMP
- IV. Regulacja biosyntezy dTMP
  - IV-1. Właściwości i występowanie syntazy tymidylanowej
  - IV-2. Regulacja poziomu i aktywności syntazy tymidylanowej w komórce
  - IV-3. Regulacja biosyntezy dTMP na drodze „odzysku” tymidyny
- V. Uwagi końcowe

#### *Contents*

- I. Introduction
- II. Biosynthesis and biological role of thymidylate
- III. Regulation of dUMP biosynthesis
- IV. Regulation of dTMP biosynthesis
  - IV-1. Thymidylate synthase properties and appearance
  - IV-2. Regulation of thymidylate synthase level and activity in a cell
  - IV-3. Regulation of thymidine „salvage” pathway of dTMP biosynthesis
- V. Concluding remarks

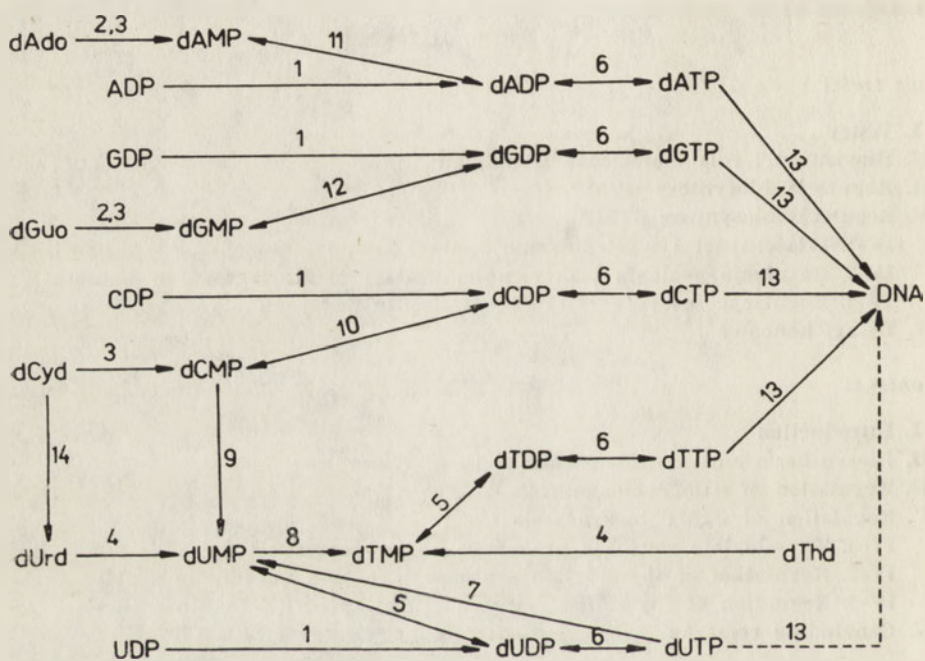
Wykaz stosowanych skrótów: dAdo, 2'-dezoksyadenozyna; dGuo, 2'-dezoksy-guanozyna; dCyd, 2'-dezoksytydyna; dUrd, 2'-dezoksyurydyna; H<sub>2</sub>PteGlu<sub>n</sub>, 7,8-dihydropteroilomono- lub oligoglutaminian; H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>, 5,6,7,8-tetrahydropteroilomono- lub oligoglutaminian; 5-CHO-, 10-CHO-, 5,10-CH-, 5,10-CH<sub>2</sub>- i 5-CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>PteGlu<sub>n</sub>, odpowiednio 5-formylo-, 10-formylo-, 5,10-metylideno-, 5,10-metyleno- i 5-metylo-tetrahydropteroilomono- lub oligoglutaminian.

### **I. Wstęp**

Wierność replikacji DNA wydaje się być uzależniona od tego, czy pule poszczególnych dezoksynukleozydotrójfosforanów, będących substratami

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

polimerazy DNA (Ryc. 1, reakcja 13), pozostają względem siebie w stanie równowagi optymalnym dla danej komórki. Poważne zmiany genotypowe i fenotypowe, zachodzące w następstwie doświadczalnie wprowadzonych zakłóceń proporcji w zakresie „podaży” poszczególnych prekursorów DNA *in vivo*, wskazują, że procesami docelowymi dla indukcji zmian genetycznych mogą być nie tylko reakcje enzymatyczne odpowiedzialne za replikację DNA, ale także reakcje związane z biosyntezą jego prekursorów (1). W warunkach fizjologicznych biosynteza substratów polimerazy DNA jest w komórce najprawdopodobniej precyzyjnie regulowana, w sposób zabezpieczający takie pule tych substratów, które gwarantują możliwie niską częstotliwość zmian genetycznych (1).



**Ryc. 1.** Biosynteza prekursorów DNA w komórkach zwierzęcych (piśmiennictwo: 2—22).

Enzymy katalizujące poszczególne reakcje: 1 — reduktaza rybonukleotydu (EC 1.17.4.1), 2 — kinaza dezoksyrybonukleotydów purynowych (kinaza dezoksyguanozynowa), 3 — kinaza dezoksytydynowa (EC 2.7.1.74), 4 — kinaza tymidynowa (EC 2.7.1.75), 5 — kinaza tymidylanowa (EC 2.7.4.9), 6 — kinaza nukleozydodwufosforanów (EC 2.7.4.6), 7 — pirofosfataza dezoksyurydynotrójfosforanowa (dUTPaza) (EC 3.6.1.23), 8 — syntaza tymidylanowa (EC 2.1.1.45), 9 — dezaminaza dezoksytydynowa (EC 3.5.4.12), 10 — kinaza monofosforanów nukleozydów pirymidynowych (EC 2.7.4.14), 11 — kinaza dezoksyadenylanowa, 12 — kinaza dezoksyguanozylanowa, 13 — polimeraza DNA (EC 2.7.7.7), 14 — dezaminaza cytydynowa (EC 3.5.4.5).

Droga metaboliczna, odpowiedzialna za biosyntezę dTTP, jest dłuższa i bardziej rozgałęziona niż ma to miejsce w przypadku pozostałych prekursorów (Ryc. 1). Poznanie mechanizmu regulacji tej drogi ma duże

znaczenie praktyczne, ponieważ jej kluczowy enzym, syntaza tymidylanowa (Ryc. 1, reakcja 8), jest od dawna enzymem docelowym dla cytotatyków stosowanych w chemioterapii chorób nowotworowych oraz wirusowych (23, 24).

Praca ta jest próbą przeglądu stanu wiedzy na temat regulacji biosyntezy tymidylanu w komórkach zwierzęcych.

## II. Biosynteza i rola biologiczna tymidylanu

Tymidylan zajmuje unikalną pozycję wśród prekursorów DNA. Jedynie ten dezoksynukleotyd powstaje w wyniku modyfikacji zasady azotowej zachodzącej dopiero po redukcji reszty cukrowej (Ryc. 1). Za modyfikację tę, polegającą na metylacji pozycji 5 pierścienia pirymidynowego dezoksyurydylanu, odpowiedzialny jest enzym, syntaza tymidylanowa \* (C-metylotransferaza (-), L-N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolian : 2'-deoksyurydino-5'-monofosforan, Ryc. 1, reakcja 8) (25—27). Jedynym opisanym dotychczas przypadkiem innej drogi biosyntezy dTMP *de novo*, aktywnej prawdopodobnie tylko w bakteriach *Xanthomonas oryzae* zainfekowanych bakteriofagiem Xp12, jest dezaminacja 5-metylo-dCMP (28), powstałego w wyniku metylacji dCMP (DNA faga Xp12 zawiera 5-metylocytozynę zamiast cytozyny) przy udziale metylotransferazy dezoksycytydylanowej (29). Metylacji dCMP, podobnie jak metylacji dUMP przez syntazę tymidylanową, towarzyszy przekształcenie metylenotetrahydrofolianu w dihydrofolian oraz uwolnienie protonu z pozycji 5 pierścienia pirymidynowego (30; por. 27).

Tymidylan może być także syntetyzowany w wyniku fosforylacji tymidyny. Reakcję tę katalizuje powszechnie występująca kinaza tymidynowa (5'-fosfotransferaza ATP : tymidyna; Ryc. 1, reakcja 4), która komórkom zwierzęcym pozwala także odzyskiwać tymidynę pochodzącą z hydrolizy DNA martwych komórek (31—33).

Narzuca się pytanie, dlaczego tymidylan a nie dezoksyurydylan jest niemal powszechnie składnikiem DNA (27)? Pytanie to jest tym bardziej istotne, że dUTP nie tylko jest w komórkach syntetyzowany (2), ale także jest *in vitro* dobrym substratem prokariotycznych (10) i eukariotycznych (11, 34—36) polimeraz DNA. W warunkach fizjologicznych obecności dUMP w DNA zapobiegają: 1) hydroliza dUPT do dUMP z uwolnieniem pirofosforanu przez dUTPazę (Ryc. 1, reakcja 7) (12—14, 36—38) oraz 2) usuwanie włączonego do DNA dUMP na drodze „reperacji poprzez wycięcie zasady”, inicjowanej działaniem glikozylazy uracyl-DNA (34—36,

\* Nazwa zalecana; patrz „Enzyme Nomenclature Recommendations” (1978) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, str. 142, Academic Press, Inc., 1979.

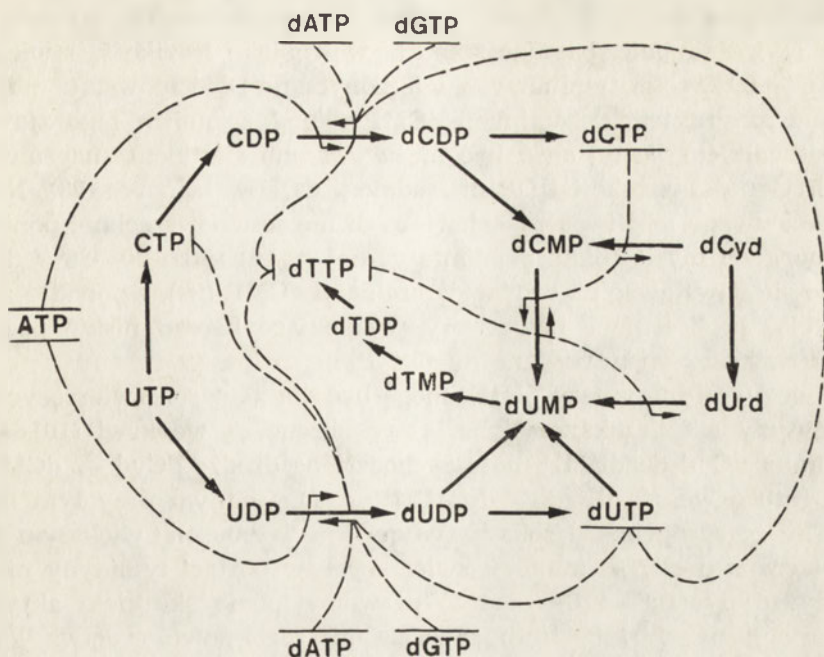
39—41). Czy więc DNA zawierający w swej strukturze dTMP ma jakąś przewagę nad DNA zawierającym dUMP?

Porównanie właściwości fizykochemicznych syntetycznych rybo- i dezoksyrybopolinukleotydów zawierających uracyl lub 5-metylouracyl (tyminę) pokazało wyraźny wpływ podstawnika 5-metylowego, polegający na stabilizacji helikalnych struktur polinukleotydowych, a wyrażający się podwyższeniem temperatury topnienia (42—48). Podobną zależność zaobserwowano porównując naturalny DNA faga PBS2, zawierający wyłącznie uracyl, z odpowiadającym mu DNA zawierającym tyminę zamiast uracylu (49). Wydaje się więc, że większa stabilność DNA zawierającego dTMP zamiast dUMP stanowiła o przewadze ewolucyjnej. Dodatkowo korzystna jest prawdopodobnie nieobecność dUMP w kodzie genetycznym. Dzięki funkcjonowaniu układu enzymatycznego warunkującego usuwanie uracylu z DNA (patrz wyżej), usuwane są błędy w zapisie genetycznym spowodowane nieenzymatyczną dezaminacją cytozyny do uracylu, mogącą zachodzić w cząsteczce DNA (40, 50, 51), a więc zmniejsza się prawdopodobieństwo występowania błędów przy replikacji. Taki mechanizm reperujący nie mógłby działać, gdyby dTMP nie zastąpił dUMP w materiale genetycznym.

### III. Regulacja biosyntezy dUMP

W komórkach zwierzęcych dUMP może powstawać *de novo*, w wyniku przemian UDP oraz CDP, lub na drodze „odzysku” dCyd oraz dUrd (Ryc. 1). Zarówno redukcję obydwóch nukleotydów pirymidynowych (Ryc. 1, reakcja 1), jak i dezaminację dCMP (Ryc. 1, reakcja 9) katalizują enzymy regulatorowe, reduktaza rybonukleotydowa (52, 53) i dezaminaza dezoksycytydylanowa (54—64). Rycina 2 ilustruje poznane mechanizmy regulacji tych enzymów za pośrednictwem efektorów allosterycznych. Redukcja rybonukleotydów pirymidynowych podlega aktywacji przez ATP (52, 65—68) oraz hamowaniu przez dTTP i dUTP (52, 66, 69), dATP i dGTP (52, 66). Ponadto CTP (lub jego metabolit) hamuje redukcję UDP (17). Dezaminacja dCMP podlega aktywacji przez dCTP oraz hamowaniu przez dTTP (54—64). dTTP jest nie tylko allosterycznym inhibitorem obydwóch omawianych enzymów, ale także korepresorem reduktazy rybonukleotydowej (70).

Poziomy reduktazy rybonukleotydowej (71, 72) i dezaminazy dezoksycytydylanowej (57, 72—82) w komórkach zwierzęcych pozostają w ścisłym związku z aktywnością proliferacyjną, przy czym wysokie aktywności tych enzymów występują w komórkach szybko rosnących. Zaobserwowano też wzrost aktywności reduktazy rybonukleotydowej (83—87) oraz dezaminazy dezoksycytydylanowej (88, 89) w fazie S cyklu komórkowego.



Ryc. 2. Regulacja biosyntezy dUMP w komórkach zwierzęcych (piśmiennictwo: 17, 52, 53, 59, 61—63, 66—68, 98, 126).

Linie przerywane zakończone strzałkami o zwrotach zgodnych lub przeciwnych ze zwrotem strzałki symbolizującej reakcję oznaczają odpowiednio aktywację lub hamowanie.

Przekształcenie dUDP do dUMP może następować na drodze  $dUDP \xrightarrow{5} dUMP$  lub  $dUDP \xrightarrow{6} dUTP \xrightarrow{7} dUMP$  (Ryc. 1). Ta druga droga wydaje się być bardziej prawdopodobną ze względu na obecność w komórkach zwierzęcych bardzo aktywnej i wykazującej niską swoistość substratową kinazy nukleozyddwufosforanów (90, 91) oraz swoistej dUTPazy, której aktywność, skorelowana z aktywnością biosyntezy DNA w komórce, jest wysoka w komórkach proliferujących, osiągając maksimum w fazie S cyklu komórkowego (12, 92—96).

Interesującą i nie do końca wyjaśnioną rolę pełni w regulacji biosyntezy dUMP dezaminaza dezoksycytydylanowa. Enzym ten umożliwia wykorzystanie nukleotyddwufosforanów dezoksycytydynowych w biosyntezie tymidylanu. Wprawdzie wcześniej uważano redukcję UDP do dUDP za główne źródło komórkowego dUMP syntetyzowanego *de novo* (97), ale w ciągu ostatnich lat ukazały się dwie prace sugerujące, że w komórce ssaka, pod nieobecność egzogennych dezoksynukleotyddwufosforanów pirymidynowych, znaczna większość dUMP pochodzi z dezaminacji dCMP (17, 98). W warunkach braku aktywności dezaminazy dezoksycytydylanowej, w wyselekcjonowanej podlinii fibroblastów chomika chińskiego, poziom dTTP (powstającego w komórkach jedynie na drodze redukcji UDP) był dwukrotnie niższy od poziomu w linii wyjściowej. Brak dezaminazy dezoksy-

cytydylanowej wiązał się także z pewnym zahamowaniem wzrostu komórek (17). Podobnie, badając komórki wątrobiaka Novikoffa stwierdzono, że 64—80% reszt tyminowych, włączonych do DNA, powstaje z dUMP będącego produktem dezaminacji dCMP (98). Mechanizm tego zjawiska nie jest całkiem jasny, choć być może jest ono skutkiem znacznie niższej aktywności redukcji UDP niż redukcji CDP w komórce (98). Należy brać pod uwagę możliwość, iż zjawisko to nie jest powszechne, ponieważ w komórkach mysiej białaczki limfatycznej (S-49) tylko 20—30% dUMP wydaje się powstawać na drodze dezaminacji dCMP (99), a ponadto znane są szybko proliferujące nowotwory wykazujące bardzo niskie poziomy dezaminazy dezoksycytydylanowej (82, 100).

Substratami biosyntezy dUMP mogą być dla komórek zwierzęcych dezoksycytydyna i dezoksurydyna, które obecne są we krwi (101—107). Przemiana dCyd do dUMP może zachodzić na drodze  $dCyd \xrightarrow{3} dCMP \xrightarrow{2} dUMP$  lub  $dCyd \xrightarrow{14} dUrd \xrightarrow{4} dUMP$  (Ryc. 1). Godnym przy tym uwagi jest fakt, że egzogenna dezoksycytydyna jest w znacznie większym stopniu włączana do DNA komórek zwierzęcych w postaci tymidyny niż dezoksycytydyny (108—110). Jest to prawdopodobnie skutkiem aktywnej dezaminacji dCyd (108) i/lub znacznie niższego powinowactwa kinazy monofosforanów nukleozydów pirymidynowych (Ryc. 1, reakcja 10) w stosunku do dCMP niż do CMP (110—114), pozwalającego na szybszą dezaminację dCMP niż fosforylację.

W przypadku obydwu dróg biosyntezy dUMP z dCyd (oraz w przypadku „odzysku” dUrd) regulacji podlegają reakcje katalizowane przez odpowiednie kinazy (Ryc. 2). Kinaza dezoksycytydynowa jest hamowana przez dCTP (59, 115, 116), a kinaza tymidynowa, fosforylująca dUrd (19) podlega hamowaniu przez dTTP (59). O ile natomiast dezaminacja dCMP zależy od poziomu dTTP i dCTP w komórce (Ryc. 2, patrz wyżej), o tyle dezaminacja dCyd wydaje się nie podlegać takiej regulacji (21, 108).

W związku z regulacją „odzysku” dezoksynukleotydów w komórkach zwierzęcych, interesującą wydaje się niejasna dotychczas rola słabo poznanej grupy enzymów, fosfotransferaz nukleozydowych, które różnią się od wspomnianych wyżej kinaz niską swoistością w stosunku do donora i akceptora grupy fosforanowej (117—124). Fosforylacja tymidyny przy udziale tych enzymów w tkankach ptaków nie jest hamowana przez dTTP (21, 125), inhibitor kinazy tymidynowej, natomiast jest hamowana przez ATP (125), donor fosforanu w reakcji wspomnianej kinazy.

#### IV. Regulacja biosyntezy dTMP

##### IV-1. Właściwości i występowanie syntazy tymidyylanowej

Syntaza tymidyylanowa katalizuje metylację pozycji 5 dUMP. Reakcja ta polega na przeniesieniu i równoczesnej redukcji grupy hydroksyme-



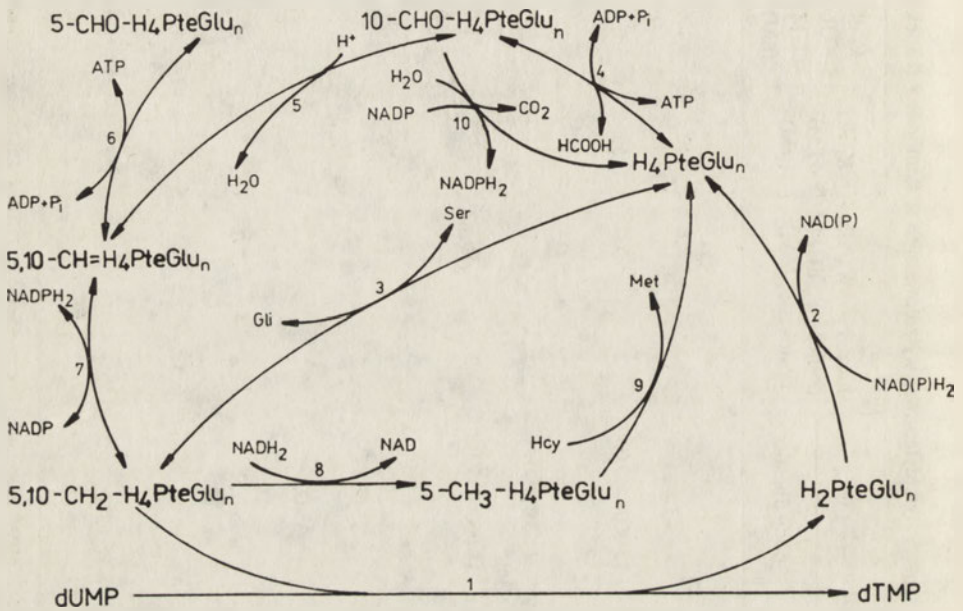
Tabela 1

Właściwości wysoko oczyszczonych preparatów syntazy tymidylanowej wyizolowanych z komórek i tkanek zwierzęcych

Źródło enzymu	Masa cząsteczkowa		Liczba podjednostek	$K_m$ dla dUMP ( $\mu$ M)	$K_i$ dla dTMP ( $\mu$ M)	$K_i$ dla 5-F-dUMP (nM)	$K_d$ dla 5-F-dUMP (nM)	Aktywność cząsteczkowa w 37°C ( $\text{min}^{-1}$ )	Piśmiennictwo
	enzymu	podjednostki							
KURCZĘ — zarodki	58 000			7,5	140				127
CIELE — grasicca	77 500	35 000—40 000	2	9,0	59			27	128, 129
MYSZ — wątroba noworodków		35 000	2 <sup>a</sup>						130
— komórki L1210	75 000	38 500	2	2,0	7,3			29	131, 132
— komórki raka wąsiekowego Ehrlicha			2	1,5; 6,3	9,6	1,9		31—33	132—136
— komórki raka wąsiekowego Ehrlicha odporne na 5-F-dUrd	58 300	34 200	2	1,6	26	19		91	135
— mięsak 180	70 000	35 000	2					4,1	129
— chłodniakomięsak Gardnera	70 000	35 000	2					2,5	129
CZŁOWIEK — komórki HeLa		36 000	2 <sup>a</sup>	2,0				23 <sup>b</sup>	137
— komórki białaczki szpikowej	76 000			1,8	13	1,7		12 <sup>c</sup>	138
— komórki CCRF-CEM białaczki limfoidalnej	66 000	33 000	2	2,8			0,04	250	139, 140
— komórki CCRF-CEM odporne na 5-F dUrd		33 000		0,9			1,0	450	141

a Na podstawie obecności dwóch miejsc wiązania 5-F-dUMP. b Przyjmując masę cząsteczkową 72000. c Zakładając obecność dwóch miejsc wiązania 5-F-dUMP na cząsteczce.

tylowej pochodzącej z (-),L-N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydropteroliglutaminianu (metylenotetrahydrofolianu) lub (-),L-N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydropterooligoglutaminianu (25—27, 142, 143) (Ryc. 3). Mechanizm reakcji, przebiegającej z udziałem metylenotetrahydrofolianu, ma charakter uporządkowany sekwencyjny, przy czym dUMP przyłącza się do enzymu przed metylenotetrahydrofolianem, a dihydrofolian opuszcza centralny kompleks przed dTMP (127, 135, 138, 140). Ostatnio opublikowane wyniki wskazują, że kolejność przyłączania substratów może być odwrotna, gdy w reakcji bierze udział metylenotetrahydropterooligoglutaminian (144).



**Ryc. 3.** Współzależność biosyntezy tymidylanu i przemian kofaktorów folianowych (piśmiennictwo: 145—147).

Enzymy katalizujące poszczególne reakcje: 1 — syntaza tymidylanowa (EC 2.1.1.45), 2 — reduktaza dihydrofolianowa (EC 1.5.1.3), 3 — hydroksymetylotransferaza serynowa (EC 2.1.2.1), 4 — syntetaza N<sup>10</sup>-formylotetrahydrofolianowa (EC 6.3.4.3), 5 — cyklohydrolaza N<sup>5,10</sup>-metylidnotetrahydrofolianowa (EC 3.5.4.9), 6 — cyklodehidraza N<sup>5</sup>-formylotetrahydrofolianowa (EC 6.3.3.2), 7 — dehydrogenaza N<sup>5,10</sup>-metylidnotetrahydrofolianowa (EC 1.5.1.5), 8 — reduktaza N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolianowa (EC 1.1.1.69), 9 — syntaza metioninowa (EC 2.1.1.13), 10 — dehydrogenaza N<sup>10</sup>-formylotetrahydrofolianowa (EC 1.5.1.6). 1 ≤ n ≤ 12.

Właściwości opisanych dotychczas preparatów syntazy tymidylanowej, wyizolowanych z komórek lub tkanek zwierzęcych, wskazują, że enzym ten jest dimerem złożonym z jednakowych podjednostek (Tabela 1). Badania elektroforetyczne pozwoliły zaobserwować obecność dwóch miejsc wiązania analogu substratu, 5-F-dUMP, na cząsteczce enzymu. Następstwem takiej struktury jest powstawanie dwóch typów kompleksów enzym — metylenotetrahydrofolian — 5-F-dUMP różniących się ruchliwo-

ścią elektroforetyczną (131, 135—137). Charakter hamowania syntazy tymidylanowej przez 5-F-dUMP, współzawodniczy w stosunku do dUMP (127, 135, 140, 141), wskazuje, że miejsca wiążące 5-F-dUMP odpowiadają miejscom wiążącym dUMP. Zależność prędkości reakcji katalizowanej przez enzym z komórek raka wysiękowego Ehrlicha od stężenia dUMP sugeruje, że w zakresie niskich stężeń nukleotydu występuje współdziałanie między miejscami wiążącymi ten substrat. Współdziałanie to wyraża się wykresem Hilla o nachyleniu  $n > 1$  (148). Kinytyka hamowania enzymu z komórek raka wysiękowego Ehrlicha oraz L1210 przez analogi dTMP, 5-etylo-dUMP i 5-propylo-dUMP (132), sugeruje także występowanie współdziałania miejsc wiążących dUMP na cząsteczce ssaczej syntazy tymidylanowej.

Rozważając właściwości syntazy tymidylanowej, mogące mieć znaczenie dla regulacji enzymu, warto wspomnieć o wrażliwości w stosunku do nukleotydów adeninowych lub innych kompleksów z jonami magnezowymi, opisanej w przypadku preparatów enzymu wyizolowanych z grasicy cielęcej (128) oraz z różnych nowotworów mysich (136, 149). Dalsze badania powinny pozwolić na ocenę fizjologicznej roli tego zjawiska.

Zwraca uwagę występowanie w komórkach nowotworowych o tym samym pochodzeniu gatunkowym form syntazy tymidylanowej bardzo różniących się takimi właściwościami jak aktywność cząsteczkowa, wrażliwość na hamowanie analogiem dUMP, 5-F-dUMP, czy powinowactwo do dUMP (Tabela 1). Następstwem tego zjawiska może być znaczne zróżnicowanie aktywności właściwej syntazy tymidylanowej, a więc prawdopodobnie także potencjalnych możliwości komórek w zakresie biosyntezy tymidylanu *de novo*, co jednak nie wydaje się być powiązane z częstotliwością podziałów komórkowych. Przykładem może być oporna na 5-F-dUrd linia komórek raka wysiękowego Ehrlicha, którą cechował, w porównaniu z linią macierzystą, podobny okres podwojenia, pomimo siedmiokrotnie wyższej aktywności właściwej syntazy tymidylanowej (135, 150). Fakt ten jest sprzeczny z założeniem, że reakcja katalizowana przez syntazę tymidylanową mogłaby być etapem ograniczającym syntezę DNA w komórce (25). Zjawisko występowania w komórkach nowotworowych różnych form syntazy tymidylanowej ma duże znaczenie dla efektywności chemioterapii skierowanej przeciwko temu enzymowi. Wyniki porównawczych badań nad macierzystymi i opornymi na 5-F-dUrd liniami komórek nowotworowych ludzkich (CCRF-CEM) i mysich (rak wysiękowy Ehrlicha) pokazały zbieżność występującą pomiędzy wysoką aktywnością cząsteczkową syntazy tymidylanowej i obniżoną wrażliwością tego enzymu na hamowanie przez aktywną formę 5-F-dUrd, 5-F-dUMP, a opornością komórek na 5-F-dUrd (135, 141; patrz też Tabela 1).

Występowanie syntazy tymidylanowej, podobnie jak reduktazy rybonukleotydu, dezaminazy dezoksycytydylanowej i dUTPazy, związane jest z proliferacją komórek. Związek ten jest wyraźnie widoczny przy

porównaniu śladowej ilości enzymu znajdującej w normalnej wątrobie szczura ze znaczną jego aktywnością obecną zarówno w wątrobie regenerującej lub embrionalnej jak i w hepatomach szczurzych (71, 73, 74, 82, 151). Ścisłe powiązanie wysokiej aktywności syntazy tymidylanowej ze stanem aktywności proliferacyjnej lub aktywności replikacji DNA stwierdzono także w cyklu hodowlanym ssaczych komórek prawidłowych i nowotworowych (152—154), w rozwoju bezkręgowców (155—158) i kręgowców (159—163) oraz w prawidłowych i białaczkowych leukocytach (164, 165). Wysoka aktywność enzymu w niezaplodnionych jajach muszki owocowej, jedwabnika morwowego i jeżowca (156—158) oraz w gruczołach przednich jedwabnika morwowego podczas zachodzącej w jądrach komórek gruczołowych poliploidyzacji (157) wskazuje na bliższe powiązanie indukcji tego enzymu z replikacją DNA lub stanem gotowości do niej niż z podziałem komórki.

Istnieje coraz więcej danych wskazujących, że syntaza tymidylanowa jest składnikiem kompleksu multienzymatycznego, odpowiedzialnego za biosyntezę prekursorów DNA oraz za replikację (166—168). Kompleks, w którym stwierdzono także obecność reduktazy rybonukleotydomowej, kinaz: tymidynowej, tymidylanowej i nukleozydodwufosforanów, polimerazy DNA, metylazy DNA, topoizomerazy i reduktazy dihydrofolianowej (166—168), nazwano replitazą (169). Ważną właściwością replitazy jest zdolność „kanałowania” (od ang. *channelling*) odległych prekursorów DNA (takich jak rybonukleotydy, dThd, dTMP, dUMP) w kierunku do polimerazy DNA (167, 169, 170, 171). Enzymy, wchodzące w skład replitazy, wydają się asocjować tylko w jądrach komórek będących w fazie S cyklu komórkowego. W trakcie fazy G<sub>1</sub> enzymy te wydają się pozostawać w cytoplazmie, w formie niezasocjowanej (168, 169).

#### IV-2. Regulacja poziomu i aktywności syntazy tymidylanowej w komórce

Poziom syntazy tymidylanowej szybko podnosi się w komórkach wątroby pobudzonych do wzrostu w wyniku częściowej hepatoctomii (61, 73, 172). Chociaż ćwierć wieku minęło od momentu opisanego zjawiska, jego mechanizm pozostaje nadal nieznany. Wyniki badań ssaczych komórek prawidłowych hodowanych *in vitro* wskazują, że w następstwie pobudzenia wzrostu komórek (przejście z fazy G<sub>0</sub> do G<sub>1</sub> cyklu komórkowego) zachodzi szybka synteza *de novo* syntazy tymidylanowej, regulowana na poziomie transkrypcji (153, 173). Zapoczątkowanie syntezy enzymu wydaje się być powiązane czasowo z inicjacją syntezy komórkowego DNA (faza S cyklu komórkowego), ale obecność inhibitorów syntezy DNA w środowisku hodowlanym komórek pobudzonych do wzrostu nie wpływa na profil zmian poziomu syntazy tymidylanowej w czasie (173). Tak więc indukcja ekspresji genu tego enzymu nie jest prawdo-

podobnie związana bezpośrednio z replikacją DNA. Syntaza tymidylanowa jest białkiem o stosunkowo długim okresie półtrwania (20—25 godz.) i stąd po zahamowaniu wzrostu komórek jej poziom obniża się powoli (173).

Warto tu wspomnieć o jedynym dotychczas komunikacie na temat wpływu obecności monobutyrylowej pochodnej cAMP w środowisku hodowlanym komórek (raka Walkera) hodowanych *in vitro*, polegającego na obniżeniu poziomu syntazy tymidylanowej. W obecności dibutyrylowej pochodnej cGMP efekt ten zanika (174). Zjawisko to jest interesujące zwłaszcza w zestawieniu z faktem, że zaobserwowano indukujący wpływ dibutyrylowej pochodnej cGMP na syntezę syntazy tymidylanowej w komórkach pierwotniaków (*Tetrahymena*) (175, 176).

W ssaczych komórkach, pozostających w fazie logarytmicznego wzrostu, poziom syntazy tymidylanowej zmienia się cyklicznie. Najniższy poziom enzymu cechuje komórki w fazie  $G_1$ , a jego podwyższenie — około dwukrotne — następuje w trakcie fazy S cyklu komórkowego (152, 177). Na tle podobnych, stosunkowo niewielkich zmian poziom enzymu w cyklu komórkowym mysich komórek białaczkowych (L1210) zaobserwowano drastyczne zmiany aktywności syntazy tymidylanowej, oznaczanej w nienaruszonych komórkach poprzez pomiar trytu uwolnionego z [5— $^3\text{H}$ ]dUrd (178, 179). Tak badana aktywność właściwa enzymu była zbliżona do zera w komórkach w fazie  $G_1$ , wzrastała szybko w fazie S, osiągając wartość o rząd wielkości wyższą od aktywności oznaczonej równolegle w wyciągach z takich samych komórek, po czym szybko malała, zbliżając się w trakcie fazy  $G_1+M$  cyklu komórkowego znów do zera. Przebieg tych zmian był dokładnym powtórzeniem zmian aktywności biosyntezy DNA, sugerując występowanie regulacji aktywności syntazy tymidylanowej, w wyniku której następuje ciasne jej powiązanie z aktywnością biosyntezy DNA (178, 179). Dalsze badania tego zjawiska pozwoliły stwierdzić, że powiązanie to cechuje pewna elastyczność. Hydroksymocznik, którego obecność w środowisku hodowlanym komórek hamuje biosyntezę DNA poprzez inhibicję reduktazy rybonukleotydowej (Ryc. 1, reakcja 1), hamuje także syntezę tymidylanową w nienaruszonych komórkach (ale nie w wyciągach komórkowych), przy czym ten ostatni efekt jest o kilka minut spóźniony w stosunku do inhibicji biosyntezy DNA. Przebieg zmian aktywności syntazy tymidylanowej w czasie w komórkach potraktowanych hydroksymocznikiem, sugerujący hamowanie produktem reakcji, oraz zaobserwowana silna inhibicja enzymu w nienaruszonych komórkach w wyniku dodania tymidyny do środowiska (179) przemawiają za hipotezą o regulacji syntazy tymidylanowej przez dTMP (dTDP, dTTP). Konsekwencją takiej regulacji byłoby hamowanie enzymu w warunkach nagromadzenia nukleotydów tyminy na skutek braku aktywności biosyntezy DNA lub dostępnej tymidyny, a w konsekwencji oszczędniejsza gospodarka energetyczna komórki. Bio-

rać pod uwagę stałe inhibicji syntazy tymidylanowej przez dTMP (Tabela 1), najbardziej prawdopodobny efektor enzymu, oraz bardzo niski poziom nukleotydów tyminy znajdujący w komórkach (180), osiągnięcie stężenia produktu skutecznie hamującego enzym jest prawdopodobnie możliwe tylko w warunkach kanałowania nukleotydów tyminy w kompleksie replitazy.

Podobną jak w przypadku komórek L1210 zależność aktywności syntazy tymidylanowej, oznaczanej w nienaruszonych komórkach, od fazy cyklu komórkowego, zaobserwowano w fibroblastach z zarodka chomika chińskiego (181). Ponadto stwierdzono, że w fibroblastach pochodzących z zarodka chomika chińskiego lub z napletka ludzkiego zahamowanie reakcji syntazy tymidylanowej w nienaruszonych komórkach towarzyszy zahamowaniu syntezy komórkowego DNA, powodowanemu także przez inhibitory inne niż hydroksymocznik. Stosowano przy tym (poza hydroksymocznikiem) 3-aminobenzamid i  $\beta$ -lapachon, hamujące reperację i replikację DNA w komórkach potraktowanych sulfonianem metylometanu, afidikolinę, hamującą  $\alpha$ -polimerazę DNA i nowobiocynę, hamującą topoizomerazę (182, 183). Autorzy tych badań zinterpretowali swe wyniki, zakładając występowanie allosterycznych oddziaływań syntazy tymidylanowej z innymi enzymami kompleksu replitazy, powodujących hamowanie tego enzymu skoordynowane z inhibicją reduktazy rybonukleotydowej,  $\alpha$ -polimerazy DNA lub topoizomerazy (181—183). Interpretacja ta jest oczywiście sprzeczna z wcześniej prezentowaną interpretacją tego samego zjawiska, zakładającą hamowanie syntazy tymidylanowej przez produkt reakcji (179). Konsekwencją jej musi być jednak wniosek o hamowaniu syntazy tymidylanowej jednoczesnym z hamowaniem któregoś ze wspomnianych enzymów, podczas gdy w omawianych pracach brak jest prób ustalenia współzależności czasowej tych zjawisk (181—183). Jednocześnie wyniki wcześniejszych badań nad komórkami L1210 wskazują na wyraźne opóźnienie hamowania syntazy tymidylanowej w stosunku do hamowania reduktazy rybonukleotydowej i syntezy DNA (179). Co więcej, ostatnio stwierdzono, że podobne opóźnienie hamowania syntazy tymidylanowej występuje w komórkach L1210 i ludzkich komórkach białaczkowych CCRF-CEM, w których syntezę DNA zahamowano afidikoliną lub hydroksymocznikiem i afidikoliną (184).

Aktywność syntazy tymidylanowej jest prawdopodobnie regulowana także dostępnością kofaktora. Skąpe dotychczas informacje na temat takiej regulacji wskazują na jej powiązanie z bardzo słabo poznaną rolą kofaktorowych pochodnych pteroilooligoglutaminianu w metabolizmie komórki. Przypuszcza się na przykład, że nagromadzające się oligoglutaminianowe pochodne  $N^5$ -metylotetrahydrofolianu odpowiedzialne są za uzależnienie aktywności syntazy tymidylanowej w komórce od aktywności syntazy metioninowej (Ryc. 3, reakcja 9) (185). Zbyt niska aktywność tego ostatniego enzymu prowadzi do przekształcenia kofaktorowych po-

chodnych folianowych obecnych w komórce do formy N<sup>5</sup>-metylotetrahydrofolianu (lub jego oligoglutaminianowej pochodnej) bez możliwości uwolnienia formy tetrahydrofolianowej (186). Zjawisko to, zwane „pułapką metylową”, jest następstwem praktycznej nieodwracalności w naturalnych warunkach reakcji katalizowanej przez reduktazę N<sup>5,10</sup>-metylenotetrahydrofolianową (Ryc. 3, reakcja 8). U ssaków towarzyszy ono anemii złośliwej, a doświadczalnie może być wywołane przez inhalację tlenku azotowego (N<sub>2</sub>O), inaktywującego witaminę B<sub>12</sub>, od której uzależniona jest reakcja syntazy metioninowej (186). Wydaje się przy tym, że komórka dysponuje mechanizmem utrudniającym wystąpienie zjawiska pułapki metylowej. Stwierdzono, że substraty syntazy metioninowej, N<sup>5</sup>-metylotetrahydropterooligoglutaminiany, ulegające nagromadzeniu w warunkach obniżonej aktywności tego enzymu, hamują silnie hydroksymetylotransferazę serynową (Ryc. 3, reakcja 3) (185). W konsekwencji zahamowaniu ulega synteza N<sup>5,10</sup>-metylenowej pochodnej tetrahydrofolianu i jego oligoglutaminianów, która to pochodna może być zredukowana do pochodnej N<sup>5</sup>-metylowej i „zamknięta” w pułapce metylowej. Brak ko-faktora obniża oczywiście także aktywność syntazy tymidylanowej (185).

#### IV-3. Regulacja biosyntezy dTMP na drodze „odzysku” tymidyny

Fosforylację tymidyny, występującej w surowicy krwi (102), katalizuje kinaza tymidynowa (Ryc. 1, reakcja 4). Enzym ten jest obecny powszechnie w tkankach proliferujących, a jego poziom jest najwyższy w komórkach o dużej aktywności proliferacyjnej. Występują przy tym dwa izoenzymy o różnych właściwościach molekularnych i kinetycznych, charakterystyczne dla cytozolu i mitochondriów. W cyklu komórkowym najwyższą aktywność właściwą cytozolowej kinazy tymidynowej obserwuje się w fazie S, podczas gdy aktywność enzymu mitochondrialnego nie zmienia się (33, 125).

Fosforylacja tymidyny w komórkach podlega regulacji przez dTTP (98, 102), który jest inhibitorem obydwóch izoenzymów kinazy tymidynowej. Izoenzym mitochondrialny jest hamowany także przez dCTP (125, 187—189).

#### V. Uwagi końcowe

Badania biosyntezy tymidylanu mają znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. W chemioterapii nowotworów wykorzystuje się zjawisko obumierania komórek pozbawionych możliwości syntezy tymidylanu. Zjawisko to jest prawdopodobnie wynikiem fragmentacji DNA, zachodzącej w konsekwencji wycinania z DNA dużej ilości uracylu, włączonego w warunkach zahamowanej metylacji dUMP i braku tymidyny (190—192).

Enzymami docelowymi dla stosowanych w klinice cytostatyków (5-fluorouracyl, 5-fluorodezoksyurydyna, metotreksat), hamujących biosyntezę tymidylanu, są syntaza tymidylanowa i reduktaza dihydrofolianowa (Ryc. 3, reakcje 1 i 2) (23—25, 193). Wrażliwość komórek na określony cytostatyk bywa jednak bardzo różna (194, 195) i zależy od takich czynników jak poziom (196—198) i właściwości (135, 141, 196) enzymu docelowego, poziom aktywnej formy cytostatyku w komórce (24, 199), poziom substratu enzymu docelowego w warunkach inhibicji tego enzymu analogiem substratu (24, 199, 200), czy poziom kofaktora, warunkującego inhibicję enzymu docelowego opartą na mechanizmie reakcji (24). Wszystkie te czynniki pozostają w ścisłym związku z mechanizmem regulacji biosyntezy tymidylanu w komórce. Można więc mieć nadzieję, że dokładne poznanie wszystkich elementów tego mechanizmu pozwoli znacznie poprawić skuteczność chemioterapii skierowanej przeciwko biosyntezie tymidylanu w komórce nowotworowej.

Zaakceptowano do druku 30 grudnia 1985 r.

#### PISMIENICTWO

1. Kunz B. A., (1982), *Environ. Mutagenesis*, **4**, 695—725.
2. Henderson J. F., Paterson A. R. P., (1973) w: *Nucleotide Metabolism. An Introduction.*, str. 207—243, Academic Press, New York—London.
3. Anderson E. P., (1973) w: *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 9, str. 49—96, Academic Press, Inc., New York.
4. Gower W. R., Jr., Carr M. C., Ives D. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2180—2183.
5. Barker J., Lewis R. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **658**, 111—123.
6. Green F. J., Lewis R. A., (1979), *Biochem. J.*, **183**, 547—553.
7. Meyers M. B., Kreis W., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 10—15.
8. Yamada Y., Goto H., Ogasawara N., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 265—272.
9. Chang C.-H., Brockman R. W., Bennet L. L., Jr., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 3033—3039.
10. Bessmann M. I., Lehman I. R., Adler I., Zimmermann S. B., Simms E. S., Kornberg A., (1958), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **44**, 633—640.
11. Dube D. K., Kunkel T. A., Seal G., Loeb L. A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **561**, 369—382.
12. Labow R., Maley F., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 136—142.
13. Grindey G. B., Nichol C. A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 180—183.
14. Williams M. W., Cheng Y.-C., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2897—2901.
15. Wisdom G. B., Orsi B. A., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 7P.
16. Malathi V. G., Silber R., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **238**, 377—387.
17. De Saint Vincent R. B., Déchamps M., Buttin G., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 162—167.



18. Creasey W. A., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1772—1776.
19. Hashimoto T., Arima T., Okuda H., Fuji S., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 67—73.
20. Wentworth D. F., Wolfenden R., (1978) w: *Methods in Enzymology*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 401—407, Academic Press, New York.
21. Rothman I. K., Malathi V. G., Silber R., (1978) w: *Methods in Enzymology*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 408—412, Academic Press, New York.
22. Agarwal R. P., Robison B., Parks R. E., Jr., (1978) w: *Methods in Enzymology*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 376—386, Academic Press, New York.
23. Danenberg P. V., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 73—92.
24. Heidelberger C., Danenberg P. V., Moran R. G., (1983) w: *Advances in Enzymology*, red. Meister A., str. 57—119, John Wiley and Sons, New York.
25. Blakley R. L., (1969) w: *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, str. 231—266, John Wiley and Sons, New York.
26. Friedkin M., (1973) w: *Advances in Enzymology*, red. Meister A., t. 38, str. 235—292, John Wiley and Sons, New York.
27. Rode W., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 81—93.
28. Kuo T.-T., Chow T.-Y., Lin Y.-T., (1982), *Virology*, **118**, 293—300.
29. Kuo T.-T., Tu J., (1976), *Nature (London)*, **263**, 615.
30. Feng T. Y., Tu J., Kuo T.-T., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 29—36.
31. Kornberg A., (1974) w: *DNA Synthesis*, str. 50—52, Freeman W. H. and Co., San Francisco.
32. Kornberg A., (1980) w: *DNA Replication*, str. 39—85. Freeman W. H. and Co., San Francisco.
33. Gołaszewski T., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 27—52.
34. Wist E., Unhjem O., Krokan H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **520**, 253—270.
35. Brynolf K., Eliasson R., Reichard P., (1978), *Cell*, **13**, 573—580.
36. Grafstrom R. H., Tseng B. Y., Goulian M., (1978), *Cell*, **15**, 131—140.
37. Bertani E., Häggmark A., Reichard P., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3407—3413.
38. Greenberg G. R., Somerville R. L., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 247—257.
39. Lindahl T., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3649—3653.
40. Lindahl T., (1976), *Nature*, **259**, 64—66.
41. Sekiguchi M., Hayakawa H., Makino F., Tanaka K., Okada Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 293—299.
42. Shugar D., Szer W., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 580—582.
43. Szer W., Świerkowski M., Shugar D., (1963), *Acta Biochim. Polon.*, **10**, 87—106.
44. Chamberlin M. J., (1965), *Fed. Proc.*, **24**, 1446—1457.
45. Shugar D., Świerkowski M., Fikus M., Barszcz D., (1967), w: *7th International Congress of Biochemistry, Tokyo*, t. 10, Symp. 1, str. 59—60.
46. Barszcz D., Shugar D., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 91—100.
47. Fikus M., Shugar D., (1969), *Acta Biochim. Polon.*, **16**, 55—82.
48. Vilpo J. A., Ridell J., (1983), *Nucl. Acids Res.*, **11**, 3753—3765.
49. Cassidy P., Kahan F., Alegrie A., (1965), *Fed. Proc.*, **24**, 226.
50. Lindahl T., (1979), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **22**, 135—192.

51. Follmann H., (1982), *Naturwissenschaften*, **69**, 75—81.
52. Moore E. C., Hurlbert R. B., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4802—4809.
53. Reichard P., (1972) w: *Adv. Enzyme Regul.*, red. Weber G., t. 10, str. 3—16, Pergamon Press, Oxford.
54. Scarano E., Bonaduce L., DePetrocellis B., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 3556—3561.
55. Scarano E., Geraci G., Polzella A., Campanile E., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, PC 1556—1557.
56. Scarano E., Geraci G., Rossi M., (1967), *Biochemistry*, **6**, 183—191.
57. Maley G. F., Maley F., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 2975—2980.
58. Maley G. F., Maley F., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, PC 3311—3312.
59. Maley F. Maley F. G., (1962), *Biochemistry*, **1**, 847—851.
60. Maley G. F., Maley F., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 1168—1176.
61. Maley F., Maley F. G., (1970) w: *Adv. Enzyme Regular.*, red. Weber G., t. 8, str. 55—71, Pergamon Press, Oxford.
62. Ellims P. H., Kao A. Y., Chabner B. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 6335—6340.
63. Ellims P. H., Kao A. Y., Chabner B. A., (1983), *Mol. Cell. Biochem.*, **57**, 185—190.
64. Rolton H. A., Keir H. M., (1974), *Biochem. J.*, **141**, 211—217.
65. Hopper S., (1978) w: *Methods in Enzymol.*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 237—246, Academic Press, New York.
66. Eriksson S., Thelander L., Akerman M., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2948—2952.
67. Kuzik B. A., Wright J. A., (1979), *Enzyme*, **24**, 285—293.
68. Larsson A., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 113—121.
69. Hunting D., Henderson J. F., (1981), *Can. J. Biochem.*, **59**, 830—837.
70. Elford H. L., Bonner E. L., Kerr B. H., Hanna S. D., Smulson M., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 4389—4394.
71. Elford H. L., Freese M., Passamani E., Morris H. P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5228—5233.
72. Elford H. L., (1972), w: *Adv. Enzyme Regul.*, red. Weber G., t. 10, str. 19—38, Pergamon Press, Oxford.
73. Maley F., Maley G. F., (1960), *J. Biol. Chem.*, **235**, 2968—2970.
74. Maley F., Maley G. F., (1961), *Cancer Res.*, **21**, 1421—1426.
75. Potter V. R., Pitot H. C., Ono T., Morris H. P., (1960), *Cancer Res.*, **20**, 1255—1261.
76. Scarano E., Talarico M., Bonaduce L., DePetrocellis B., (1960), *Nature*, **186**, 237—238.
77. Scarano E., Talarico M., Fiala S., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **51**, 173—175.
78. Emmelot P., Hampe J. F., Bos C. J., Reyers I. H. M., (1961), *British J. Cancer*, **15**, 138—145.
79. Meyers D. K., Hemphill C. A., Townsend C. M., (1961), *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 1043—1054.
80. Roth J. S., Sheid B., Morris H. P., (1963), *Cancer Res.*, **23**, 454—461.
81. Bernengo M. G., Pegoraro L., (1976), *Eur. J. Cancer*, **12**, 611—616.
82. Sneider T. W., Potter V. R., Morris H. P., (1969), *Cancer Res.*, **29**, 40—54.
83. Murphree S., Stubblefield E., Moore E. C., (1969), *Exp. Cell Res.*, **58**, 118—124.

84. Turner M. K., Abrams R., Lieberman I., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3725—3728.
85. Kucera R., Brown C. L., Paulus H., (1983), *J. Cell. Physiol.*, **117**, 158—168.
86. DePetrocellis B., Monroy A., (1974), *Endeavour*, **33**, 92—98.
87. Lewis W. H., Kuzik B. A., Wright J. A., (1978), *J. Cell. Physiol.*, **94**, 287—297.
88. Gelbard A. S., Kim J. H., Perez A. G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta.*, **182**, 564—566.
89. Kit S., Jorgensen G. N., (1976), *J. Cell. Physiol.*, **88**, 57—64.
90. Mourad M., Parks R. E., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 271—278.
91. Nakamura H., Sugino Y., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 4917—4922.
92. Duker N. J., Grant C. L., (1980), *Exp. Cell Res.*, **125**, 493—497.
93. Mahagaokar S., Orengo A., Rao P. N., (1980), *Exp. Cell Res.*, **125**, 87—94.
94. Hokari S., Sakagishi Y., Tsukada K., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 95—101.
95. Vilpo J. A., (1983), *Med. Biol.*, **61**, 54—58.
96. Vilpo J. A., Autio-Harminen H., (1983), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **43**, 583—590.
97. Reichard P., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **3**, 259—266.
98. Jackson R. C., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7440—7446.
99. Maybaum J., Cohen M. B., Sadee W., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 2126—2130.
100. Blocker R., Roth J. S., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 1918—1922.
101. Guri C. D., Minat H., Swingle K. F., Gole L. J., (1969), *Radiat. Res.*, **39**, 155—163.
102. Sjoström D. A., Forsdyke D. R., (1974), *Biochem. J.*, **138**, 253—262.
103. Danhauser L. L., Rustum Y. M., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 1247—1280.
104. Egan E. M., Sargent L., Rosowsky A., Kufe D. W., (1981), *Cancer Treat. Rep.*, **65**, 853—860.
105. Chan T., Lakhaura B. D., Hsu T. F., (1981), *Fed. Proc.*, **41**, 631.
106. Dudman N. P. B., Deveski W. B., Tattersall M. H. N., (1981), *Anal. Biochem.*, **115**, 428—437.
107. Eells J. T., Spector R., (1983), *Neurochem. Res.*, **8**, 1307—1320.
108. Maley G. F., Maley F., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **68**, 293—301.
109. Plagemann P. G. W., Marz R., Wohlhueter R. M., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 978—989.
110. Karle J. M., Hoerauf R. M., Cysyk R. L., (1983), *Cancer Lett.*, **19**, 147—157.
111. Gormley P. E., Benvenuto J., Cysyk R. L., (1977), *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1291—1294.
112. Hande K. R., Chabner B. A., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 579—585.
112. Orengo K. R., Maness P., (1978) w: *Methods in Enzymol.*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 321—331, Academic Press, New York.
114. Sugino Y., Teraska H., Shimano H., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 961—969.
115. Ives D. L., Durham J. P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2285—2294.
116. Momparler R. L., Fisher G. A., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4298—4304.
117. Brawerman G., Chargaff E., (1954), *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 549—559.

118. Brawerman G. Chargaff E., (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 524—532.
119. Maley G. F., Maley F., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.*, **101**, 342—349.
120. Roth J. S., (1970) w: Protein Metabolism and Biological Function, red. Bianchi C. P., Hilf R., str. 141—219, Rutgers University Press, New Brunswick, N. J.
121. Kit S., Leung W., Trkula D., Dubbs D. R., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 66—76.
122. Lenger K., (1982), *Int. J. Biochem.*, **14**, 53—61.
123. Lenger K., (1982), *Int. J. Biochem.*, **14**, 673—677.
124. Lenger K., (1982), *Int. J. Biochem.*, **14**, 955—960.
125. Kit S., (1976), *Mol. Cell. Biochem.*, **11**, 161—182.
126. Maley F., Maley G. F., (1972), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **5**, 177—228.
127. Lorenson M. Y., Maley G. F., Maley F., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 3332—3344.
128. Horinishi H., Greenberg D. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 741—752.
129. Slavik K., Slaviková V., (1980) w: Methods in Enzymol., red. McCormick D. B., Wright L. D., t. 66, cz. E, str. 709—723, Academic Press, New York.
130. Priest D. G., Doig M. T., Hynes J. B., (1981), *Experientia*, **37**, 119—120.
131. Rode W., Scanlon K. J., Hynes J., Bertino J. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 11538—11543.
132. Rode W., Kulikowski T., Kędzierska B., Jastreboff M., Shugar D., (1984), *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 2699—2705.
133. Fridland A., Langenbach R. J., Heidelberger C., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7110—7114.
134. Langenbach R. J., Danenberg P. V., Heidelberger C., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1565—1571.
135. Jastreboff M. M., Kędzierska B., Rode W., (1983), *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 2259—2267.
136. Jastreboff M., Kędzierska B., Rode W., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 217—223.
137. Rode W., Dolnick B. J., Bertino J. R., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 723—726.
138. Dolnick B. J., Cheng Y.-C., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7697—7703.
139. Lockshin A., Moran R. G., Danenberg P. V., (1979), *Proc. Natl. Sci. USA*, **76**, 750—754.
140. Lockshin A., Danenberg P. V., (1981), *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 247—257.
141. Bapat A. R., Zarow C., Danenberg P. V., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 4130—4136.
142. Kisliuk R. L., Gaumont Y., Baugh C. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4100—4103.
143. Dolnick B. J., Cheng Y.-C., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3563—3567.
144. Lu Y. Z., Aiello P. D., Matthews R. G., (1984), *Biochemistry*, **23**, 6870—6876.
145. Rader J. I., Huennekens F. M., (1973), w: The Enzymes, red. Boyer P. D., t. 9, str. 197—223, Academic Press, New York.
146. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 345—385.
147. McGuire J. J., Bertino J. R., (1981), *Mol. Cell. Biochem.*, **38**, 19—48.

148. Jastreboff M., Kędzierska B., Rode W., (1983) w: *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Blair J. A., str. 995—999, Walter de Gruyter, Berlin — New York.
149. Rode W., Jastreboff M. M., (1984), *Mol. Cell. Biochem.*, **60**, 73—76.
150. Jastreboff M. M., Zielińska Z. M., (1983), *Acta Biochim. Polon.*, **30**, 185—191.
151. Hartmann K.-U., Heidelberger C., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 3006—3013.
152. Conrad A. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1318—1323.
153. Conrad A. H., Ruddle F. H., (1972), *J. Cell Sci.*, **10**, 471—486.
154. Rosenberg R. N., Van deVenter L., DeFrancesco L., Friedkin M. E., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1436—1440.
155. Firshein W., Berry S. J., Swindlehurst M., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **149**, 190—198.
156. Carpenter N. J., (1973), *Genetics*, **75**, 113—122.
157. Rode W., Szymanowska H., (1976), *Insect Biochem.*, **6**, 333—337.
158. Yasumasu I., Saitoh M., Fujimoto N., Kusunoki S., (1979), *Develop. Growth Differ.*, **21**, 237—243.
159. Bourbon J. R., (1976), *Biochem. J.*, **155**, 713—715.
160. Peterson A. M., (1976), *Cell Differ.*, **5**, 37—43.
161. Clark B. R., Weichsel M. E., Jr., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 91—100.
162. Hyndman A. G., Zamenhof S., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 577—580.
163. Mendible J. C., Villarroel O., Sánchez C., Ordóñez L. A., (1978), *Acta Cient. Venez.*, **29**, 389—392.
164. Silber R., Gabrio B. W., Huennekens F. M., (1963), *J. Clin. Invest.*, **42**, 1913—1921.
165. Wilmanns W., Neef V., (1971), *Klin. Wochenschr.*, **49**, 755—762.
166. Baril E., Baril B., Elford H., Luftig R. B., (1974) w: *Mechanism and Regulation of DNA Replication*, red. Kolber A. R., Kohiyama M., str. 275—291, Plenum Press, New York.
167. Wickremasinghe R. G., Yaxley J. C., Hoffbrand A. V., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **126**, 589—596.
168. Noguchi H., Reddy G. P. V., Pardee A. B., (1983), *Cell*, **32**, 443—451.
169. Reddy G. P. V., Pardee A. B., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3312—3316.
170. Reddy G. P. V., Pardee A. B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12526—12531.
171. Scott F. W., Forsdyke D. R., (1980), *Biochem. J.*, **190**, 721—730.
172. Maley G. F., Lorenson M. G., Maley F., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 364—370.
173. Navalgund L. G., Rossana C., Muench A. J., Johnson L. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 7386—7390.
174. Tisdale M. J., (1980), *Chem. Biol. Inter.*, **30**, 115—124.
175. Dickens M. S., Lucas-Lenard J., Roth J. S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1319—1325.
176. Dickens M. S., Lucas-Lenard J., Roth J. S., (1977), *Exp. Cell Res.*, **110**, 331—335.
177. Priest D. G., Doig M. T., Ledford B. E., (1982), *Experientia*, **38**, 88—89.
178. Rode W., Scanlon K. J., Bertino J. R., (1979) w: *Chemistry and Biology of Pteridines*, red. Kisliuk R. L., Brown G. M., str. 489—494, Elsevier North Holland, New York-Amsterdam-Oxford.

179. Rode W., Scanlon K. J., Moroson B. A., Bertino J. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 1305—1311.
180. Cleaver J. E., (1967) w: *Thymidine Metabolism and Cell Kinetics*, str. 89—91, North Holland Publishing Co., Amsterdam i John Wiley and Sons, Inc., New York.
181. Reddy G. P. V., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 908—915.
182. Reddy G. P. V., Pardee A. B., (1983), *Nature*, **304**, 86—88.
183. Boorstein R. J., Pardee A. B., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 30—36.
184. Rode W., Jastreboff M. M., Bertino J. R., (1985), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **128**, 345—351.
185. Matthews R. G., Ross J., Baugh C. M., Cook J. D., Davis L., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1230—1238.
186. Kisliuk R. L., (1984) w: *Folate Antagonists as Therapeutic Agents*, red. Sirotnak F. M., Ensminger W. D., Burchall J. J., Montgomery J. J., t. 1, str. 1—68, Academic Press, Orlando.
187. Cheng Y. - C., (1978) w: *Methods in Enzymol.*, red. Hoffee P. A., Jones M. E., t. 51, str. 365—371, Academic Press, New York.
188. Ellims P. H., Van Der Weyden M. B., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 238—242.
189. Fabianowska-Majewska K., Greger J., (1982), *Enzyme*, **27**, 124—129.
190. Ingraham H. A., Tseng B. Y., Goulian M., (1982), *Mol. Pharmacol.*, **21**, 211—216.
191. Herrick D. J., Major P. P., Kufe D. W., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 5015—5017.
192. Ayusawa D., Shimizu K., Koyama H., Takeishi K., Seno T., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 12448—12454.
193. Jackson R. C., (1984), *Pharmacol. Ther.*, **25**, 61—82.
194. Grzelakowska-Sztabert B., (1983), *Post. Biochem.*, **29**, 167—190.
195. Jastreboff M. M., (1983), *Kosmos*, **32**, 101—113.
196. Freisheim J. H., Matthews D. A., (1984) w: *Folate Antagonists as Therapeutic Agents*, red. Sirotnak F. M., Ensminger W. D., Burchall J. J., Montgomery J. J., t. 1, str. 69—131, Academic Press, Orlando.
197. Rossana C., Rao L. G., Johnson L. F., (1982), *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1118—1125.
198. Washtien W. L., (1982), *Mol. Pharmacol.*, **21**, 723—728.
199. Berger S. H., Hakala M. T., (1984), *Mol. Pharmacol.*, **25**, 303—309.
200. Christopherson R. I., Duggleby R. G., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **134**, 331—335.

JADWIGA WILD \*

## Fuzje genów w badaniach regulacji ekspresji i w analizie białek.

### Zastosowania fuzji *lac*

Genetic fusions for studying the regulation  
of gene expression and to analyze proteins.

Uses of *lac* fusions

#### Spis treści

1. Wstęp
- II. Definicja fuzji operonowych i genowych
- III. Metody otrzymywania fuzji *lac in vivo*
  - III-1. Fuzje *lac* u bakterii jelitowych
  - III-2. Fuzje *lac* u innych mikroorganizmów
- IV. Otrzymywanie fuzji *lac in vitro*
  - V. Dlaczego najczęściej stosuje się fuzje *lac*
- VI. Wykorzystanie fuzji *lac* do badania regulacji ekspresji genów
  - VI-1. Wykrywanie i charakterystyka elementów kontrolujących ekspresję genu
  - VI-2. Badanie ekspresji genów regulatorowych
  - VI-3. Badanie ogólnej regulacji metabolizmu komórki
- VII. Transdukujący fag  $\lambda$  niosący fuzję *lac* — otrzymywanie i zastosowania
- VIII. Zastosowanie fuzji *lac* do analizy struktury i funkcji białek
  - VIII-1. Identyfikacja, oczyszczanie i charakterystyka produktu badanego genu
  - VIII-2. Badanie transportu białek
- IX. Fuzje *lac* w komórkach eukariotycznych
- X. Fuzje z innymi niż *lac* genami detektorowymi
- XI. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. Definition of operon and gene fusions

---

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

Wykaz stosowanych skrótów: *lac* — operon laktozy *lacZYA*; *lacZ* — gen kodujący  $\beta$ -galaktozydazę; *lacY* — gen kodujący permeazę  $\beta$ -galaktozydów; ONPG — o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopyranozyd; PG — fenyloetylo- $\beta$ -D-tiogalaktopyranozyd; tONPG — nitrofenylo-1-tio- $\beta$ -D-galaktopyranozyd; Xgal — 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- $\beta$ -D-galaktopyranozyd; cAMP — cykliczny AMP; CRP — białko wiążące cAMP (ang. *catabolite repression protein*).

- III. *In vivo* techniques for constructing *lac* fusions
  - III-1. *lac* Fusions in enteric bacteria
  - III-2. *lac* Fusions in other microorganisms
- IV. *In vitro* techniques for constructing *lac* fusions
- V. Reasons for using *lac* fusions
- VI. Uses of *lac* fusions to study the regulation of gene expression
  - VI-1. Detection and characterization of the elements controlling gene expression
  - VI-2. Study of regulatory genes expression
  - VI-3. Study of global regulation
- VII. Transducing  $\lambda$  phage carrying *lac* fusion — isolation and uses
- VIII. Uses of *lac* fusions to analyze protein structure and function
  - VIII-1. Identification, purification and characterization of target gene products
  - VIII-2. Study of protein transport
- IX. *lac* Fusions in eucaryotic cells
- X. Other detector genes used for fusions
- XI. Concluding remarks

## I. Wstęp

Od opublikowania pracy J a c o b a i M o n o d a (1) o mechanizmach regulujących syntezę białek minęło już 25 lat. W ciągu tego ćwierćwiecza nastąpił ogromny postęp w badaniach nad działaniem genów oraz regulacją ich ekspresji. Opracowanie i użycie wielu nowych technik eksperymentalnych w znacznej mierze przyczyniło się do rozwoju badań w tej dziedzinie. Jedną z technik, która znalazła szerokie i różnorodne zastosowanie w biologii molekularnej jest tzw. konstrukcja fuzji genów. Terminem „fuzja genów” określa się połączenie genów, które występują na ogół w różnych miejscach chromosomalnego DNA.

Pierwsze fuzje genów w komórkach *Escherichia coli* otrzymano w latach 60-tych. Jedną z nich jest wyizolowana przez J a c o b a i w s p. (2) fuzja genu *purE* i genu *lacY*\*. W szczepach bakteryjnych niosących fuzje *purE-lacY* synteza permeazy galaktozydów, będącej produktem genu *lacY*, zależy od obecności puryn w pożywce wzrostowej. A więc ekspresja genu *lacY* podlega kontroli specyficznej dla genu *purE* a nie podlega kontroli właściwej dla operonu *lac*. Stosując specjalne techniki genetyczne, w początkach lat 70-tych, skonstruowano szereg fuzji pomiędzy operonami *trp* i *lac*. Badania prowadzone przy pomocy tych fuzji przyczyniły się do poznania elementów regulujących ekspresję obu opero-

---

\* Operon laktozy — *lacZYA* składa się z trzech genów: genu *lacZ* kodującego  $\beta$ -galaktozydazę, genu *lacY* kodującego permeazę  $\beta$ -galaktozydów i genu *lacA* kodującego transacetylazę. Ekspresja operonu *lac* podlega indukcji przez laktozę. Natomiast ekspresja genu *purE* kodującego jeden z enzymów biosyntezy puryn jest reprimowana przez puryny.

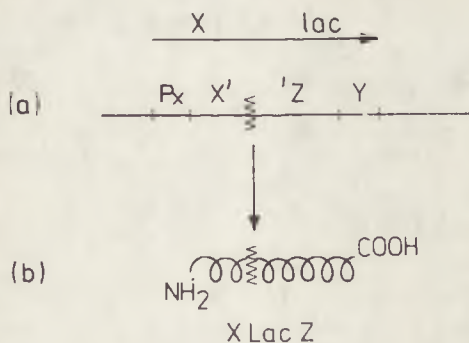


nów (3). Jednak wówczas brak odpowiednich metod ograniczał możliwości otrzymywania fuzji genów. Poczynając od 1976 r. opisano kilka metod konstrukcji fuzji genów, z którymi zapoznam czytelnika w tym artykule. Wyjaśnię również jakie zastosowania mają fuzje genów w biologii molekularnej.

## II. Definicja fuzji operonowych i genowych

Fuzje, o których będzie mowa w tym artykule, stanowią połączenie regionu regulatorowego i odcinka 5' badanego genu X z detektorowym genem struktury pozbawionym własnego regionu regulatorowego. W takich fuzjach, synteza detektorowego białka zachodzi z promotora genu X, czyli ekspresja detektorowego genu zależy od elementów regulacyjnych specyficznych dla badanego genu X. Najczęściej stosowanym detektorowym genem struktury jest gen *lacZ* kodujący  $\beta$ -galaktozydazę.

Można skonstruować dwa typy fuzji — fuzje operonowe i fuzje genowe. W fuzjach operonowych region regulatorowy i odcinek 5' badanego genu X jest połączony z genem *lacZ* posiadającym własne sygnały translacyjne. A więc, w takich fuzjach ekspresja genu *lacZ* zależy tylko od sygnałów transkrypcyjnych obecnych w przyłączonym do niego regionie regulatorowym genu X. Natomiast w fuzjach genowych region regulatorowy i odcinek 5' badanego genu X jest połączony z genem *lacZ*, który nie zawiera sygnałów translacyjnych i kilku pierwszych sekwencji kodujących. Sygnały transkrypcyjne i translacyjne, warunkujące ekspresję genu *lacZ* pochodzą z obecnego w fuzji genowej regionu regulatorowego genu X. Połączenie odcinka 5' badanego genu X z genem *lacZ* pozbawionym kilku pierwszych kodonów, tworzy gen hybrydowy. Pro-



**Ryc. 1.** Fuzja genowa i jej produkt — białko hybrydowe

W fuzji genowej (a) region regulatorowy i odcinek 5' genu X jest połączony z odcinkiem 3' genu *lacZ*. Produktem fuzji genowej jest białko hybrydowe XLacZ (b), którego amino-terminalny fragment jest kodowany przez odcinek 5' genu X a karboksy-terminalny fragment stanowi produkt odcinka 3' genu *lacZ* —  $\beta$ -galaktozydaza. Pozioma strzałka wskazuje kierunek transkrypcji.

duktem takiego genu jest białko hybrydowe, którego amino-terminalny fragment jest kodowany przez odcinek 5' genu X a karboksy-terminalny fragment stanowi  $\beta$ -galaktozydaza — funkcjonalny produkt skróconego genu *lacZ* (Ryc. 1). Ponieważ produktem fuzji genowej jest białko hybrydowe, niektórzy autorzy nazywają tego typu fuzje fuzjami białkowymi.

Należy wyjaśnić, że tworzenie fuzji genowych *lac* jest możliwe dzięki pewnym właściwościom  $\beta$ -galaktozydazy. Aktywną formą enzymu jest tetramer. Aminokwasy w karboksy-terminalnym fragmencie tego białka odgrywają rolę w interakcji monomer-monomer. Dlatego delecja lub wymiana nawet kilku nukleotydów w DNA kodującym karboksy-terminalny fragment białka powoduje syntezę nieaktywnego enzymu. Natomiast usunięcie lub wymiana, w  $\text{NH}_2$ -końcu białka, nawet 25 aminokwasów na kilka do kilkuset innych aminokwasów nie zmienia jego aktywności (4).

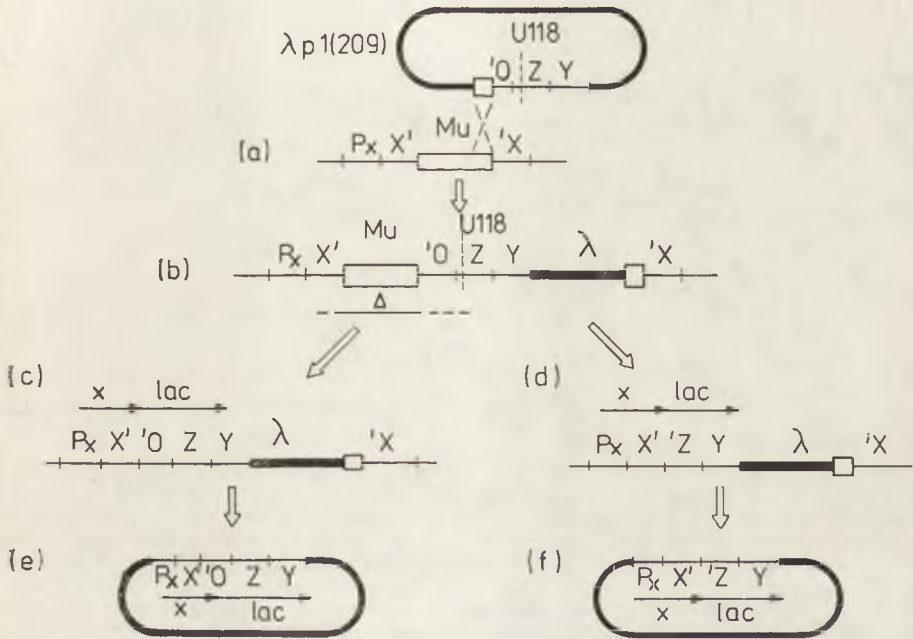
### III. Metody otrzymywania fuzji *lac in vivo*

#### III-1. Fuzje *lac* u bakterii jelitowych

Aby mogła powstać fuzja, geny *lac* trzeba wbudować do badanego genu X w orientacji zgodnej z kierunkiem transkrypcji tego genu. Ze względu na brak homologii genu X z operonem *lac* rekombinacja między takimi odcinkami DNA będzie zachodzić bardzo rzadko. Homologię potrzebną do wydajnej rekombinacji można wytworzyć wprowadzając do genu X oraz do operonu *lac* identyczne fragmenty DNA. Takimi fragmentami są odkryte w latach 70-tych genetyczne elementy zdolne do transpozycji, jak: transpozony, elementy insercyjne oraz bakteriofag Mu. Właśnie bakteriofag Mu jest szeroko stosowany do otrzymywania fuzji *in vivo*. Jest to łagodny fag, który wbudowuje swój genom ( $28 \times 10^6$  daltonów) w dowolne miejsce chromosomu *E. coli*. Insercja faga Mu do określonego genu powoduje przerwanie ciągłości tego genu, a co za tym idzie brak jego ekspresji. Stosując odpowiednie metody selekcji można stosunkowo łatwo otrzymać insercje faga Mu do badanego genu X. Wykorzystując te właściwości faga Mu Casadaban (5) opracował dwustopniową metodę otrzymywania fuzji *in vivo* przedstawioną na rycinie 2. Skonstruował on faga  $\lambda$  p1(209), który niesie fragment Mu oraz geny *lacZY* pozbawione funkcjonalnego promotora. Ponadto fag  $\lambda$  p1(209) nie zawiera miejsca *att* odpowiedzialnego za jego integrację w specyficzne receptorowe miejsce chromosomu *E. coli*. Z tego właśnie powodu fag  $\lambda$  p1(209) może integrować do chromosomu bakteryjnego tylko w wyniku rekombinacji pomiędzy sekwencjami homologicznymi w jego DNA i w DNA gospodarza. Jeżeli do bakterii zawierających faga Mu wbudowanego w gen X wprowadzi się faga  $\lambda$  p1(209) nastąpi rekombinacja ho-

mologicznych fragmentów jakimi są odcinki DNA faga Mu. Wynikiem takiej rekombinacji jest transpozycja operonu *lac* w pobliże badanego genu. Elementem oddzielającym region regulatorowy badanego genu X od operonu *lac* jest wbudowany fag Mu. Wycięcie faga Mu powoduje powstanie fuzji operonowej. Jeżeli bakterie zawierające faga Mu wbudowanego w gen X potraktuje się fagiem  $\lambda$  p1(209) z mutacją nonsensową U118 w początkowych sekwencjach genu *lacZ* to otrzymuje się fuzje genowe kodujące białko hybrydowe o aktywności  $\beta$ -galaktozydazy (Ryc. 2).

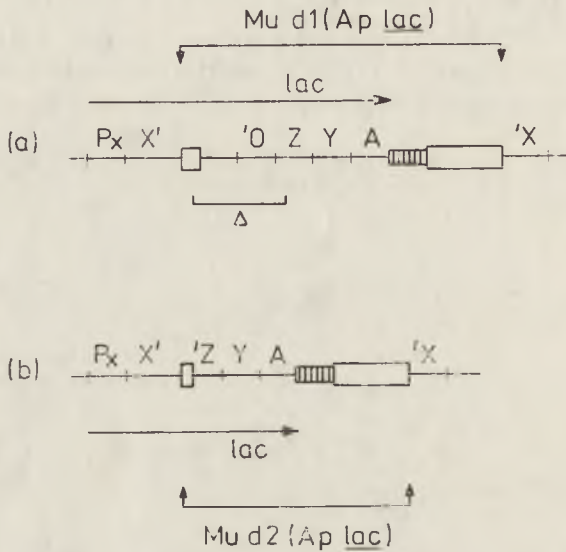
Fuzje operonowe otrzymuje się również stosując defektywnego faga Mu d1(Ap*lac*) (6). Fag ten niesie w swoim genomie operon *lac* pozbawiony funkcjonalnego promotora oraz gen *bla* kodujący  $\beta$ -laktamazę,



**Ryc. 2.** Otrzymywanie, przy pomocy techniki Casadabana (5) fuzji operonowych i genowych oraz izolowanie transdukujących fagów  $\lambda$  niosących fuzje.

Bakterie zawierające faga Mu wbudowanego w gen X (a) traktuje się fagiem  $\lambda$  p1(209), który integruje do chromosomu bakteryjnego w wyniku rekombinacji między homologicznymi fragmentami DNA jakimi są odcinki DNA faga Mu (prostokąty). Powstaje lizogen faga  $\lambda$  p1(209), w którym elementem oddzielającym promotor genu X od operonu *lac* jest fag Mu (b). Wycięcie faga Mu /trójkąt/ powoduje powstanie fuzji operonowej (c). Do otrzymania fuzji genowych używa się faga  $\lambda$  p1(209) z mutacją U118 typu „ochre”, w początkowych sekwencjach genu *lacZ*. Mutacja *lacZ* U118 wpływa polarnie na ekspresję pozostałych genów *lac*. Aby w lizogenie faga  $\lambda$  p1(209), *lacZ* U118) mogła powstać fuzja o fenotypie Lac<sup>+</sup> wycięciu faga Mu musi towarzyszyć delecja przyległego materiału genetycznego obejmująca mutację *lacZ* U118. Taka delecja prowadzi do powstania fuzji genowej (d). Wycięcie profaga  $\lambda$  z chromosomu bakteryjnego następuje pod wpływem czynnika indukującego. Ponieważ wycięcie DNA tego faga  $\lambda$  zachodzi na drodze nieuprawnionej rekombinacji, powstają cząstki fagowe niosące różne fragmenty przyległego DNA bakteryjnego. Wśród nich znajdują się transdukujące fagi  $\lambda$  niosące fuzję operonową (e) lub genową (f). Cienkie strzałki wskazują kierunek transkrypcji.

a więc warunkujący oporność na ampicylinę. Insercja faga Mu d1(Ap lac) do badanego genu X w odpowiedniej orientacji powoduje powstanie fuzji operonowej (Ryc. 3). Zaletą stosowania tego faga jest możliwość selekcjonowania kolonii Ap<sup>r</sup>Lac<sup>+</sup> z jednoczesną utratą funkcji badanego genu X, co znacznie upraszcza procedurę otrzymywania fuzji operonowych (6, 85).



**Ryc. 3.** Otrzymywanie fuzji operonowych i genowych przez insercję faga Mu d1(Ap lac) lub Mu d2(Ap lac) do genu X

Insercja faga Mu d1(Ap lac) do genu X w odpowiedniej orientacji transkrypcji powoduje powstanie fuzji operonowej (a). Cienka linia przedstawia DNA bakteryjne. W genomie faga Mu (prostokąty) występuje gen *bla* (obszar zakreskowany) warunkujący oporność na ampicylinę. Stosując techniki rekombinacji DNA *in vitro* Casadaban i Chou (7) wycięli fragment DNA z faga Mu d1(Ap lac) (trójkąt). Otrzymany fag Mu d2(Ap lac) niesie gen *lacZ* pozbawiony zarówno sygnałów inicjacji transkrypcji jak i translacji. Insercja faga Mu d2(Ap lac) do genu X w odpowiedniej orientacji transkrypcji i zgodnej fazie odczytywania kodu powoduje powstanie fuzji genowej (b). Strzałki wskazują kierunek transkrypcji.

W ostatnich dwóch latach, stosując metody inżynierii genetycznej, skonstruowano kilka fagów, których użycie znacznie upraszcza otrzymywanie fuzji genowych *in vivo*. Jednym z nich jest fag Mu d2(Ap lac), który niesie gen *lacZ* pozbawiony zarówno sygnałów inicjacji transkrypcji jak i translacji. W wyniku insercji tego faga do badanego genu X w odpowiedniej orientacji i zgodnej fazie odczytywania kodu powstaje fuzja genu kodująca białko hybrydowe (7, 4, Ryc. 3). Inny fag to fag λ *placMu*, który może integrować w dowolne miejsce chromosomu bakteryjnego używając systemu transpozycji faga Mu (8). Ponieważ fag ten, podobnie jak Mu d2(Ap lac), zawiera nieczynne geny *lac*, jego integracja do badanego genu X powoduje powstanie fuzji genowej. Ostatnio skonstruowano

kilka pochodnych faga  $\lambda$  *placMu*, przy pomocy których można otrzymywać zarówno fuzje genowe jak i operonowe (9).

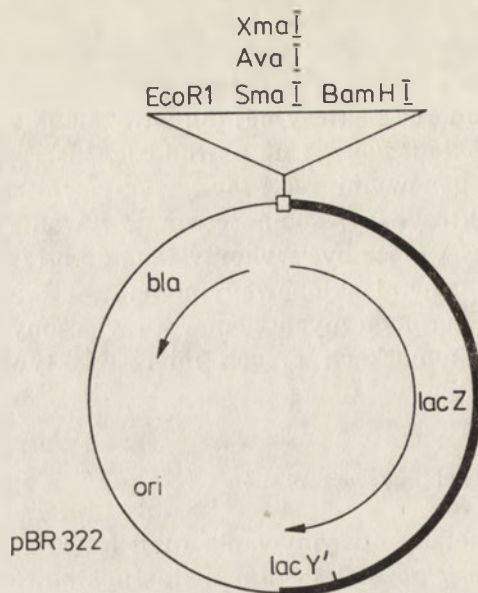
Ostatnio wykazano, że fag  $\lambda$  *placMu* może integrować z DNA plazmidów obecnych w komórce bakteryjnej (8). Otrzymano szereg insercji tego faga do genu *recA* sklonowanego na plazmidzie. Insercje te mają fenotyp  $Lac^+$  i są fuzjami genowymi *recA-lacZ* kodującymi białko hybrydowe o aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. Zdolność wbudowywania się faga  $\lambda$  *placMu* do plazmidowego DNA może być wykorzystana do otrzymywania fuzji *lac* z heterologicznymi genami sklonowanymi na wektorach plazmidowych. Ekspresję takich heterologicznych genów przyłączonych do genu *lacZ*, można oznaczać w komórkach *E. coli* mierząc aktywność  $\beta$ -galaktozydazy.

### III-2. Fuzje *lac* u innych mikroorganizmów

Przedstawione metody otrzymywania fuzji *lac in vivo* dotyczą bakterii jelitowych *Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium*. W przypadku mikroorganizmów niewrażliwych na fagi  $\mu$  i  $\lambda$ , w celu konstrukcji tych fuzji stosuje się transpozony niosące nieczynne geny *lac*. Obecność transpozonu umożliwi selekcję kolonii opornych na odpowiedni antybiotyk; jeżeli integracja transpozonu Tn *lac* do genu X nastąpi w odpowiedniej orientacji powstaje fuzja *lac* z genem X, co można stwierdzić znajdując kolonie  $Lac^+X^-$ . Stosując tę metodę otrzymano fuzje *lac* u *Bacillus subtilis* (10) oraz u *Myxococcus xanthus* (11). U obu gatunków bakterii fuzje *lac* wykorzystywano do badania molekularnych mechanizmów procesu rozwoju.

### IV. Otrzymywanie fuzji *lac in vitro*

Fuzje *lac* otrzymać można również przy użyciu metod inżynierii genetycznej. Stosując techniki rekombinacji DNA *in vitro* skonstruowano liczne wektory plazmidowe przystosowane do łączenia genu *lacZ* z fragmentami DNA niosącymi region inicjacji transkrypcji i translacji genu X. Prototypowymi wektorami są plazmidy pMC1403 (12) i pMLB1034 (4), (Ryc. 4) będące pochodnymi plazmidu pBR322. Oba wektory zawierają gen *lacZ* pozbawiony regionu promotorowego, miejsca wiązania rybosomów i inicjacji translacji oraz pierwszych ośmiu kodonów. Przed skróconym genem *lacZ* znajdują się syntetyczne sekwencje DNA (ang. *poly-linker*) rozpoznawane przez różne endonukleazy restrykcyjne. W te miejsca można wstawiać fragmenty DNA zawierające promotor i sygnał inicjacji translacji podłączanego genu lub operonu. Wbudowanie takiego fragmentu DNA do wektora w odpowiedniej orientacji powoduje po-



**Ryc. 4.** Wektor plazmidowy pMBL1034.

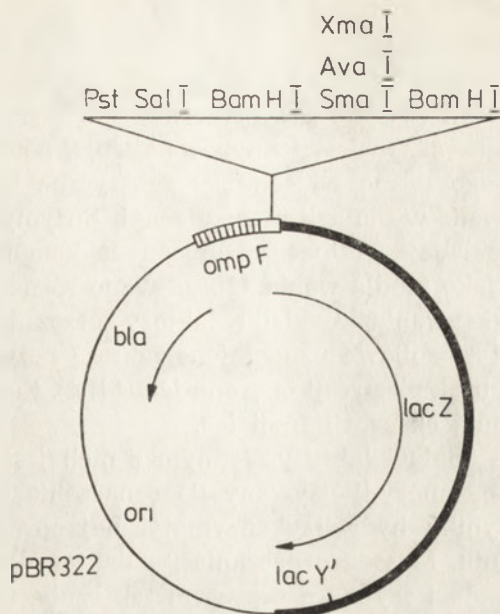
Na schemacie przedstawiono strukturę plazmidu pMBL1034. Fragment DNA pochodzący z wektora pBR322 zaznaczono cienką linią. Fragment DNA bakteryjnego (gruba linia) zawiera gen *lacZ* pozbawiony pierwszych ośmiu kodonów i część genu *lacY*. Wymienione endonukleazy restrykcyjne rozpoznają sekwencje występujące w polilinkerze (prostokąt). Strzałki wskazują kierunek transkrypcji.

wstanie fuzji genowej *lac*. W tak otrzymanej fuzji genowej ekspresja genu *lacZ* jest miarą wydajności transkrypcji i translacji przyłączonego *in vitro* regionu regulatorowego.

Otrzymano szereg pochodnych plazmidów pMC1403 i pMLB1034. Mają one wprowadzone do polilinkera dodatkowe miejsca rozpoznawane przez inne niż pokazane na rycinie 4 enzymy restrykcyjne. Występowanie różnych polilinkerek w tych wektorach umożliwia przyłączenie do genu *lacZ* dowolnego fragmentu DNA (4, 12, 83).

Wektory będące pochodnymi plazmidu pBR322 występują w komórce w dużej liczbie kopii, otrzymana więc fuzja będzie również występować w wielu kopiach. Obecność, w jednej komórce, wielu kopii regionu regulatorowego może powodować niespecyficzne zmiany w ekspresji badanej fuzji np. derepresję będącą wynikiem unieczynnienia represora. Do otrzymywania fuzji *lac* na wektorze występującym w komórce w jednej kopii używa się wektora  $\lambda$ NF1955 będącego pochodną faga  $\lambda$  (4). Wektor ten służy do konstrukcji *in vitro* fuzji z operonem *lac* w sposób analogiczny jak omówione wyżej wektory plazmidowe.

Skonstruowano szereg wektorów plazmidowych umożliwiających ekspresję heterologicznego DNA w komórkach *E. coli*. Są to wektory Orf (ang. *open reading frame*) będące pochodnymi plazmidu pBR322 (13, 83),



Ryc. 5. Wektor plazmidowy pORF1.

Na schemacie przedstawiono strukturę plazmidu pORF1. Fragment DNA pochodzący z wektora pBR322 zaznaczono cienką linią. We fragmencie DNA pochodzenia bakteryjnego występuje region regulatorowy genu *ompF* zawierający silny promotor, miejsce wiązania rybosomów i kodon inicjacji translacji (obszar zakreskowany) oraz gen *lacZ* pozbawiony pierwszych ośmiu kodonów i część genu *lacY*. Wymienione endonukleazy restrykcyjne rozpoznają sekwencje występujące w polilinkerze (prostokąt). Strzałki wskazują kierunek transkrypcji.

(Ryc. 5). Zawierają one wbudowany w plazmidowe DNA: silny promotor, aktywne miejsce wiązania rybosomów oraz kodon inicjujący translację. Bezpośrednio za tymi sekwencjami znajduje się funkcjonalny fragment genu *lacZ*, pozbawiony własnych specyficznych sygnałów inicjacyjnych. Te dwa fragmenty są w zgodnej orientacji transkrypcji ale nie są w tej samej fazie odczytywania kodu i dlatego wektor wykazuje fenotyp Lac<sup>-</sup>. Jeżeli pomiędzy te dwa fragmenty zostanie wbudowany odcinek badanego DNA odtwarzający fazę odczytywania kodu to z tak otrzymanego trzyczęściowego genu będzie syntetyzowane białko trybrydowe\* o aktywności β-galaktozydazy. Aby ułatwić takie konstrukcje wektory Orf zawierają w miejscu połączenia regionu regulatorowego i genu *lacZ* poli-linkery rozpoznawane przez różnorodne endonukleazy restrykcyjne. Trybrydy białkowe stosuje się do wytwarzania przeciwciał, które z kolei służą do identyfikacji produktu wbudowanego do wektora genu.

\* Trybryd białkowy oznacza białko, w którym amino-terminalny fragment pochodzi z wektora Orf, środkowy fragment jest produktem genu wbudowanego do wektora a karboksy-terminalny fragment stanowi β-galaktozydaza.

## V. Dłaczego najczęściej stosuje się fuzje *lac*?

Zastosowanie operonu *lacZYA* lub genu *lacZ*, jako genu detektorowego, do otrzymywania fuzji nie jest przypadkowe, lecz wynika z wielu istotnych przesłanek. Operon ten jest jednym z najlepiej poznanych systemów regulacyjnych, a jego liczne właściwości genetyczne i biochemiczne są często wykorzystywane w biologii molekularnej. Enzymy kodowane przez operon *lacZYA* rozkładają laktozę, co umożliwia komórkom *E. coli* wykorzystywanie jej jako źródła węgla. Opracowano różne podłoża, których używa się do wykrywania rozkładu laktozy przez bakterie. Podłoża MacConkey'a czy tetrazoliowe uzupełnione laktozą pozwalają wykrywać różne poziomy lub brak ekspresji operonu *lac* (14, 4). Są one powszechnie stosowane do badania ekspresji fuzji *lac*.

Znane są liczne analogi laktozy. Jednym z nich jest ONPG (o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopyranozyd) używany do oznaczania aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. W wyniku hydrolizy enzymatycznej powstaje o-nitrofenol o żółtym zabarwieniu. Metoda oznaczania  $\beta$ -galaktozydazy z ONPG jako substratem jest prosta i szybka a przy tym tak czuła, że umożliwia wykrywanie bardzo niskich aktywności enzymu, stanowiących 0,001<sup>0</sup>/<sub>0</sub> poziomu charakterystycznego dla dzikiego operonu *lac* (14). Dlatego, między innymi, geny o niskiej ekspresji, bądź o produktach trudnych do mierzenia łączy się z genem *lacZ*; powstałe fuzje produkują  $\beta$ -galaktozydazę, której aktywność stanowi miarę ekspresji badanych genów.

Inne analogi laktozy jak na przykład tONPG (o-nitrofenylo-tiogalaktopyranozyd), czy PG (fenylo-etylo-tiogalaktopyranozyd) dodane do pożywki wzrostowej umożliwiają selekcjonowanie różnego rodzaju mutantów zmieniających ekspresję operonu *lac* (4, 14, 83). Takie podłoża można z powodzeniem stosować do otrzymywania w fuzjach *lac* mutantów regulatorowych.

Na szczególną uwagę zasługuje analog Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- $\beta$ -D-galaktopyranozyd) (4, 14, 83). W wyniku hydrolizy tego związku przez  $\beta$ -galaktozydazę powstaje niebieski barwnik będący czułym indykatorem aktywności  $\beta$ -galaktozydazy. Podłoża stałe zawierające Xgal umożliwiają określenie poziomu tego enzymu w komórce poprzez ocenę intensywności niebieskiego zabarwienia kolonii. Ponieważ Xgal nie jest induktorem operonu *lac* intensywność niebieskiego zabarwienia jest odzwierciedleniem aktywności regionu regulatorowego przyłączonego do operonu *lac*. W analogiczny sposób, detekcja zabarwionych na niebiesko łysinek umożliwia wykrycie fagów niosących gen *lacZ*. Ponieważ transport Xgal do komórki jest niezależny od permeazy *lacY* użycie tego analogu pozwala na badanie ekspresji fuzji, w których nie występuje gen *lacY*, co ma miejsce w fuzjach konstruowanych *in vitro* (4).

Pewne właściwości białka  $\beta$ -galaktozydazy umożliwiające otrzymywanie białek hybrydowych omówiono już w rozdziale II. Ponieważ ciężar



cząsteczkowy monomeru  $\beta$ -galaktozydazy wynosi 116 000, białka hybrydowe mają więc na ogół bardzo duże ciężary cząsteczkowe, a to umożliwia ich łatwą identyfikację w żelu poliakryloamidowym. Co więcej, wykorzystując właściwości białka  $\beta$ -galaktozydazy opracowano proste i szybkie metody oczyszczania białek hybrydowych zawierających część karboksy-terminalną  $\beta$ -galaktozydazy. Wykorzystanie fuzji genowych *lac* do oczyszczania białek będzie omówione w rozdziale VIII-1.

## VI. Wykorzystanie fuzji *lac* do badania regulacji ekspresji genu

Punktem wyjścia w badaniach regulacji danego systemu jest poznanie czynników fizjologicznych wpływających na jego ekspresję. Nie zawsze jest to łatwym zadaniem. Często produkty genowe są nietrwałe lub oznaczanie ich aktywności wymaga dużego nakładu pracy i trudno dostępnych odczynników. Niekiedy związki potrzebne do wzrostu badanego szczepu bakterii interferują z metodą pomiaru aktywności produktu genu. W niektórych warunkach fizjologicznych np. powodujących represję, zmierzenie ilości produktu badanego genu jest wręcz niemożliwe. W tych wszystkich przypadkach nieocenione usługi oddają fuzje z operonem *lac*. Przyłączenie badanego genu X do operonu *lac* daje możliwość śledzenia aktywności jego promotora przez pomiar poziomu  $\beta$ -galaktozydazy. Uniezależnia to badacza od wyżej wymienionych trudności, ponieważ metoda oznaczania aktywności  $\beta$ -galaktozydazy jest prosta i bardzo czuła a sam enzym bardzo stabilny. Badano wpływ różnych czynników fizjologicznych na ekspresję bardzo wielu fuzji. Jednym z przykładów może być użycie fuzji *lac* do badania regulacji transportu i degradacji kwasów tłuszczowych u *E. coli* (15).

### VI-1. Wykrywanie i charakterystyka elementów kontrolujących ekspresję genu

Otrzymanie i charakterystyka mutantów o zmienionej ekspresji danego systemu prowadzi do identyfikacji elementów kontrolnych specyficznych dla tego systemu. Jednak aby otrzymać takie mutanty potrzebne są odpowiednie metody selekcji, których brak w przypadku wielu systemów. Użycie fuzji operonowych *lac* usuwa tę trudność. Stosując podłoża selekcyjne zawierające laktozę lub odpowiednie jej analogi, można selekcjonować różnego typu mutanty wykazujące zmienioną ekspresję badanej fuzji. Wybór metody selekcji zależy od poziomu ekspresji fuzji i rodzaju poszukiwanych mutantów. W przypadku fuzji o niskiej aktywności  $\beta$ -galaktozydazy użycie podłoża uzupełnionego analogiem PG umożliwia selekcję mutantów o wysokim poziomie produktów operonu *lac* (14, 84).

Inny analog laktozy, tONPG, transportowany do komórki przez produkt genu *lacY* ma działanie bakteriostatyczne. Dlatego mutanty odporne

na tONPG wykazują brak lub obniżoną ekspresję operonu *lac* (4, 83). Stosując podłoże zawierające tONPG otrzymano mutanty w promotorze genu *tyrT* kodującym tyrozynowy tRNA (16).

Używając fuzji *lac* otrzymano mutacje w promotorach i operatorach różnych genów. Zainteresowanego czytelnika odsyłam do oryginalnych prac, w których opisano otrzymywanie mutacji w promotorze genu *recA* (17), *ompF* (18), czy w operatorze operonu *argECBH* (84).

W badaniach regulacji ekspresji genu lub operonu istotnym jest otrzymanie mutacji w genach regulatorowych. Stosując fuzje *lac* zidentyfikowano mutacje w genach regulatorowych szeregu systemów. Badając regulację biosyntezy puryn przy pomocy fuzji *purE-lac*, *purB-lac* i *purF-lac* wyizolowano mutanty *purR* (19, 20, 48). Otrzymano i scharakteryzowano regulatorowe mutacje wpływające na ekspresję operonu *guaBA* odpowiedzialnego za syntezę guanozyno-monofosforanu (21). Technikę fuzji zastosowano do wykrycia genu *tnpR*, który reguluje transpozycję elementu insercyjnego Tn3 (22).

Fuzje są szczególnie przydatne do wykrywania elementów kontrolujących ekspresję genów czy operonów, stanowiących część regulonu. Regulon jest grupą niesprzężonych genów, których ekspresję kontroluje to samo białko regulatorowe. Zwykle łatwo jest otrzymać mutacje w genie kodującym białko regulatorowe, natomiast wiele trudności sprawia badanie elementów wpływających na działanie poszczególnych genów w regulonie. Przyłączenie operonu *lac* do poszczególnych genów danego regulonu, a następnie izolowanie i charakterystyka odpowiednich mutantów pozwala na poznanie regulacji strukturalnych elementów danego regulonu. Dzięki zastosowaniu fuzji *lac* poznano wiele aspektów regulacji regulonu *mal* odpowiedzialnego za zdolność *E. coli* do wykorzystywania maltozy jako źródła węgla (23, 24). Fuzje *met-lac* wykorzystano do badania ekspresji genów stanowiących regulon biosyntezy metioniny oraz do otrzymania mutantów regulatorowych (25). Przy pomocy fuzji *lac* zbadano skomplikowany system genetyczny *nif* (ang. *nitrogen fixation*), którego 16 genów zgrupowanych w 5-ciu policistronowych i 3 monocistronowych jednostkach transkrypcyjnych jest odpowiedzialnych za wiązanie wolnego azotu przez bakterie z gatunku *Klebsiella* (16). Synteza aparatu flagellarnego *E. coli* wymaga produktów 29 genów, a innych 11 genów potrzebnych jest do jego funkcjonowania. Wyniki otrzymane przy użyciu fuzji *fla-lac*, *flb-lac*, *mot-lac*, *hag-lac* umożliwiły ustalenie jakie są wzajemne oddziaływania regulacyjne poszczególnych operonów w tym systemie (27).

## VI-2. Badanie ekspresji genów regulatorowych

W komórkach prokariotów ekspresja wielu genów i operonów jest regulowana na poziomie transkrypcji przez specyficzne białka regulato-

rowe. Nasuwa się pytanie — w jaki sposób jest regulowana ekspresja genów regulatorowych. Badanie mechanizmów kontrolujących syntezę białek regulatorowych jest szczególnie trudne, ponieważ produkty genów regulatorowych na ogół nie mają aktywności enzymatycznej, a ponadto występują w komórce w bardzo małych ilościach.

Technika fuzji operonowych *lac* okazała się ogromnie przydatna w badaniach ekspresji genów regulatorowych. Jeżeli promotor genu regulatorowego zostanie przyłączony do operonu *lac* to poziom aktywności  $\beta$ -galaktozydazy będzie miarą działania tego promotora.

Casadaban, jako pierwszy, zastosował fuzję *lac* do badania ekspresji genu regulatorowego *araC* aktywującego transkrypcję operonu *ara*. Wykazał on, że wprowadzenie epizomu niosącego allel genu *araC* do komórki szczepu zawierającego fuzję *araC-lac* powoduje represję syntezy  $\beta$ -galaktozydazy. Otrzymany wynik świadczy o tym, że produkt genu *araC* kontroluje w sposób negatywny własną syntezę; ten typ regulacji nazwano regulacją autogenną (28).

W wielu laboratoriach skonstruowano fuzje *lac* z promotorami różnych genów regulatorowych. Podsumowując wyniki otrzymane przy pomocy takich fuzji można stwierdzić, że ekspresja większości badanych dotychczas genów regulatorowych jest pozytywnie lub negatywnie autoregulowana. Zjawiskiem spotykanym najczęściej okazała się autoregulacja negatywna. Podlegają jej takie geny regulatorowe jak *cysB* kodujący pozytywny czynnik syntezy regulonu cysteinowego (29), *dsdC* kodujący pozytywny czynnik syntezy deaminazy D-serynowej (30), *tyrR* kodujący represor syntezy enzymów biorących udział w biosyntezie i transporcie tyrozyny i fenyloalaniny (31), *uxuR* regulujący syntezę enzymów degradujących glukuronian (32), *lysR* będący represorem syntezy enzymów biosyntezy lizyny (33). Pozytywnej autoregulacji podlegają natomiast takie geny regulatorowe jak *phoB* kodujący aktywator regulonu *pho* (34), czy *nifA* regulujący ekspresję genów *nif* (35).

Stosując fuzje *malT-lac* wykazano, że synteza genu regulatorowego *malT* kodującego aktywator ekspresji regulonu *mal* odpowiedzialnego za katabolizm maltozy nie podlega autoregulacji. Ekspresja genu *malT* jest natomiast pozytywnie kontrolowana przez kompleks cAMP—CRP (36, 37). Stwierdzono, że kompleks ten aktywuje ekspresję niektórych innych genów regulatorowych np. *uxuR* i *araC* (32, 38).

Fuzje wielu genów regulatorowych z operonem *lac* wykorzystano również do izolowania fragmentów DNA zawierających promotory tych genów, co pozwoliło na ustalenie ich sekwencji nukleotydowych.

Ponieważ fuzje *lac* mają łatwy do wykrywania fenotyp Lac<sup>+</sup>, mogą być użyte do identyfikacji klonów, w banku genów, niosących pozytywnie działające geny regulatorowe. Jeżeli w chromosomie bakterii zawierających fuzję *genX-lac* występuje mutacja w genie kodującym pozytywny czynnik ekspresji genu X, to fenotyp tego szczepu bakteryjnego

będzie Lac<sup>-</sup>. Natomiast wprowadzenie do takiego szczepu kopii genu regulatorowego na elemencie ekstrachromosomowym (bakteriofag lambda, wektor plazmidowy) nada mu łatwo wykrywalny genotyp Lac<sup>+</sup>. Taką metodę zastosowano do sklonowania genu regulatorowego *ompR* (39).

### VI-3. Badanie ogólnej regulacji metabolizmu komórki

Oprócz specyficznych systemów regulacyjnych metabolizm komórki podlega regulacji przez ogólny system kontroli (ang. *global control*), którego efektorami, o plejotropowym charakterze, są między innymi glukoza, nieorganiczny fosforan, tlen czy uszkodzenia DNA. Odpowiedzią komórki na obecność efektora jest indukcja lub represja różnych układów enzymatycznych, nie zawsze związanych ze sobą czynnościowo. Loci genowe, których ekspresja zależy od plejotropowego efektora określono terminem globalnego regulonu. Zastosowanie techniki fuzji *lac* umożliwiło zidentyfikowanie szeregu nowych loci genowych w poszczególnych globalnych regulonach. W badaniach tych używano faga Mu dl(Ap *lac*). Wykorzystując zdolność tego faga do integracji w dowolne miejsce chromosomu bakteryjnego otrzymano fuzje operonowe *lac*, w których aktywność  $\beta$ -galaktozydazy podlega zmianie w obecności stosowanego efektora. W ten sposób wykryto 18 genów *psi* (ang. *phosphate starvation inducible*), których ekspresja podlega indukcji w warunkach głodu fosforanowego. Analiza biochemiczna fuzji *psi-lac* wykazała, że oprócz wspólnej regulacji przez fosforan, promotory *psi* podlegają w różnym stopniu kontroli wywoływanej przez różne czynniki takie jak: głodzenie azotowe, ograniczony dostęp źródła węgla lub naświetlanie UV (40).

Podobne podejście zastosowano do identyfikacji genów, których ekspresja zależy od obecności tlenu (41). Wykazano w chromosomie *S. typhimurium* obecność 10 genów *oxd* (ang. *oxygen dependent*). Ekspresja wszystkich fuzji *oxd-lac* jest podwyższona w warunkach beztlenowych i podlega wspólnej regulacji przez niezidentyfikowane produkty genów *oxrA* i *oxrB*. Geny te określają globalny regulon, którego aktywność jest reprimowana przez tlen.

Odpowiedzią komórki na działanie czynników uszkadzających DNA lub zaburzających jego replikację jest indukcja systemu SOS. Stosując faga Mu dl(Ap *lac*) poszukiwano w chromosomie *E. coli* genów, których ekspresja wzrasta pod wpływem czynników uszkadzających DNA takich jak mitomycyna D lub promieniowanie UV. Zidentyfikowano 5 loci genowych *din* (ang. *damage inducible*), których ekspresja podlega regulacji przez system SOS (42). Ekspresja fuzji *din-lac* jest zależna od genów *recA* i *lexA*, których produkty regulują plejotropowe funkcje systemu SOS. Sugeruje się, że być może geny *din* kodują produkty odpowiedzialne za działanie systemu SOS.

Jak widać zastosowanie faga Mu d1(Ap lac) umożliwia nie tylko wykrycie nowych genów ale również poznanie elementów specyficznej regulacji poszczególnych zidentyfikowanych genów.

## VII. Transdukujący fag $\lambda$ niosący fuzję lac — otrzymywanie i zastosowania

W celu otrzymywania fuzji lac *in vivo* często używa się specjalnie skonstruowanych fagów  $\lambda$  na przykład  $\lambda$  p1(209) i  $\lambda$  placMu niosących nieaktywny operon lac oraz fragment DNA pochodzący z faga Mu. W rozdziale III-1 omówiono właściwości tych fagów. W wyniku wbudowania takiego faga  $\lambda$  do genomu bakteryjnego powstaje lizogen, w którego chromosomie fagowe DNA znajduje się w bliskim sąsiedztwie fuzji lac (Ryc. 2). Pod wpływem czynnika indukującego np. naświetlania UV, następuje wycięcie profaga z chromosomu. Ponieważ wycięcie DNA faga zachodzi w wyniku nieuprawnionej rekombinacji (ang. *illigitimate recombination*) powstają cząstki fagowe niosące różne fragmenty przyległego materiału genetycznego. W mieszanej populacji fagów można łatwo, stosując odpowiednie metody selekcji, zidentyfikować transdukujące fagi  $\lambda$  niosące fuzję lac. Często fuzje lac otrzymuje się przez użycie faga Mu d1(Ap lac). Opracowano schemat przenoszenia tych fuzji na faga  $\lambda$  (43). Fuzje lac otrzymane *in vitro* na wektorach plazmidowych mogą być przeniesione w drodze klonowania na odpowiednie wektory fagowe takie jak  $\lambda$  D69 czy  $\lambda$  Damsr113 (4). Metodami *in vitro* można otrzymywać fuzje lac na wspomnianym poprzednio wektorze fagowym  $\lambda$ NK1955.

Transdukującego faga  $\lambda$  niosącego fuzję lac można w różny sposób wykorzystać w badaniach genetycznych. Fag  $\lambda$  jest z łatwością przenoszony z jednego szczepu do drugiego, co umożliwia zbadanie wpływu różnych mutacji chromosomowych na ekspresję badanej fuzji występującej na fagu. Użycie różnych mutagenów lub szczepu mutatorowego prowadzi do powstania mutacji w obrębie fuzji *genX-lac* występującej na fagu  $\lambda$ . Mutacje te można z łatwością wprowadzić do genomu bakterii a z kolei mutacje chromosomowe można wprowadzić do DNA faga. Mutacje te wykorzystuje się do analizy genetycznej badanego genu X.

Opisano metody wykorzystania transdukującego faga  $\lambda$  niosącego fuzję lac do otrzymywania delecji (44) oraz do konstrukcji szczegółowych map genetycznych (45, 46). Jest on często stosowany do ustalenia kierunku transkrypcji badanego genu (47, 48).

DNA transdukującego faga  $\lambda$  niosącego fuzję *genX-lac* można użyć jako matrycę do syntezy  $\beta$ -galaktozydazy w układzie bezkomórkowym. Ilość syntetyzowanej *in vitro*  $\beta$ -galaktozydazy jest miarą aktywności promotora X. Ponadto, w takim układzie na przykład typu Zubay'a bada się wpływ różnych czynników na ekspresję fuzji *genX-lac*. Badania te

umożliwiają wykrycie specyficznych dla genuX elementów regulacyjnych (49, 50, 51).

DNA transdukującego faga  $\lambda$  niosącego fuzję *lac* można też używać do badań na poziomie molekularnym. Fragmenty DNA zawierające region promotorowo-regulatorowy badanego genu można przenieść w drodze klonowania na odpowiednie wektory i poddać analizie sekwencyjnej. Mogą też służyć do konstrukcji *in vitro* nowych fuzji *lac* umożliwiających określenie miejsc w DNA odpowiedzialnych za dany typ regulacji. W ten sposób określono determinanty DNA odpowiedzialne za regulację syntezy rRNA u *E. coli*. (52).

## VIII. Zastosowanie fuzji *lac* do analizy struktury i funkcji białek

### VIII-1. Identyfikacja, oczyszczanie i charakterystyka produktu badanego genu

Fuzje genowe *lac* wykorzystuje się często do identyfikacji i oczyszczania białek trudno wykrywalnych przy pomocy konwencjonalnych metod. Zgodnie z definicją, produktem fuzji genowej *lac* jest białko hybrydowe, które zawiera amino-terminalny fragment badanego białka kowalencyjnie przyłączony do funkcjonalnego karboksy-terminalnego fragmentu  $\beta$ -galaktozydazy. Amino-terminalny fragment białka jest więc wyznakowany przez aktywną enzymatycznie  $\beta$ -galaktozydazę (Ryc. 1). Fizyczne właściwości  $\beta$ -galaktozydazy oraz prosta metoda detekcji aktywności tego enzymu są następnie wykorzystane do wykrywania, izolowania i oczyszczania białka hybrydowego. W przypadku niektórych fuzji hybryd białkowy może zawierać całą cząsteczkę badanego białka kowalencyjnie połączoną z funkcjonalnym karboksy-terminalnym fragmentem  $\beta$ -galaktozydazy. Są to tzw. bifunkcjonalne hybrydy białkowe (53, 54).

Hybrydy białkowe LacZ, jako cząsteczki o masie powyżej 100 000 można łatwo wykrywać wśród innych białek komórkowych stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w obecności detergentu. Do wykrycia hybrydu w mieszaninie wielu białek można stosować handlowe preparaty przeciwciał wytworzone przeciw białku  $\beta$ -galaktozydazy.

Do oczyszczania hybrydów białkowych wykazujących aktywność  $\beta$ -galaktozydazy stosuje się chromatografię na „sitach molekularnych” rozdzielających cząsteczki w zależności od ich wielkości (55) lub chromatografię powinowactwa (56).

Oczyszczone białko hybrydowe można użyć jako antygen do produkcji surowicy zawierającej przeciwciała swoiste wobec amino-terminalnego fragmentu. Te przeciwciała wykorzystuje się następnie do identyfikacji i oczyszczania całej cząsteczki białka. W ten sposób zidentyfikowano i oczyszczono jedno z białek biorących udział w transporcie maltozy, pro-

dukt genu *malF* (55). Przedstawiona metoda, w połączeniu z użyciem wektorów Orf umożliwiających konstrukcję fuzji *lac* u różnych organizmów, może być zastosowana do otrzymywania swoistych przeciwciał dla dowolnych białek pochodzących z różnych źródeł.

Fuzje *lac* są pomocne przy oczyszczaniu białek niestabilnych lub szybko degradowanych. Opracowano metodę oczyszczania takich białek przy pomocy umiejscowionej proteolizy (57). Polega ona na wbudowaniu fragmentu DNA, zawierającego sekwencje kodujące dane białko, do specjalnego wektora Orf. Stosowany wektor Orf jest podobny do opisanych w rozdziale IV z tą różnicą, że w otwartej fazie odczytywania kodu zawiera sekwencje kodujące kolagen. Otrzymana w tym wektorze fuzja genowa będzie więc zawierała sekwencje specyficzne dla kolagenu, pomiędzy sekwencjami kodującymi dane białko a genem *lacZ*. Produktem tak skonstruowanej fuzji genowej jest trybryd białkowy, w którym  $\beta$ -galaktozydaza stabilizuje badane białko. Po trawieniu oczyszczonego trybrydu kolagenazą otrzymuje się oczyszczone białko badane. Opracowano alternatywną metodę z użyciem innych wektorów Orf, w której wykorzystuje się zjawisko tworzenia przez hybrydy białkowe agregatów w cytoplazmie komórki (58).

Niektóre białka, na przykład produkty genów regulatorowych, powstają w komórce w bardzo małych ilościach. Dysponując fuzją genu *lacZ* i genu kodującego białko regulatorowe oraz stosując odpowiednie metody selekcji można otrzymać mutanty syntetyzujące hybryd białkowy w zwiększonych ilościach. Mutanty te wykorzystuje się do oczyszczania białka hybrydowego. Natomiast wprowadzenie do szczepu dzikiego fragmentu DNA zawierającego mutację spowoduje nadprodukcję całej cząsteczki badanego białka, które dzięki temu można wyizolować.

#### VIII-2. Badanie transportu białek

W fuzjach genowych gen *lacZ* można przyłączyć do różnej długości odcinków DNA kodujących fragmenty badanego białka. Prowadzi to do otrzymania serii fuzji, których produkty będą różnić się wielkością aminoterminalnego fragmentu badanego białka tworzącego hybryd z  $\beta$ -galaktozydazą. Białko LacZ stabilizuje te fragmenty i umożliwia ich oczyszczenie. Oczyszczone hybrydy, zawierające różnej wielkości fragmenty badanego białka, używa się do identyfikacji funkcjonalnych części (ang. *domain*) tego białka. Ustalając, w których hybrydach białkowych zachowana jest, na przykład, zdolność wiązania się ze specyficznym DNA lub zdolność interakcji białko-białko można stwierdzić, które miejsca w białku są odpowiedzialne za te funkcje (59, 60).

W podobny sposób, hybrydy LacZ z fragmentami białek błonowych, wykorzystano w badaniach nad mechanizmami ich transportu z cytoplazmy do błony. Wyniki tych badań wykazały, że informacja o transporcie

białek jest zawarta wewnątrz sekwencji kodujących strukturę białka a ściślej w amino-terminalnym fragmencie, nazwanym sekwencją sygnałową. Przy użyciu fuzji genowych *lac* prowadzi się badania nad zlokalizowanym w zewnętrznej błonie komórkowej białkiem LamB stanowiącym bakteryjny receptor faga  $\lambda$ . Analiza fuzji *lamB-lacZ* wykazała, że poza sekwencją sygnałową, region wewnątrz genu *lamB* kodujący aminokwasy od 15-go do 70-tego jest odpowiedzialny za transport białka LamB z cytoplazmy i wbudowywanie go do błony komórkowej (61, 62). Inny fragment genu *lamB* jest odpowiedzialny za efektywność transportu tego białka do błony (63).

Metody selekcjonowania mutantów w fuzjach *lac* wykorzystano do otrzymania różnych mutantów wykazujących zaburzenia w transporcie białek. Charakterystyka mutacji w sekwencjach sygnałowych i w genie struktury, kodującym transportowane białko pozwoliła na określenie pozycji i funkcji sygnałów informacyjnych wewnątrz transportowanego białka. Analiza plejotropowych mutantów niezdolnych do transportu białek doprowadziła do identyfikacji kilku nowych genów, których produkty oddziałują z sekwencją sygnałową podczas procesu transportu białek. Geny te (*prlA*, *prlB*, *prlC*, *secA*, *secB*) kodują składniki komórkowej maszyny transportującej białka. Ponadto, dzięki użyciu fuzji *lac* uzyskano dane wskazujące, że u bakterii podobnie jak i w komórkach eukariotycznych, działa mechanizm sprzęgający transport z syntezą białek. Czytelnika zainteresowanego mechanizmami transportu białek i różnymi aspektami zastosowania fuzji *lac* do badania tego procesu odsyłam do artykułu przeglądowego na ten temat (64).

## IX. Fuzje *lac* w komórkach eukariotycznych

Technika fuzji *lac* znalazła również szerokie zastosowanie w badaniach ekspresji genów eukariotycznych. Opisane w rozdziale IV wektory Orf służą do konstrukcji fuzji *lac* z heterologicznymi genami oraz do badania ekspresji tych genów w komórkach *E. coli*. Skonstruowano kilka wektorów plazmidowych przystosowanych do otrzymania fuzji *lac* z genami pochodzącymi z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (12). W kilku laboratoriach stosuje się fuzje *lac* do badania regulacji ekspresji genów *S. cerevisiae* (73, 74). Przy pomocy fuzji *CYC1-lacZ* zidentyfikowano, położone proksymalnie w stosunku do promotora, miejsca aktywacji potrzebne dla ekspresji tego genu (75). Wprowadzając do fuzji *CYC1-lacZ* intron z genu *rp51*, kodującego białko rybosomalne, otrzymano system, w którym przez pomiar aktywności  $\beta$ -galaktozydazy bada się dojrzewanie mRNA oraz wpływ różnych mutacji na ten proces (76).

Hybrydy białkowe stanowiące produkt fuzji genowych *lac* wykorzystuje się w badaniach nad lokalizacją białek u drożdży. Badania ja-



drowych białek hybrydowych MAT2-LacZ i GAL4-LacZ wskazują, że w białkach tych występuje wspólna, krótka sekwencja aminokwasów odpowiedzialna za ich transport z cytoplazmy do jądra (77, 78). Stosując fuzje *lac* badano również determinanty odpowiedzialne za transport białek do mitochondriów (79) i do wakuoli (80).

Fuzje *lac* otrzymano u *Drosophila melanogaster* (81). Do genu *lacZ* przyłączono gen *hsp70* kodujący białko szoku cieplnego. U muszki owocowej zawierającej fuzję *hsp70-lacZ*,  $\beta$ -galaktozydaza działa jak białko szoku cieplnego i może być wykryta poprzez pomiar aktywności enzymu w różnych tkankach lub przez barwienie preparatów tkankowych przy pomocy Xgal. Autorzy wskazują na możliwość stosowania fuzji *lac* u *Drosophila* do badania regulacji ekspresji genów, specyficzności tkankowej i różnicowania tkankowego (81). Badając fuzje *hsp70-lacZ* i *hsp84-lacZ* określono determinanty DNA odpowiedzialne za indukcję syntezy niektórych białek szoku cieplnego u *Drosophila* (82).

## X. Fuzje z innymi niż *lac* genami detektorowymi

W niniejszym artykule omówiono otrzymywanie i różne zastosowania fuzji *lac*. Są to fuzje najczęściej i powszechnie stosowane. Opisano konstrukcję i możliwość użycia fuzji, w których występują inne niż *lac* geny detektorowe. Są to geny *galK* (kodujący galaktokinazę) (65), *cat* (kodujący acetylotransferazę chloramfenikolu) (66, 67), *malQ* (kodujący amyloamylazę) (68), *npt* (kodujący fosfotransferazę neomycyny) (69), *phoA* (kodujący alkaliczną fosfatazę) (70).

Sygnały inicjacyjne i terminacyjne rozpoznawane przez polimerazę *E. coli* można badać stosując fuzje regionu regulatorowego badanego genu X z genem struktury *galK*. Do otrzymywania takich fuzji służą wektory plazmidowe pKO—1 i pKG1800 (65). Są to pochodne pBR322, które niosą gen *galK* poprzedzony odcinkiem „leadera” oraz miejscami specyficznymi rozpoznawanymi przez endonukleazy restrykcyjne *Hind*III i *Sma*I. W te miejsca wbudowuje się fragmenty DNA zawierające specyficzne sekwencje regulatorowe rozpoznawane przez polimerazę. Plazmid pKG1800 umożliwia klonowanie i rozpoznawanie miejsc terminacji transkrypcji. Wbudowanie fragmentu DNA zawierającego terminator transkrypcji powoduje obniżenie ekspresji genu *galK*, a poziom do którego badany terminator obniża ekspresję *galK* jest miarą wydajności terminacji. Fuzje miejsc terminacyjnych z genem *galK* można użyć do selekcjonowania i analizy mutantów o zmienionej aktywności terminatora.

W drożdżach otrzymano fuzje genu *CYC1* z genem *galK* pochodzącym z *E. coli* i z powodzeniem badano ich ekspresję (71). Wektor pSVK, zawiera fuzję genu *galK* z wczesnym promotorem wirusa SV40. Po wprowadzeniu wektora pSVK do linii komórkowych małpy, myszy i chomika

otrzymano wydajną ekspresję genu *galK*. Wektor ten może służyć do badania sygnałów regulacyjnych dla genów eukariotycznych (72). Fuzje z genem *phoA* używane są w badaniach nad sekrecją białek. Fuzje z genem *cat* wykorzystano do badania elementów regulacyjnych pochodzących z *Bacillus subtilis* i innych bakterii gram-dodatnich (66).

## XI. Uwagi końcowe

Technika fuzji genów jest szeroko stosowana w różnych dziedzinach biologii molekularnej, a połączenie tej techniki z metodami inżynierii genetycznej stworzyło wiele nowych możliwości badawczych. Fuzja otrzymana *in vivo* może być przeniesiona w drodze klonowania do wektora plazmidowego a wiele wektorów służy do konstrukcji fuzji *lac* bezpośrednio na plazmidzie. Analiza fragmentów DNA zawartych w fuzjach umożliwia zbadanie regionu regulatorowego badanego genu oraz poznanie, na poziomie molekularnym, natury i funkcji specyficznych sygnałów regulacyjnych. Fragmenty DNA niosące fuzje *genX-lacZ* mogą służyć do ustalenia sekwencji nukleotydów w kodujących odcinkach 5' genu X a sklonowany odcinek 5' genu X, występujący w fuzji, może być użyty jako sonda hybrydyzacyjna do identyfikacji w banku genów całego genu. Ponieważ dostępne są już wektory umożliwiające otrzymywanie fuzji *lac* z fragmentami DNA pochodzącymi z różnych organizmów, wydaje się, że tego typu badania przy zastosowaniu fuzji będą możliwe również dla komórek eukariotycznych.

Fuzje *lac* są również stosowane do identyfikacji i oczyszczania produktów genowych. Oczyszczone hybrydy białkowe używane są do otrzymywania specyficznych przeciwciał. Zastosowanie wektorów Orf do konstrukcji fuzji *lac* z heterologicznymi fragmentami DNA stwarza możliwość otrzymywania swoistych przeciwciał dla dowolnych białek. Ten aspekt wykorzystania fuzji *lac* wydaje się bardzo obiecujący i być może fuzje *lac* będą używane do otrzymywania szczepionek. Wykazano, że hybryd glikoproteiny D (gD) wirusa *Herpes simplex* z  $\beta$ -galaktozydazą jest czynny immunologicznie a przeciwciała anty-gD- $\beta$ -galaktozydaza neutralizują infekcyjność wirusa *in vitro* (86). Stwierdzono, że hybrydy białkowe typu antygen- $\beta$ -galaktozydaza łączą się ze swoistymi przeciwciałami i mogą być łatwo wykrywane przez histochemiczne barwienie przy pomocy Xgal (87). Zidentyfikowane w ten sposób polipeptydy o aktywności antygenowej można będzie syntetyzować chemicznie i użyć jako szczepionki.

Autorka wyraża serdeczne podziękowanie Pani prof. dr hab. M. D. Hulanickiej za cenne uwagi dotyczące tekstu niniejszego artykułu.

Opracowanie wykonano w ramach tematu finansowanego przez Polską Akademię Nauk problem CPBR 3.13.2.1.2.

Zaakceptowano do druku 15 kwietnia 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Jacob F., Monod J., (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 318—356.
2. Jacob F., Ullmann A., Monod J., (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 704—719.
3. Mitchell D., Reznikoff W., Beckwith J., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 331—350.
4. Silhavy T. J., Berman M. L., Enquist L. W., (1984), w: *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
5. Casadaban M. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 541—555.
6. Casadaban M. J., Cohen S. N., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4530—4533.
7. Casadaban M. J., Chou J., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 535—539.
8. Bremer E., Silhavy T. J., Weisemann J. M., Weinstock G. M., (1984), *J. Bacteriol.*, **158**, 1084—1093.
9. Bremer E., Silhavy T. J., Weinstock G. M., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 1092—1099.
10. Youngman P., Zuber P., Perkins J. B., Sandman K., Igo M., Losick R., (1985), *Science*, **228**, 285—291.
11. Kroos L., Kaiser D., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 5816—5820.
12. Casadaban M. J., Martinez-Arias A., Shapira S. K., Chou J., (1983) w: *Methods in Enzymology*, red. Wu R., Grossman L., Moldave K., t. 100, str. 293—308: Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto.
13. Weinstock G. M., apRhys C., Berman M. L., Hampar B., Jackson D., Silhavy T. J., Weisemann J., Zweig M., (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 4432—4436.
14. Miller J. H., (1972), w: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
15. Sallis L., Hasebeck R. J., Nunn W. D., (1983), *J. Bacteriol.*, **155**, 1450—1454.
16. Berman M., Beckwith J., (1979), *J. Mol. Biol.*, **130**, 305—315.
17. Weisemann J. M., Weinstock G. M., (1985), *J. Bacteriol.*, **163**, 748—755.
18. Taylor R. K., Garrett S., Sodergren E., Silhavy T. J., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 1054—1060.
19. Levine R. A., Taylor M. W., (1982), *J. Bacteriol.*, **149**, 1041—1049.
20. Wolfe S. A., Smith J. M., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 822—825.
21. Tiedeman A. A., Smith J. M., (1984), *J. Bacteriol.*, **195**, 77—82.
22. Chou J., Casadaban M. J., Lemaux P. G., Cohen S. N., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4020—4024.
23. Bedouelle H., (1983), *J. Mol. Biol.*, **170**, 861—882.
24. Gutierrez C., Raiboud O., (1984), *J. Mol. Biol.*, **177**, 69—86.
25. Mulligan J. T., Margolin W., Kreuger J. H., Walker G. C., (1982), *J. Bacteriol.*, **151**, 609—619.
26. Dixon R., Eady R. R., Espin G., Hill S., Iaccarino M., Kahn D., Merrick M., (1980), *Nature*, **286**, 128—132.

27. Komeda Y., (1982), *J. Bacteriol.*, **150**, 16—26.
28. Casadaban M., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 557—566.
29. Jagura-Burdzy G., Hulanicka D., (1981), *J. Bacteriol.*, **147**, 744—751.
30. McFall E., Heincz M. C., (1983), *J. Bacteriol.*, **153**, 872—877.
31. Camakaris H., Pittard J., (1982), *J. Bacteriol.*, **150**, 70—75.
32. Ritzenthaler P., Mata-Gilsiger M., (1983), *Molec. Gen. Genet.*, **189**, 351—354.
33. Stragier P., Richaud F., Borne F., Patte J. C., (1983), *J. Mol. Biol.*, **168**, 307—320.
34. Shinagawa H., Makino K., Nakata A., (1983), *J. Mol. Biol.*, **168**, 477—488.
35. Drummond M., Clements J., Merrick M., Dixon R., (1983), *Nature*, **301**, 302—307.
36. Chapon C., (1982), *J. Bacteriol.*, **150**, 722—729.
37. Debarbouille M., Schwartz M., (1979), *J. Mol. Biol.*, **132**, 521—534.
38. Miyada C. G., Stoltzfus L., Wilcox G., (1984), *Proc. Nat. Acad. USA*, **81**, 4120—4124.
39. Taylor R. K., Hall N., Enquist L., Silhavy T. J., (1981), *J. Bacteriol.*, **147**, 255—258.
40. Wanner B. L., McSharry R., (1982), *J. Mol. Biol.*, **158**, 347—363.
41. Strauch K. L., Botti Lenk J., Gamble B. L., Miller C. G., (1985), *J. Bacteriol.*, **161**, 673—680.
42. Kenyon C. J., Walker G. C., (1980), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 2819—2823.
43. Komeda Y., Iino T., (1979), *J. Bacteriol.*, **139**, 721—729.
44. Garrett S., Taylor R. K., Silhavy T. J., Berman M. L., (1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 840—844.
45. Saint-Girons I., Margarita D., (1979), *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 101—107.
46. Sarthy A., Michaelis S., Beckwith J., (1981), *J. Bacteriol.*, **145**, 288—292.
47. Wild J., Obrepalska B., (1982), *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 405—410.
48. Smith J. M., Gots J. S., (1980), *J. Bacteriol.*, **143**, 1156—1164.
49. Wild J., Smith J. M., Umbarger H. E., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 786—883.
50. Kelker N., Eckhardt T., (1977), *J. Bacteriol.*, **132**, 67—72.
51. Watson M. D., Wild J., Umbarger H. E., (1979), *J. Bacteriol.*, **139**, 1014—1020.
52. Gourse R. L., de Boer H. A., Nomura M., (1986), *Cell*, **44**, 197—205.
53. Germino J., Bastia D., (1983), *Cell*, **32**, 131—140.
54. Shuman H. A., Silhavy T. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 560—562.
55. Shuman H. A., Silhavy T. J., Beckwith J. R., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 168—174.
56. Ullman A., (1984), *Gene*, **29**, 27—31.
57. Germino J., Bastia D., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 4692—4696.
58. Watson R. J., Weis J. H., Salstrom J. S., Enquist L. W., (1984), *J. Invest. Dermatol.*, **88**, 102—111.
59. Germino J., Bastia D., (1983), *Cell*, **34**, 125—134.
60. Zabin I., (1982), *Mol. Cell. Biochem.*, **49**, 87—96.
61. Hall M. M., Schwartz M., Silhavy T. J., (1982), *J. Mol. Biol.*, **156**, 93—112.
62. Benson S. A., Silhavy T. J., (1983), *Cell*, **32**, 1325—1335.
63. Benson S. A., Silhavy T. J., (1983), w: *Gene Function in Prokaryotes*,

- red. Beckwith J., Davies J., Gallant J. A., str. 253—280: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
64. Silhavy T. J., Benson S. A., Emr S. D., (1983), *Microbiol. Rev.*, **47**, 313—344.
  65. McKenney K., Shimatake H., Court D., Schmeissner U., Brady C., Rosenberg M., (1981), w: Gene Amplification and Analysis, red. Chirikjian J., Papas T., t. 2, str. 383—415: New York: Elsevier North Holland.
  66. Goldfarb D. S., Doi R. H., Rodriguez R., (1981), *Nature*, **293**, 309—311.
  67. Guan C. D., Wanner B., Inouye H., (1983), *J. Bacteriol.*, **156**, 710—717.
  68. Raibaud O., Mock M., Schwartz M., (1984), *Gene*, **29**, 231—241.
  69. Van den Broeck G., Timko M. P., Kausch A. P., Cashmore A. R., Van Montagu M., Herrera-Estrella L., (1985), *Nature*, **313**, 358—363.
  70. Hoffman C., Wright A., (1985), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **82**, 5107—5111.
  71. Rymond B. R., Zitomer R. S., Schumperli D., Rosenberg M., (1983), *Gene*, **25**, 249—262.
  72. Schumperli D., Howard B. H., Rosenberg M., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **79**, 257—261.
  73. Rose M., Casadaban M. Botstein D., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 2460—2464.
  74. Guarente L., Ptashne M., (1981), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **78**, 2199—2203.
  75. Guarente L., Mason T., (1983), *Cell*, **32**, 1279—1286.
  76. Teem J. L., Rosbash M., (1983), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **80**, 4403—4407.
  77. Hall M. N., Hereford L., Herskowitz I., (1984), *Cell*, **36**, 1057—1065.
  78. Silver P. A., Keegan L. P., Ptashne M., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 5951—5955.
  79. Douglas M. G., Geller B. L., Emr S. D., (1984), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 3983—3987.
  80. Schauer I., Emr S., Gross C., Schekman R., (1985), *J. Cell Biol.*, **100**, 1664—1675.
  81. Lis J. T., Simon J. A., Sutton C. A., (1983), *Cell*, **35**, 403—410.
  82. Lawson R., Mestrlil R., Schiller P., Voellmy R., (1984), *Mol. Gen. Genet.*, **198**, 116—124.
  83. Silhavy T. J., Beckwith J. R., (1985), *Microbiol. Rev.*, **49**, 398—418.
  84. Beny A., Boyen A., Charlier D., Lissens W., Feller A., Glansdorf N., (1982), *J. Bacteriol.*, **151**, 62—67.
  85. Krueger J. H., Walker G. C., (1983), w: Methods in Enzymology, red. W. R. Grossman L. Moldave K., t. 100, str. 501—509: Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, San Francisco, Sao Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto.
  86. Weis J. H., Enquist L. W., Salstrom J. S., Watson R. J., (1983), *Nature*, **302**, 72—74.
  87. Koenen M., Rütter U., Müller-Hill B., (1982), *EMBO J.*, **1**, 509—512.



ANNA KURDOWSKA \*

## Struktura, zmiany konformacyjne i funkcja $\alpha_2$ -makroglobuliny

Structure, conformational alterations  
and role of  $\alpha_2$ -macroglobulin

### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Budowa cząsteczki  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- III. Własności inhibitorowe  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- IV. Wiązania tioestrowe w cząsteczce  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- V. Miejsce wiążące proteiny w cząsteczce  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- VI. Zmiany konformacyjne w cząsteczce  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- VII. Komórkowe receptory  $\alpha_2$ -makroglobuliny
- VIII. Rola fizjologiczna  $\alpha_2$ -makroglobuliny

### Contents

- I. Introduction
- II. Structure of the  $\alpha_2$ -macroglobulin molecule
- III. Inhibitory properties of  $\alpha_2$ -macroglobulin
- IV. Thiolester bonds in the  $\alpha_2$ -macroglobulin molecule
- V. Proteinases binding sites in the  $\alpha_2$ -macroglobulin
- VI. Conformational alterations of the  $\alpha_2$ -macroglobulin molecule
- VII. Cell receptors for  $\alpha_2$ -macroglobulin
- VIII. Physiological role of  $\alpha_2$ -macroglobulin

### I. Wstęp

Ludzka  $\alpha_2$ -makroglobulina ( $\alpha_2$ M) jest glikoproteiną osocza. Zawartość  $\alpha_2$ M w osoczu zależy od wieku i płci, i waha się w granicach 2—4 mg/ml. Jej obecność stwierdzono również w limfie i innych płynach zewnątrz-

---

\* Dr, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, al. Mickiewicza 3, 31—120 Kraków.

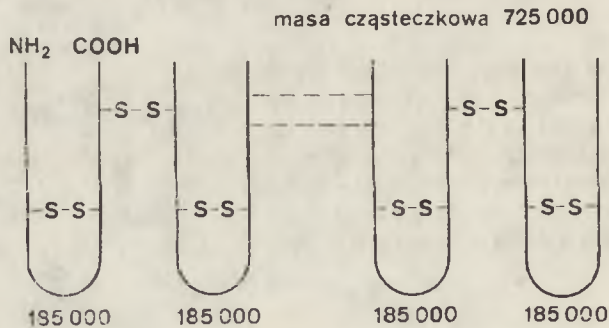
Wykaz stosowanych skrótów:  $\alpha_2$ M —  $\alpha_2$ -makroglobulina, SDS — siarczan do-decyłu sodu.

naczyniowych (1). Względna masa cząsteczkowa tego białka wyznaczona metodą ultrawierowania wynosi 725 000 (2—4).

Znaczna stabilność  $\alpha_2M$  w środowisku o pH przyjmującym wartości od 5,0 do 8,4 oraz duża masa cząsteczkowa ułatwiają uzyskanie wysoce oczyszczonego preparatu tego białka. Do najczęściej stosowanych metod izolowania  $\alpha_2M$  należą: wytrącanie glikolem polietylenowym, sączenie molekularne, chromatografia powinowactwa lub chromatografia adsorpcyjna (6—9). W ten sposób zostały wyizolowane  $\alpha_2M$  z osocza wielu ssaków: psa (10), królika (11—13), myszy (14, 15), świni (16, 17), konia (18—21), szczura (22), krowy (23), wołu (24), jeża (25).

## II. Budowa cząsteczki $\alpha_2$ -makroglobuliny

$\alpha_2M$  zbudowana jest z czterech podjednostek, o masie cząsteczkowej 185 000, połączonych w pary za pomocą wiązań dwusiarczkowych i tworzących tetramer dzięki niekowalencyjnym oddziaływaniom między tymi parami (26). Tetramer taki może rozpaść się na dimery pod wpływem mocznika (2), w środowisku o  $pH < 4$  lub  $> 9$  (27) oraz pod działaniem siarczuanu dodecylu sodu w warunkach nieredukujących (28). Dimery z kolei ulegają rozbiciu do monomerów pod wpływem czynników redukujących mostki dwusiarczkowe (28).



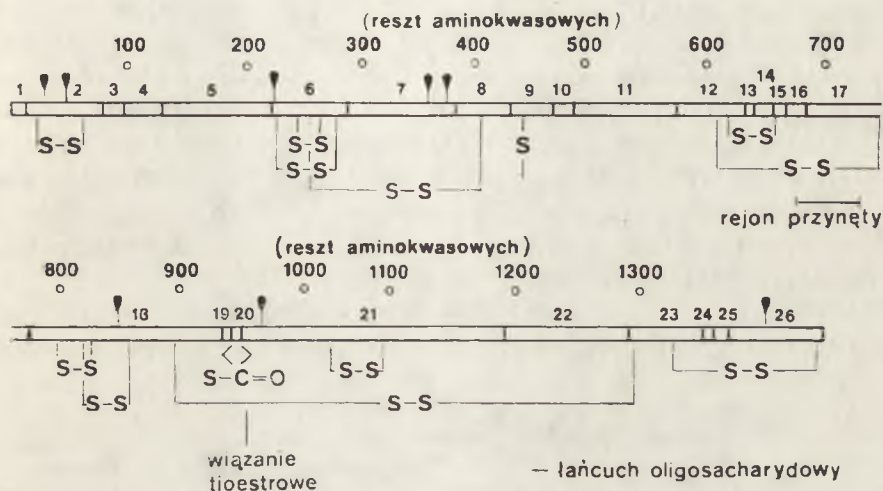
Ryc. 1. Struktura  $\alpha_2$ -makroglobuliny wg (1).

Cztery podjednostki o masach cząsteczkowych 185 000 daltonów połączone w pary za pomocą wiązań dwusiarczkowych (—S—S—) tworzą tramer dzięki istnieniu oddziaływań niekowalencyjnych.

Struktura pierwszorzędowa ludzkiej  $\alpha_2M$  jest dokładnie poznana. Każda z czterech identycznych podjednostek składa się z 1451 aminokwasów, przy czym 41% wszystkich reszt aminokwasowych stanowią reszty waliny, leucyny, seryny, kwasu glutaminowego i treoniny.  $\alpha_2M$  zawiera niewiele cysteiny i tryptofanu w porównaniu z innymi białkami (od-



powiednio 24 i 11 reszt w każdej podjednostce). Na każdą podjednostkę przypada ponadto 11 mostków dwusiarczkowych, których położenie zostało dokładnie określone. Stwierdzono również, że w cząsteczce  $\alpha_2M$  występują odcinki złożone z około 10 reszt aminokwasowych o charakterze hydrofilowym lub hydrofobowym. Analiza składu aminokwasowego  $\alpha_2M$  nie wykazała obecności istotnych homologii wewnętrznych w obrębie jej cząsteczki co jest nietypowe dla białka o tak dużej masie cząsteczkowej (29).



Ryc. 2. Podjednostka  $\alpha_2$ -makroglobuliny wg (28).

—S—S— mostek dwusiarczkowy. Pionowe kreski oznaczają miejsca działania CNBr, w wyniku czego uzyskano szereg fragmentów łańcucha polipeptydowego (1,2,3,4...)

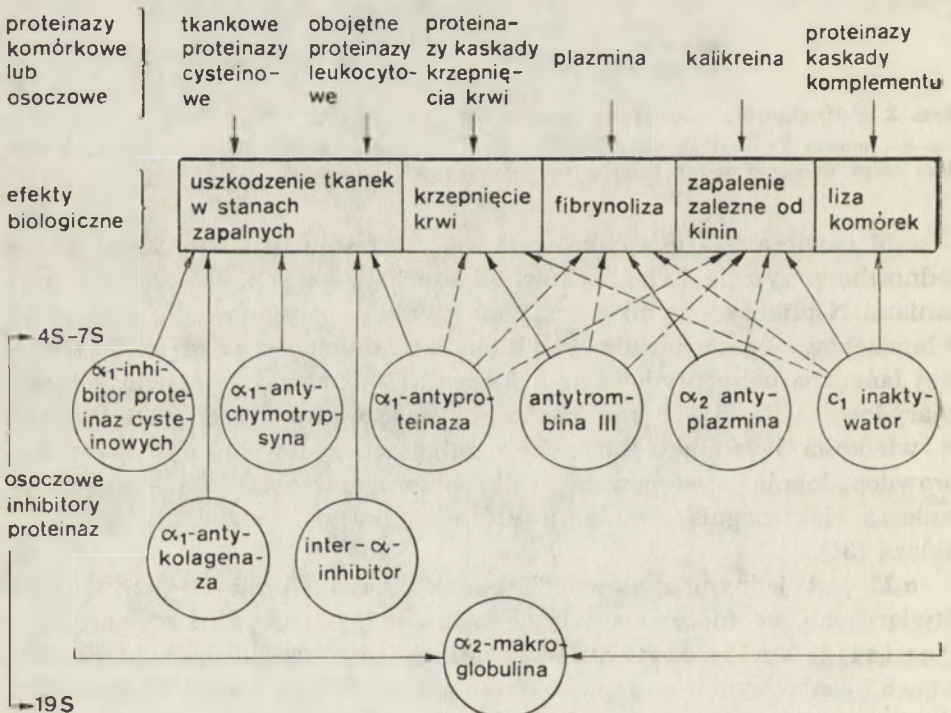
$\alpha_2M$  zawiera 9—10% cukrów (4, 30). Ostatnio ustalono, że na każdą jednostkę przypada 8 łańcuchów oligosacharydowych połączonych wiązaniami N-glikozydowymi z resztami kwasu asparaginowego, przy czym 5 łańcuchów oligosacharydowych zlokalizowanych jest w części N-końcowej łańcucha polipeptydowego, a 3 części C-końcowej. Łańcuchy oligosacharydowe 1, 5, 6 i 8 nie zawierają kwasów sjałowych (29). Różnice w wielkości i ładunku łańcuchów oligosacharydowych  $\alpha_2M$  powodują prawdopodobnie występowanie mikroheterogeniczności ujawniającej się podczas elektroogniskowania, a która zanika po zadziałaniu neuramidazą (31).

$\alpha_2M$  jest jednym z głównych białek osocza wiążących jony metali. Stwierdzono, że może ona wiązać kadm (32, 33), wapń i magnez (34). Parisi i Vallee (1970) wykazali ponadto, że ludzka  $\alpha_2M$  zawiera 3,6—8,7 jonów cynku na mol, co stanowi 320—770  $\mu\text{g}$  na gram białka (35). Cynk ten jest związany w sposób bardzo trwały w ośmiu specyficznych miejscach wiążących cząsteczki  $\alpha_2M$  (36).

### III. Własności inhibitorowe $\alpha_2$ -makroglobuliny

$\alpha_2$ M jest jednym z osoczowych inhibitorów proteinaz (3). Wiadomo obecnie, że osocze ludzkie zawiera co najmniej 9 białkowych inhibitorów proteinaz (37, 38):  $\alpha_1$  antyproteinaza,  $\alpha_2$  antyplazmina, antytrombina III,  $\alpha_1$  antychymotrypsyna,  $\alpha_2$  makroglobulina, inhibitor-C1-esterazy, inter- $\alpha$ -antytrypsyna,  $\beta_1$ -antykolagenaza, inhibitor proteinaz cysteinowych, które stanowią około 10% całkowitej zawartości białka w osoczu (38, 39). Ich zasadniczą funkcją jest ochrona organizmu przed niekontrolowaną proteolizą powodowaną przez działanie proteinaz, zarówno pochodzenia zewnątrz- jak i wewnątrz-organizmu. Efektywność z jaką inhibitory mogą regulować aktywność enzymów proteolitycznych zależy od wielu czynników: między innymi od stężenia inhibitora i enzymu, szybkości asocjacji i dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor oraz trwałości kompleksu enzym-inhibitor. Większość białkowych inhibitorów tworzy stabilne kompleksy z proteinazami (w stosunku molowym 1:1). W powstawaniu takich kompleksów biorą udział centrum katalityczne enzymu i centrum reaktywne odpowiedniego inhibitora (26, 37, 38, 40, 41).

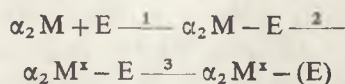
$\alpha_2$ M różni się od innych inhibitorów sposobem wiązania enzymu, a także wyjątkowo małą specyficznością (37, 38). Hamuje ona aktywność endo-



Ryc. 3. Funkcja niektórych osoczowych inhibitorów proteinaz wg (40).

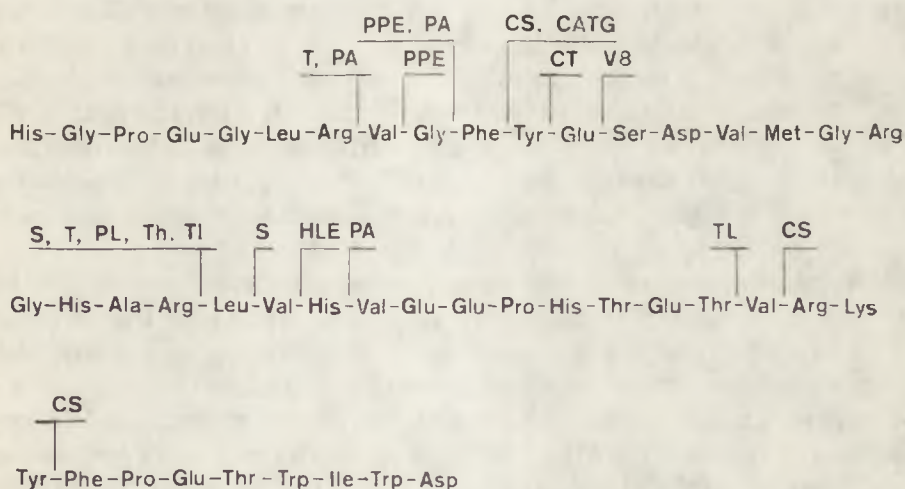
peptydaz należących do wszystkich czterech klas katalitycznych, włączając w to enzymy o bardzo ograniczonej specyficzności substratowej jak np. kalikreina osocza (3, 26), czy kolagenaza kręgowców (42). Poza tym w reakcji wiązania enzymu z tym inhibitorem nie bierze udziału centrum aktywne proteinyazy (41). Enzym związany z cząsteczką  $\alpha_2$ M może nadal oddziaływać z niskocząsteczkowymi substratami czy inhibitorami (26). Wykazano również, że wiązanie proteinyazy z  $\alpha_2$ M jest nieodwracalne (3, 41, 43, 44).

Jako przypuszczalny mechanizm działania  $\alpha_2$ M Barrett (3) zaproponował w 1973 roku hipotezę „pułapki” (ang. *trap hypothesis*), którą można przedstawić za pomocą następującego schematu:



Aktywna endopeptydaza —E rozpoznaje specyficzne dla siebie wiązanie lub wiązania peptydowe w obszarze wiążącym, zwanym „rejonem przynęty” (ang. *bait region*) usytuowanym mniej więcej w środku każdej podjednostki (3, 28, 45). „Rejon przynęty” obejmuje 45 reszt aminokwasowych, w tym 15 rodzajów aminokwasów (46, 47). W tym fragmencie cząsteczki  $\alpha_2$ M występują wiązania peptydowe, które mogą być specyficznie rozpoznawane przez wiele różnych endopeptydaz, co decyduje o uniwersalności  $\alpha_2$ M jako inhibitora (48).

W pierwszym etapie reakcji między  $\alpha_2$ M i proteinyzą tworzy się luźny kompleks /1/ (3, 7). Następnie specyficzne dla enzymu wiązanie w ob-



Ryc. 4. Rejon „przynęty” w obrębie ludzkiej  $\alpha_2$ -makroglobuliny wg (47).

Strzałkami zaznaczono miejsca (wiązania peptydowe) rozkładane przez T-trypsynę wołową, PA-papainę, PPE-elastazę trzustkową, CS-chymozynę wołową, CATG-katepsynę ludzką, CT-chymotrypsynę wołową, V8-proteinyzę V8 (*Staphylococcus aureus*), PL-plazminę ludzką, Th-trombinę wołową, TL-termolizynę, S-subtylizynę, HLE-elastazę leukocytów ludzkich.

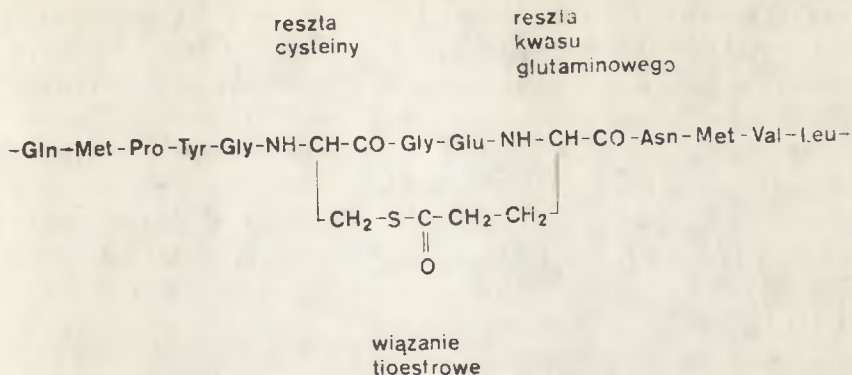
rębie cząsteczki  $\alpha_2M$  ulega rozwiązaniu /etap 2/ (7, 28, 49, 50), co powoduje szybką zmianę konformacyjną inhibitora (7, 51, 52). W wyniku tej zmiany enzym zostaje uwięziony wewnątrz cząsteczki  $\alpha_2M$  /etap 3/, przez co staje się praktycznie niedostępny dla wysokocząsteczkowych białek.  $\alpha_2M$  funkcjonuje więc na zasadzie swobodnego rodzaju „pułapki” (ang. *trap*) nastawionej na chwytywanie proteinaz (53, 54).

Opierając się na charakterystycznych właściwościach inhibitorowych  $\alpha_2M$  szukano podobnego białka u innych kręgowców. Stwierdzono obecność  $\alpha_2M$  u ptaków, płazów i gadów, natomiast u ryb występuje wprawdzie białko o prawie identycznej funkcji, ale o znacznie mniejszej masie cząsteczkowej (360 000). Wykazano również obecność podobnego białka u śluzic i minogów. Na tej podstawie można sądzić, że przekształcenie formy  $\alpha_2M$  o masie cząsteczkowej 360 000 w formę o masie cząsteczkowej 725 000 nastąpiło u bezpośrednich przodków czworonogów, a nie u przodków ryb dwudysznych. Podwojenie masy cząsteczkowej  $\alpha_2M$  zwiększyło prawdopodobnie stabilność kompleksów tworzonych z enzymami (55).

#### IV. Wiązania tioestrowe w cząsteczce $\alpha_2$ -makroglobuliny

Stosunkowo niedawno stwierdzono, że oprócz fizycznego „pułapkowania” (ang. *trapping*) enzymu przez cząsteczkę makroglobuliny, proteinazy mogą tworzyć wiązania kowalencyjne z  $\alpha_2M$  (45, 56—59). Wynioskowano to z obserwacji, że kompleksy enzymu z inhibitorem były stabilne podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS w warunkach redukujących. Jednocześnie okazało się, że rezultatem oddziaływania proteinazy z cząsteczką  $\alpha_2M$  jest nie tylko rozerwanie specyficznego wiązania, ale i także pojawienie się czterech wolnych grup —SH na mol  $\alpha_2M$  (46, 57, 60, 61). Wolne grupy —SH pojawiają się również podczas reakcji  $\alpha_2M$  z metyloaminą, a także innymi czynnikami nukleofilowymi takimi jak: jony amonowe, hydrazyna, hydroksylamina, inne pierwszorzędowe aminy alifatyczne (46, 56, 60—63).

Metyloamina reaguje z inhibitorem w sposób nieodwracalny (56, 58, 63). Po reakcji z metyloaminą w każdej podjednostce  $\alpha_2M$  równocześnie z resztami —SH pojawia się nowa reszta aminokwasowa, a mianowicie  $\gamma$ -glutamylamidu, która powstaje w wyniku wytworzenia wiązania kowalencyjnego między resztą kwasu glutaminowego cząsteczki  $\alpha_2M$  i metyloaminą. Okazało się również, że liczba wolnych grup —SH jest wprost proporcjonalna do ilości związanych cząsteczek metyloaminy. Na tej podstawie wysnuto przypuszczenie, że w każdej podjednostce natywnej  $\alpha_2M$  występuje wiązanie tioestrowe pomiędzy resztą cysteiny i kwasu glutaminowego (46, 56, 57, 60, 62, 63). Wiązania tioestrowe ulegają rozerwaniu podczas reakcji inhibitora z proteinazami i czynnikami o charakterze



Ryc. 5. Wiązanie tioestrowe w podjednostce ludzkiej  $\alpha_2$ -makroglobuliny wg (44).

nukleofilowym czemu towarzyszy zmiana konformacyjna w obrębie części cząsteczki inhibitora (46, 57, 60, 61). Podobne zjawisko obserwuje się w warunkach denaturujących, uwolniona wówczas reszta kwasu glutaminowego ulega cyklizacji do kwasu pyroglutaminowego, bądź wiąże się z wolnymi grupami  $\text{—NH}_2$  białek, które akurat znalazły się w jej otoczeniu (60, 61).

Stwierdzono, że w tworzeniu wiązań kowalencyjnych między  $\alpha_2\text{M}$  a proteinazami biorą udział reszty lizyny cząsteczki proteiny, a więc ugrupowania o charakterze nukleofilowym. Okazało się bowiem, że zablokowanie reszt lizyny prowadzi do znacznego zmniejszenia zdolności enzymu do tworzenia tych wiązań (57, 64, 65). Jednak tak zmodyfikowane enzymy nadal mogą rozrywać specyficzne wiązania w cząsteczce inhibitora, w rezultacie czego  $\alpha_2\text{M}$  podlega zmianie konformacyjnej, co prowadzi do pojawienia się wolnych grup  $\text{—SH}$ . Dzięki obecności wolnych grup  $\text{—SH}$   $\alpha_2\text{M}$  może wiązać cząsteczki metyloaminy (65). Wykazano również, że proteiny różnią się między sobą zdolnością do tworzenia wiązań kowalencyjnych z  $\alpha_2\text{M}$  i tak np. tylko 8% papainy a aż 61% trypsyny związanej z  $\alpha_2\text{M}$  tworzy wiązania kowalencyjne (45). Ponadto w obecności metyloaminy obserwuje się obniżoną zdolność inhibitora do kowalencyjnego wiązania proteinaz (7). Ogólnie wydaje się, że tworzenie wiązań kowalencyjnych nie jest konieczne do hamowania aktywności enzymów przez  $\alpha_2\text{M}$  (45).

Oprócz fizycznego „pułapkowania” (ang. *trapping*) i wiązania proteinaz w sposób kowalencyjny stwierdzono występowanie oddziaływań jonowych i hydrofobowych między  $\alpha_2\text{M}$ , a niektórymi białkami o charakterze zasadowym (53).

Wiadomo także, że szybkość wiązania metyloaminy przez  $\alpha_2\text{M}$  zależy od wartości pH (w granicach 7,0—8,6) co świadczy o tym, że w reakcji z  $\alpha_2\text{M}$  bierze udział deprotonowana amina. Ponadto okazało się, że aminy drugo i trzeciorzędowe, a także pierwszorzędowe większe od propyloami-

ny reagują bardzo wolno z  $\alpha_2M$  (66). Wydaje się więc, że tioester znajduje się w kieszeni, do której łatwy dostęp mają tylko małe cząsteczki (7, 66). Należy dodać, że tioester znajdując się w otoczeniu hydrofobowym jest stosunkowo stabilny w środowisku wodnym (67, 68).

Podobne wiązania tioestrowe występują w obrębie cząsteczki składnika komplementu C3 (50, 60, 62, 69) i C4 (62, 69). Białka te również ulegają inaktywacji pod wpływem amin, które mogą się z nimi wiązać w sposób kowalencyjny (57, 69). Dodatkowo wykazano istnienie znacznych homologii dotyczących struktury pierwszorzędowej między  $\alpha_2M$  i C3 oraz  $\alpha_2M$  i C4 (29).

## V. Miejsca wiążące proteinaz w cząsteczce $\alpha_2$ -makroglobuliny

Maksymalnie dwie cząsteczki enzymu mogą być „pułapkowane” (ang. *trapping*) przez jedną cząsteczkę  $\alpha_2M$ . Inhibitor może więc wiązać dwie cząsteczki trypsyny (7, 49, 56, 70, 71) czy chymotrypsyny (7, 49, 56, 70). Jednakże  $\alpha_2M$  wykazuje zdolność do wiązania tylko jednej cząsteczki plazminy (proteinyzy o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej) (71—73). Ponadto stwierdzono, że obie cząsteczki trypsyny lub chymotrypsyny są wiązane w dwóch niezależnych od siebie, ale równoważnych miejscach cząsteczki inhibitora (74, 75). Jednak tylko jedna cząsteczka proteinyzy jest potrzebna, aby nastąpiła zmiana konformacyjna w obrębie całej cząsteczki inhibitora (76). Druga cząsteczka enzymu może związać się z  $\alpha_2M$  tylko wtedy, jeśli rozerwie specyficzne wiązanie peptydowe w „rejonie przynęty” zanim nastąpi zmiana konformacyjna zainicjowana przez pierwszą cząsteczkę enzymu (37). Wiązanie dwóch cząsteczek trypsyny przez  $\alpha_2M$  przeważa w przypadku nadmiaru proteinyzy (77). Ponadto okazało się, że dwie podjednostki  $\alpha_2M$  ulegają proteolizie zanim jedna cząsteczka enzymu zostanie związana (71).

Ostatnio przeprowadzone badania własności inhibitorowych  $\alpha_2M$  wykazały, że reakcja dimeru  $\alpha_2M$  z trypsyną czy chymotrypsyną przebiega w sposób analogiczny jak w przypadku tetrameru. Każdy dimer stanowi więc niezależną jednostkę funkcyjną wiążącą jedną cząsteczkę enzymu. Można stąd wnioskować, że w przypadku oddziaływania z proteinazami w cząsteczce  $\alpha_2M$  ma miejsce ściśle współdziałanie podjednostek w obrębie dimerów, a tylko niewielka kooperacja zachodzi pomiędzy dimerami (70, 76).

Stwierdzono również, że odległość między dwoma miejscami wiążącymi chymotrypsynę w cząsteczce  $\alpha_2M$  wynosi 44 Å. Ponadto wykazano, że wolne grupy —SH, które pojawiają się jako rezultat reakcji  $\alpha_2M$  z trypsyną czy chymotrypsyną, mogą oddziaływać resztami tiopropylowymi przyłączonymi do Sepharose, co wskazuje na to, że znajdują się na powierzchni kompleksu enzym-inhibitor. Grupy te pozostają w ścisłym

kontakcie z proteinazami i są oddalone od centrum aktywnego chymotrypsyny zaledwie o 20 Å (74, 78).

Wiadomo także, że sojowy inhibitor trypsyny o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej (20 000) może oddziaływać z trypsyną związaną z  $\alpha_2$ M, przy czym trypsyna niekowalencyjnie związana z  $\alpha_2$ M łatwiej wchodzi w interakcję. Jednak reakcja między trypsyną związaną z  $\alpha_2$ M a sojowym inhibitorem trypsyny zachodzi  $10^4$ — $10^5$  razy wolniej, niż to ma miejsce w przypadku wolnej trypsyny (79).

## VI. Zmiany konformacyjne w cząsteczce $\alpha_2$ -makroglobuliny

Kompleksy  $\alpha_2$ M z proteinazami wykazują bardziej zwartą strukturę niż natywna cząsteczka inhibitora, co widać na zdjęciach z mikroskopu elektronowego (26). Kompleksy charakteryzują się ponadto większą ruchliwością elektroforetyczną.  $\alpha_2$ M o większej ruchliwości elektroforetycznej została nazwana formą F (*fast*), w odróżnieniu od formy natywnej S (*slow*) o niższej ruchliwości elektroforetycznej. Przekształcenie formy S w formę F następuje nie tylko podczas reakcji z proteinazami, ale również w wyniku oddziaływania z czynnikami nukleofilowymi. Forma F pojawia się także podczas denaturacji inhibitora (7).

Badania fluorescencyjne  $\alpha_2$ M wykazały, że jej widmo emisyjne z maksimum przy 326 nm jest typowym widmem dla reszt tryptofanu. W wyniku reakcji inhibitora z aminami lub proteinazami następuje nieznaczne przesunięcie maksimum emisji w stronę fal krótszych i wzrost intensywności fluorescencji (51, 80). Obserwowany wzrost intensywności fluorescencji oraz maksima przy 290—295  $\mu$ m i przy 282  $\mu$ m w widmie absorpcyjnym formy F  $\alpha_2$ M w ultrafiolecie wskazują na to, że zmiany konformacyjne  $\alpha_2$ M są wynikiem zmian w usytuowaniu reszt tryptofanu. Przesunięcie maksimum emisji w stronę fal krótszych świadczy ponadto, że reszty tryptofanowe w rezultacie zmiany konformacyjnej  $\alpha_2$ M znalazły się w bardziej hydrofobowym otoczeniu. Na tej podstawie można wnioskować, że jedna z 8—10 reszt tryptofanowych przypadających na każdą podjednostkę  $\alpha_2$ M, w związku ze zmianą konformacyjną inhibitora, przestaje prawdopodobnie być wyeksponowana na zewnątrz, a jest schowana wewnątrz cząsteczki  $\alpha_2$ M (51). Badania przy użyciu znaczników fluorescencyjnych (aminonaftaleno sulfonian sodu, czy kwas toluidyno-naftaleno sulfonowy) także wykazały wzrost intensywności fluorescencji formy F  $\alpha_2$ M i przesunięcie maksimum emisji w stronę fal krótszych. Oba te zjawiska pozwalają sądzić, że w wyniku reakcji  $\alpha_2$ M z proteinazami, czy metyloaminą, następuje spadek polarności w otoczeniu znacznika (znacznik znajduje się teraz w bardziej hydrofobowym środowisku) (81).

Podczas interakcji  $\alpha_2$ M z termolizyną, trypsyną lub papainą obserwowano wzrost temperatury (z 60°C na 77°C), w której zachodzi termiczne

indukowanie „rozfałdowania” inhibitora. Świadczy to o występowaniu zmiany konformacyjnej  $\alpha_2M$  podczas wiązania proteinazy (82).

$\alpha_2M$ —F charakteryzuje się ponadto niższym stosunkiem współczynników tarcia w porównaniu z natywnym inhibitorem. Stosunek ten w przypadku  $\alpha_2M$ —F wynosi 1,57, a w przypadku  $\alpha_2M$ —S wynosi 1,67 i został obliczony na podstawie pomiaru stałych sedymentacji każdej z form. Spadek wartości stosunku współczynników tarcia może wynikać ze zmniejszenia asymetrii lub uwodnienia formy F (51).

Badania z użyciem promieni X (niskokątowe rozproszenie promieni X) dostarczyły informacji dotyczących struktury trzeciorzędowej  $\alpha_2M$ . Natywna  $\alpha_2M$  ma prawdopodobnie kształt litery H, na którą składają się cztery cylindry o przekroju elipsy. Objętość cząsteczki wynosi 1270 nm<sup>3</sup> (83), maksymalna długość 26 nm, a promień mas rozpraszających 7,8 nm. Natomiast w przypadku formy F promień mas rozpraszających osiąga wartość 7,2 nm, a maksymalna długość cząsteczki 23 nm (83, 84).

Analiza widm dichroizmu kołowego wykazała, że natywna  $\alpha_2M$  zawiera 35—60% struktury  $\beta$  i 5% struktury  $\alpha$ , zaś forma F nie zawiera w ogóle struktury  $\alpha$ , a za to więcej struktury  $\beta$  tj. 40—65% (68).

## VII. Komórkowe receptory $\alpha_2$ -makroglobuliny

Okazało się, że tylko forma F  $\alpha_2M$  jest rozpoznawana i wiązana przez specyficzne receptory znajdujące się na makrofagach (85—90) czy fibroblastach (91, 92) i dlatego kompleksy proteinaza-inhibitor mogą być szybko usuwane z krążenia (88). Stosunkowo niedawno wykazano, że izolowane hepatocyty i adipocyty także mogą wiązać kompleksy  $\alpha_2M$  z enzymami, które następnie ulegają endocytozie i degradacji w lizosomach (93). Okazało się również, że specyficzne receptory znajdujące się na makrofagach nie odróżniają kompleksów  $\alpha_2M$  z proteinazami od  $\alpha_2M$  przekształconej w formę F przy pomocy substancji o charakterze nukleofilowym (7, 88). Dodatkowo stwierdzono, że wpływ na wiązanie kompleksów  $\alpha_2M$ -proteinaza z receptorami makrofagów ma obecność dwuwartościowych kationów. Ogólnie kompleks inhibitor-proteinaza zostaje rozpoznany przez receptor na powierzchni makrofagu. Następnie kompleks związany z receptorem wędruje do lizosomu, gdzie podlega działaniu hydrolaz (86). Jednakże tylko kompleks  $\alpha_2M$ -proteinaza ulega degradacji w lizosomie, podczas gdy receptor powraca na powierzchnię komórki (94, 95). Podobne zjawisko krążenia receptorów obserwuje się nie tylko w przypadku makrofagów, ale także fibroblastów (96).

$\alpha_2M$  stanowi jeden z głównych substratów osoczowej transglutaminazy (czyli czynnika XIII a /92/), która może oddziaływać z resztą kwasu glutaminowego w cząsteczce inhibitora (47). Nie wiadomo jednak jakie ta reakcja może mieć znaczenie fizjologiczne. Natomiast w przypadku ko-



mórkowej transglutaminazy stwierdzono, że ułatwia ona pobieranie kompleksów  $\alpha_2$ M-proteinaza przez fibroblasty. Prawdopodobnie odgrywa ona pewną rolę regulacyjną w procesie krążenia receptorów (96).

### VIII. Rola fizjologiczna $\alpha_2$ -makroglobuliny

$\alpha_2$ M może wprawdzie oddziaływać praktycznie ze wszystkimi znanymi endopeptydazami, to jednak w osoczu występują współzawodniczące z nią specyficzne inhibitory endopeptydaz. Rola fizjologiczna  $\alpha_2$ M polega raczej na transporcie proteinaz, a nie na hamowaniu ich aktywności (97). Zwłaszcza, że w przypadku ludzkiego osocza zaobserwowano przekazywanie enzymów z  $\alpha_1$  antyproteinazy na  $\alpha_2$ M, a następnie szybkie usuwanie kompleksów z krwiobiegu (98).

Biorąc pod uwagę szeroki zakres działania  $\alpha_2$ M oraz jej zdolność do inaktywacji niektórych proteinaz pochodzenia pozaustrojowego (np. z jadu węży /99/) z dużym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że stanowi ona jedno z istotnych ogniw obronnych organizmu (37).

Panu Profesorowi Aleksandrowi Kojowi składam serdeczne podziękowania za cenne uwagi krytyczne, pomocne w przygotowaniu niniejszej pracy.

Zaakceptowano do druku 2 maja 1986 r.

### PIŚMIENNICTWO

1. James K., (1980), *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 43—47.
2. Jones J. M., Creeth J. M., Kekwick R. A., (1972), *Biochem. J.*, **127**, 187—197.
3. Barrett A. J., Starkey P. M., (1973), *Biochem. J.*, **133**, 709—724.
4. Roberts R. C., Riesen W. A., Hall P. K., (1974), w: *Proteinase Inhibitors*, Bayer Symposium V, red. Fritz H., Tschesche H., Greene L. J., Truscheit E., str. 63—71, Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.
5. Laurell C. B., Jeppsson J. O., (1975), w: *The Plasma Proteins*, red. Putman F. W., wyd. 2, t. 1, str. 229—264, Academic Press, New York and London.
6. Wong K. L., Regoeczi E., (1976), w: *Protides of the Biological Fluids*, 23 colloquim, red. Peters H.
7. Barrett A. J., Brown M. A., Sayers C. A., (1979), *Biochem. J.*, **181**, 401—418.
8. Virca G. D., Travis J., Hall P. K., Roberts R. C., (1978), *Anal. Biochem.*, **89**, 274—278.
9. Kurecki T., Kress L. F., Laskowski M. Sr., (1979), *Anal. Biochim.*, **99**, 415—420.
10. Ohlsson K., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 84—91.
11. Picard J. J., Heremans J. F., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **71**, 554—561.

12. Got R., Mouray H., Moretti J., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 320—330.
13. Lebreton de Vonne T., Mouray H., (1968), *R. C. Acad. Sci.*, **266**, 1076—1079.
14. Greene N. D., Damian R. T., Hubbard W. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 659—663.
15. Hudson N. W., Koo P. H., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **704**, 290—303.
16. Jacquot-Armand J., Guinard S., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 289—300.
17. Tsuru D., Tominatsu M., Fujiwara K., Kawahara K., (1975), *J. Biochem.*, (Tokio), **77**, 1305—1312.
18. Pepper D. S., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **156**, 327—339.
19. Lavergne M., Raynaud M., (1970), *Ann. Inst. Pasteur*, **119**, 27—49.
20. Dubin A., Potempa J., Silberring J., (1984), *Biochem. Int.*, **8**, 589—596.
21. Pellegrini A., Zweifel H. R., von Fellenberg R., (1983), *Int. J. Bioch.*, **15**, 1003—1011.
22. Ganrot K., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 245—251.
23. Nagasawa S., Hoon B. H., Sugihara H., Suzuki T., (1970), *J. Biochem.* (Tokio), **67**, 821—832.
24. Feldman S. R., Gonias S. L., Ney K. A., Pratt C. W., Pizzo S. V., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 4458—4462.
25. Picard J. J., Vandebroek G., Heremans F. J., Defossé G., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 111—114.
26. Starkey P. M., Barrett A. J., (1977), w: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, red. Barrett A. J., str. 661—691, Amsterdam: Elsevier, North Holland Biomedical.
27. Gentou C., (1968), *C. R. Acad. Sci.*, **266**, 2358—2361.
28. Harpel P. C., (1973), *J. Exp. Med.*, **138**, 508—521.
29. Sottrup-Jensen L., Stepanik T. M., Kristensen T., Wierzbicki D. M., Jones C. M., Lonblad P. B., Magnusson S., Petersen T. E., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8318—8327.
30. Dunn J. T., Spiro R. G., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5549—5555.
31. Fronoy J. P., Bourrillon R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **371**, 168—196.
32. Scott B. J., Bradwell A. R., (1983), *Clin. Chim. Acta*, **127**, 115—125.
33. Carson S. D., (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, **791**, 370—374.
34. Dumitrescu A., Ganea D., Dinescu A., Ghitescu L., Szegli G., (1977), *Rev. Roum. Biochim.*, **14**, 167—173.
35. Parisi A. F., Vallee B. L., (1970), *Biochemistry*, **9**, 2421—2426.
36. Österberg R., Malmensten B., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **143**, 541—544.
37. Travis J., Salvesen G. S., (1983), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 655—709.
38. Virca G. D., Travis J., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8870—8874.
39. Bodmer J. L., Schnebli H. F., (1984), *Schweiz. Med. Wschr.*, **114**, 1359—1363.
40. Koj A., (1985), w: *The acute-phase response to injury and infection*, red. Gordon H., Koj A., str. 145—160, Elsevier Science Publishers BV, Biomedical Division.
41. Laskowski M. Jr., Kato J., (1980), *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 593—626.
42. Werb Z., Burleigh M. C., Barrett A. J., Starkey P. M., (1974), *Biochem. J.*, **139**, 359—368.

43. Saunders P., Dyce B. J., Vannier W. E., Haverback B. J., (1971), *J. Clin. Invest.*, **50**, 2376—2383.
44. Ganrot P. O., Niléhn J. E., (1967), *Clin. Chim. Acta*, **17**, 511—513.
45. Salvessen G. S., Barrett A. J., (1980), *Biochem. J.*, **187**, 694—701.
46. Sottrup-Jensen L., Lonblad P. B., Stepanik T. M., Peterson T. E., Magnusson S., Joutnwall H., (1981a), *FEBS Lett.*, **127**, 167—173.
47. Mortensen S. B., Sottrup-Jensen L., Hansen H. F., Petersen T. E., Magnusson S., (1981), *FEBS Lett.*, **135**, 295—300.
48. Roberts R. C., Hall P. K., (1984), *Ann. New York Acad. Sci., Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin*, 61—68.
49. Swenson R. P., Howard J. B., (1979a), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4452—4456.
50. Sottrup-Jensen L., Hansen H. F., Mortensen S. B., Petersen T. E., Magnusson S., (1981b), *FEBS Lett.*, **123**, 145—148.
51. Björk I., Fish W. W., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 347—356.
52. Gonias S. L., Reynolds J. A., Pizzo S. V., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **705**, 306—314.
53. Barrett A. J., (1981), *Methods Enzymol.*, **80**, 737—754.
54. Hall P. K., Roberts R. C., (1978), *Biochem. J.*, **171**, 27—28.
55. Starkey P. M., Barrett A. J., (1982), *Biochem. J.*, **205**, 91—95.
56. Swenson R. P., Howard J. B., (1979b), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4313—4316.
57. Salvensen G. S., Seyers C. A., Barrett A. J., (1981), *Biochem. J.*, **195**, 453—461.
58. Salvensen G. S., Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Magnusson S., (1981c), *FEBS Lett.*, **128**, 123—126.
59. Wang D., Wu K., Feinman R. D., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 500—506.
60. Sottrup-Jensen L., Petersen T. E., Magnusson S., (1980), *FEBS Lett.*, **121**, 275—279.
61. Howard J. B., (1981), *Proc. Natl. Sci. USA*, **78**, 2235—2239.
62. Swenson R. P., Howard J. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8087—8091.
63. Sottrup-Jensen J., Howard H. F., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 93—100.
64. Wu K., Wang D., Feinman R. D., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 10409—10414.
65. Feiman R. D., Wang D., Windwer S. R., Wu K., (1984), *Ann. New York Acad. Sci., Catalytic Transition of Metal Hydrides*, 178—187.
66. Larsen L.-J., Björk I., (1984), *Biochemistry (USA)*, **23**, 2802—2807.
67. Van Leuven F., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 185—187.
68. Welinder K. G., Mikkelsen K., Sottrup-Jensen L., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 8328—8331.
69. Sim R. B., Sim F., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 129—141.
70. Björk J., Larsson L. J., Lindblom T., Raub E., (1984), *Biochem. J.*, **217**, 303—308.
71. Christensen U., Sottrup-Jensen L., (1984), *Biochemistry USA*, **23**, 6619—6626.
72. Pochon F., Armand B., Lavalette D., Bieth J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7496—7499.
73. Gonias S., Einarsson M., Pizzo S. V., (1982), *J. Clin. Invest.*, **70**, 412—423.
74. Pochon F., Favandon V., Tourbez-Perrin M., Bieth J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 547—550.

75. Pochon F., Bieth J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6683—6685.
76. Gonias S. L., Pizzo S. V., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 14682—14685.
77. Christensen U., Sottrup-Jensen L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **747**, 263—275.
78. Pochon F., Bieth J., (1984), *Ann. New York Acad. Sci. Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin*, 81—89.
79. Bieth J. G., Tourbez-Perrin M., Pochon F., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7954—7959.
80. Jacquot-Armand I., Krebs G., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 128—137.
81. Strickland D. K., Bhattachara P., (1984), *Biochemistry (USA)*, **23**, 3115—3124.
82. Chlebowski J. F., Williams K., (1983), *Biochem. J.*, **209**, 725—730.
83. Österberg R., Malmensten B., (1984), *Eur. J. Biochem.*, **143**, 541—544.
84. Branegård B., Österberg R., Sjöberg B., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 663—666.
85. Gonias S. L., Pizzo S. V., (1984), w: *Ann. New York Acad. Sci., Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin*, str. 457—471.
86. Kaplan J., Nielsen M. N., (1979a), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7323—7328.
87. Kaplan J., Nielsen M. N., (1979b), *J. Biol. Chem.*, **254**, 7329—7335.
88. Imber M. J., Pizzo S. V., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8134—8139.
89. Kaplan J., Ray F. A., Keogh E. A., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 7705—7707.
90. Feldman S. R., Ney K. A., Gonias S. L., Pizzo S. V., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 757—762.
91. Van Leuven F., Cassiman J. J., Van den Berghe H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5155—5160.
92. Van Leuven F., Cassiman J. J., Van den Berghe H., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9016—9022.
93. Gliemann J., Larsen T. R., Sottrup-Jensen L., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **756**, 230—237.
94. Kaplan J., (1980), *Cell*, **19**, 197—205.
95. Kaplan J., Koegh A. E., (1984), *Ann. New York Acad. Sci., Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin*, str. 442—456.
96. Van Leuven F., Cassiman J. J., Van den Berghe H., (1980), *Cell*, **20**, 37—43.
97. Feiman R. D., (1984), *Ann. New York Acad. Sci., Chemistry and Biology of  $\alpha_2$ -Macroglobulin*, str. 472—476.
98. Beatty K. G., Travis J., Bieth J., (1982), *Biochim., Biophys. Acta*, **704**, 221—226.
99. Kress L. F., Kurecki T., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **613**, 469—475.

## MINIREVIEW

BARBARA BARTŁOMOWICZ \*

### Wątrobowy cytochrom P—450

#### Hepatic cytochrome P-450

Wzrost zainteresowania wątrobowym cytochromem P—450 (EC.1.14.14.1) jest uzasadniony, odgrywa on bowiem ważną rolę w przemianach mikrosomalnych, między innymi związanych z detoksykacjami ustrojowymi. Poprzez takie przemiany komórka wątrobowa może metabolizować i eliminować substancje egzogenne np. leki, pestycydy (1, 2), związki rakotwórcze, czynniki zanieczyszczające środowisko (3, 4) oraz endogenne np. cholesterol, hormony steroidowe, kwasy żółciowe, bilirubinę, hem, tyroksynę, indole, puryny, aminy sympatykomimetyczne (5).

Badania Axelroda (6) oraz Brodie i wsp. (7) na początku lat pięćdziesiątych wykazały w siateczce śródplazmatycznej wątroby obecność układu enzymatycznego. Reakcje, które w nim przebiegają wymagają udziału NADPH,  $Mg^{2+}$ , dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz obecności molekularnego tlenu.

Pod koniec lat pięćdziesiątych Garfinkel (8) i Klingenberg (9) odkryli w mikrosomach wątroby świń, a następnie szczurów — związek barwny wiążący tlenek węgla, który może być zredukowany przez NADPH lub przez podsiarczyn sodowy ( $Na_2S_2O_4$ ). Byli oni pierwszymi badaczami, którzy wykazali, że barwnik ten po połączeniu z CO osiąga maksimum absorpcji przy długości fali 450 nm. Jednak z powodu brakujących widm w paśmie alfa (560 nm) i beta (525 nm) nie mogli oni określić hemowego charakteru tego barwnika. Dopiero w 1964 roku dwaj badacze japońscy Omura i Sato stwierdzili, że barwnik ten jest hemo-proteidem, cytochromem typu b, który w obecności CO daje atypowe

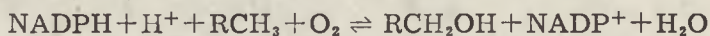
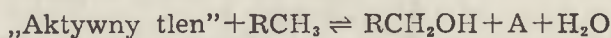
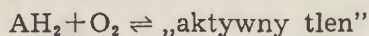
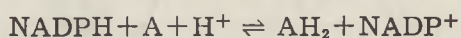
---

\* Dr med., Zakład Toksykologii, Instytut Farmakologii i Toksykologii Akademii Medycznej w Szczecinie, Al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70—111 Szczecin.

Wykaz stosowanych skrótów: NADPH — zredukowany fosforan dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego; CO — tlenek węgla; NADP — fosforan dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego; P—450 CAM — rozpuszczalny cytochrom P—450 izolowany z wzrastającego na kamforze *Pseudomonas putida*; FMN — mononukleotyd flawianowy; FAD — dwunukleotyd flawinowo-adeninowy;  $H_2O_2$  — nad-tlenek wodoru.

widmo w paśmie Soreta. Omura i Sato nazwali go cytochromem P—450 (10, 11).

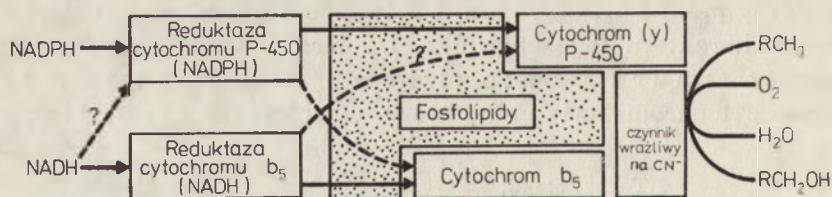
Od tej chwili nastąpił rozwój badań nad cytochromem P—450. Wykazano, że przy jego udziale w mikrosomach wątroby zachodzi wiele różnorodnych reakcji utleniania. Obejmują one m.in. hydroksylację łańcuchów alifatycznych, oksydacyjną N-dealkilację, oksydacyjną O-dealkilację, oksydacyjną S-dealkilację, oksydacyjną deaminację, oksydacyjną dehalogenację, N-oksydację, S-oksydację, dehydrogenację oksydacyjną, desulfurację, oksydacyjną dearylację (12). Właściwie wszystkie te reakcje stanowią różne formy procesu hydroksylacji. W chwili obecnej, po wielu latach badań, podstawowe reakcje przebiegające przy udziale cytochromu P—450 przedstawiamy następująco:



(całość reakcji)

NADPH redukuje w mikrosomach składnik A, ten reaguje z molekularnym tlenem do formy pośredniej tzw. „aktywnego tlenu”, który jest następnie przenoszony na substrat. Stwierdzono, że składnik A jest enzymem typu monooksygenazy i zidentyfikowano go jako cytochrom P—450 (13). W reakcjach przedstawionych powyżej następuje utlenianie substratu  $\text{RCH}_3$  i utlenienie NADPH do  $\text{NADP}^+$ .

W siateczce śródplazmatycznej wątroby, znajduje się drugi układ transportujący elektrony, składający się z reduktazy cytochromu  $b_5$  — zależnej od NADH oraz z cytochromu  $b_5$ . Uważa się, że w reakcjach hydroksylacji zależnych od cytochromu P—450 uczestniczy także układ cytochromu  $b_5$  (14). Schemat układu monooksygenazy przedstawia rysunek 1.



Ryc. 1. Schemat budowy molekularnej monooksygenazy zależnej od cytochromu P—450 (wg 14).

Przełomowym wydarzeniem dla dalszego rozwoju badań nad cytochromem P—450 było uzyskanie w 1968 roku przez Lu i Coona (15) rozdzielu chromatograficznego na DEAE-celulozie, wątrobowej mono-

oksygenazy na trzy zasadnicze składniki: cytochrom P—450, reduktazę cytochromu P—450 zależną od NADPH i lipidowy ciepłotały czynnik fosfatydylocholine. Ich właściwości zostaną pokrótce przedstawione.

Cytochrom P—450 z mikrosomów wątroby szczura jest wieloskładnikowym enzymem o masie cząsteczkowej 300 000, składającym się z 6 polipeptydów o masie cząsteczkowej pojedynczego polipeptydu 50 000. Każdy z łańcuchów polipeptydowych zawiera cząsteczkę hemu. C-końcowym aminokwasem jest arginina, N-końcowym aminokwasem jest metionina. Na każdy łańcuch polipeptydowy przypadają trzy reszty węglowodanowe. Budowa miejsca aktywnego cytochromu P—450 u hodowanego na kamforze *Pseudomonas putida*, zawierającego cytochrom P—450 CAM w stanie rozpuszczalnym, została opisana szczegółowo przez G u n s a l u s a i w s p. (16). Oznaczenia oparte na masie cząsteczkowej i aktywności swoistej cytochromu P—450 (2,79 nmola/mg mikrosomalnego białka) u szczurów indukowanych fenobarbitalem, wskazują, że enzym ten jest ilościowo dominującym białkiem hemowym w mikrosomach wątroby, stanowiącym 14% ogólnej ilości białek mikrosomalnych (16, 17). Warto również podkreślić, że inne narządy takie jak nerki, płuca, jelita, skóra, łożysko, mózg także zawierają cytochrom P—450 (18).

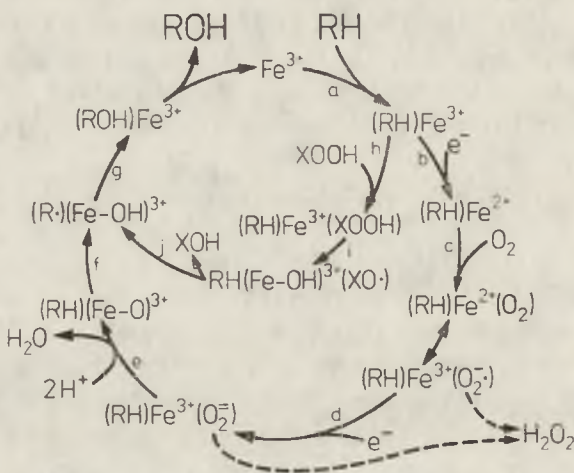
W ciągu ostatnich 10 lat oczyszczono i izolowano z tkanek zwierząt różnych gatunków oraz człowieka bardzo wiele cytochromów P—450 (19). W chwili obecnej podzielono je na dwie duże klasy: A i B. Klasa A — obejmuje cytochromy P—450, które wymagają dla transportu elektronów z NADPH na tę hemoproteinę obecności flawoproteiny zawierającej FAD oraz białka żelazosiarkowego (20). Ten rodzaj cytochromu P—450 występuje w mitochondriach tkanek metabolizujących steroidy (nadnercza i jądra). Również większość bakterii posiada taki cytochrom P—450. Bierze on udział w metabolizmie substancji endogennych, np. cholesterolu, deokykortykosteronu, cholekalciferolu. Klasa B cytochromów P—450 wymaga dla swojego działania flawoproteiny, która zawiera jako grupy prostetyczne zarówno FAD jak i FMN. Są one niezbędne do przenoszenia elektronów z NADPH na hemoproteinę P—450. Ta klasa cytochromów P—450 jest związana z frakcją mikrosomalną i wymaga dla swojego działania udziału cytochromu  $b_5$ . Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że cytochromy P—450 klasy B występują także w jądrach komórkowych wielu tkanek (21).

Drugim składnikiem monooksygenazy izolowanej z wątroby szczura jest reduktaza cytochromu P—450 zależna od NADPH (EC.1.6.2.4). Składa się ona z pojedynczego łańcucha polipeptydowego o masie cząsteczkowej 74 000, który w pewnych warunkach może ulegać agregacji osiągając masę cząsteczkową 450 000 (22). Łańcuch peptydowy reduktazy cytochromu P—450 zawiera jedną cząsteczkę FMN oraz jedną cząsteczkę FAD (23). Wykazano, że w procesie przenoszenia elektronów przez reduktazę cytochromu P—450 FAD jest flawiną, która przyjmuje elektrony

z NADPH, a FMN uczestniczy w przenoszeniu elektronów na cytochrom P—450 (23). Skład aminokwasowy reduktazy cytochromu P—450 zależnej od NADPH został opisany przez Guma i Strobela (24).

Trzecim składnikiem układu monoooksygenazy zależnej od cytochromu P—450 jest fosfatydylocholina. Fosfolipid ten reguluje transport elektronów, pośrednicząc w reakcji między cytochromem P—450 i odpowiadającą mu reduktazą. Stabilizuje również lub indukuje aktywną formę cytochromu P—450 (25, 26). Obecnie uważa się, że fosfatydylocholina jest aktywatorem układu monoooksygenazy zależnej od cytochromu P—450.

Dzisiaj już wiadomo, że cytochrom P—450 wykazuje właściwości nie tylko oksygenazy, ale także oksydazy i peroksydazy. Zależy to od rodzaju substratu i warunków w jakich reakcja przebiega. W wielu przypadkach, te trzy różne aktywności cytochromu P—450 występują jednocześnie, co doprowadza do powstania różnych produktów (27).



**Ryc. 2.** Cykl reakcji cytochromu P—450 w procesie hydroksylacji substratu. Schemat obrazuje działanie cytochromu P—450 jako oksygenazy, oksydazy i peroksydazy (wg 53). RH — substrat, ROH — produkt, XOOH — np. nadtlenek wodoru.

Rycina 2 przedstawia kolejne etapy cyklu przemian katalitycznych przebiegających przy udziale cytochromu P—450, z uwzględnieniem jego funkcji jako oksygenazy, oksydazy i peroksydazy.

**Etap a** — Utleniony cytochrom P—450 oznaczony jako  $Fe^{3+}$  reaguje z cząsteczką substratu RH. Powstaje kompleks  $/RH/Fe^{3+}$ . **Etap b** — Kompleks  $/RH/Fe^{3+}$  przyjmuje jeden elektron, który jest przenoszony przez reduktazę cytochromu P—450 zależną od NADPH. Następuje redukcja żelaza cytochromu P—450 do  $Fe^{2+}$ . **Etap c** — Zredukowany cytochrom P—450 w postaci kompleksu  $/RH/Fe^{2+}$  przyłącza tlen, tworząc w ten sposób tzw. oksycytochrom P—450— $/RH/Fe^{2+}/O_2/$ . W obrębie kompleksu



oksyocytochromu następuje przeniesienie elektronu z  $Fe^{2+}$  na cząsteczkę tlenu i przekształcenie jej w jonorodnik ponadtlenkowy ( $O_2 \cdot$ ). Rodnik ten może oddysocjować od kompleksu i w wyniku dysmutacji przekształcić się w  $H_2O_2$ . **Etap d** — Kompleks cytochromu P—450 z jonorodnikiem ponadtlenkowym przyjmuje elektron, którego źródłem jest najprawdopodobniej cytochrom  $b_5$ . Tworzy się peroksyocytochrom  $/RH/Re^{s+}(O_2^-)$  zawierający jon ponadtlenkowy, który może oddysocjować i po protonacji być źródłem  $H_2O_2$ . Powstawanie  $H_2O_2$  przy udziale cytochromu P—450 należy traktować jako proces uboczny, w którym cytochrom P—450 wykazuje właściwości oksydazy. **Etap e** — Jon ponadtlenkowy peroksyocytochromu P—450 ulega dysocjacji na jon tlenkowy, który po protonacji tworzy cząsteczkę wody i formę cytochromu P—450 zawierającą tlen atomowy, określany jako tzw. „oxenoid”  $/RH/Fe-O^{s+}$ . W przypadku dysocjacji do środowiska tak reaktywnej formy tlenu, należy brać pod uwagę możliwość jego gwałtownego łączenia się z nienasyconymi wiązaniami związków arenowych lub alkenów do formy epoksydów. **Etap f** — Na tym etapie następuje utlenienie cząsteczki substratu, powstaje wolny rodnik substratu oraz niezwykle reaktywna trójdotatnia, zredukowana forma tlenu.  $/R\cdot/ /Fe-OH^{s+}$ . **Etap g** — Następuje hydroksylacja substratu i uwolnienie go do środowiska oraz regeneracja cytochromu P—450, który łączy się z kolejną cząsteczką substratu. W ten sposób zostaje zamknięty podstawowy cykl pracy cytochromu P—450 wykazującego aktywność oksygenazy. Cytochrom P—450 wykazuje również aktywność peroksygenazy. Ilustrują to następujące dwa etapy. **Etap h** — Cytochrom P—450 związany z substratem  $/RH/Fe^{s+}$  łączy się z nadtlentkiem  $XOOH$  i powstaje kompleks  $/RH/Fe^{s+}/XOOH/$ . **Etap i** — W obrębie tego kompleksu nadtlenek ulega rozpadowi do formy wolnego rodnika  $XO\cdot$ , który w reakcji z substratem ulega redukcji i uwalnia się w postaci formy  $XOH$ . **Etap j** — Dalsze przemiany odbywają się jak w cyklu podstawowym.

Układ monooksygenazy zależnej od cytochromu P—450 jest odpowiedzialny za biotransformację wielu różnych substratów, zarówno endo- jak i egzogennych. Jak już wspomniano wcześniej, w zależności od budowy mogą one ulegać przemianom do różnych metabolitów poprzez N-, O-, i S-dealkilację, aromatyczną i alifatyczną hydroksylację, deaminację i inne reakcje.

Układ monooksygenazy jest generalnie uważany za system detoksykacyjny, ponieważ powstające przy jego udziale związki pośrednie są farmakodynamicznie mniej aktywne aniżeli substancje macierzyste (28). W wielu jednak wypadkach system ten metabolizując bardzo różne substancje, np. furosemid, czterochlorek węgla, chlorek winylu, przyczynia się do powstania związków elektrofilnych (epoksydy, wolne rodniki, karbeny), które są odpowiedzialne za efekty cytotoksyczne, mutagenne i cancerogenne, gdyż w większości wypadków łączą się one z białkami, kwasami nukleinowymi oraz inicjują peroksydację lipidów (4). W chwili obec-

nej nie ma już żadnych wątpliwości, że układ monooksygenazy zależnej od cytochromu P—450 aktywuje związki fosforoorganiczne (29), cyklo-dieny (30), aflatoksyny (31) oraz alkaloidy pyrrolizydynowe (32). Również katalizowana przez wątrobowy cytochrom P—450 N-dealkilacja nitrozamin (np. dimetylonitrozaminy) u ssaków, daje metabolity, które są mutagenne (31).

Na szczególną uwagę zasługuje udział monooksygenazy zależnej od cytochromu P—450 w metabolizmie wielocyklicznych węglowodorów: benzo/a/pirenu: 7,12-dimetylbenzo/a/ntracenu, znanych jako silne związki rakotwórcze (31). Wielocykliczne węglowodory są utleniane przez izoenzym P—450, określane jako cytochrom P—448 (cytochrom P<sub>1</sub>—450). W wyniku tej reakcji powstają arenoksydy, fenole i chinony. Przy udziale hydratazy epoksydowej są one metabolizowane do dihydrodioli, które mogą być następnie utleniane przez monooksygenazę zależną od cytochromu P—450 do niezwykle silnie mutagennych i kancerogennych diolepeksoydów. Te z kolei mają zdolność do łączenia się z materiałem genetycznym komórki, co zagraża syntezie prawidłowego białka (33).

Aby wyjaśnić niezwykle szerokie powinowactwo cytochromu P—450 w stosunku do substratów (o którym wspomniano na początku) zależne od gatunku, rasy, płci, wieku i stanu odżywienia zwierzęcia, postuluje się obecność wielu molekularnych form cytochromu P—450. Wyizolowano je w ostatnich latach z mikrosomów wątroby szczurów, królików, myszy a także człowieka (34). Dla przykładu: z wątroby królików (w zależności od podanego induktora) można uzyskać m.in. dwie różne formy cytochromu P—450; cytochrom P—450LM<sub>2</sub> (po stosowaniu fenobarbitalu) i cytochrom P—450LM<sub>4</sub> (po podaniu β-naftoflawonu lub 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioksyny) (34).

Układ różnych form cytochromu P—450, jako, zapewne, kontrolowany genetycznie (*Ah-locus*), będzie podlegać zmianom zarówno ilościowym jak i jakościowym przy ekspozycji na różne ksenobiotyki (35). Fizyczne właściwości izoenzymów cytochromu P—450 są różne w zależności od stosowanego induktora, którym może być jak już wspomniano wcześniej i fenobarbital, β-naftoflawon, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna, 3-metylocholanren, 16 α-karbonitrylo-pregnenelon, polichlorowane bifenyle i wiele innych (25, 35). Połączenie izoenzymów cytochromu P—450 z CO daje pochodne o różnych maksimach absorpcji w zakresie długości fali 447—452 nm. Masa cząsteczkowa peptydów poszczególnych form cytochromu P—450 jest różna i wynosi od 47.000 do 60.000 (36).

Odmienne N i C-końcowe aminokwasy i różna budowa w sekwencji pierwszorzędowej poszczególnych izoenzymów wskazuje, że produkcja tych białek jest kontrolowana przez oddzielne geny (37). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że izoenzymy cytochromu P—450 wykazują powinowactwo wobec tych samych substratów, ale metabolizują je w różnym stopniu (38). Dla przykładu: cytochrom P—450b szczura i cytochrom

P—450LM<sub>2</sub> królika katalizuje M-demetylację benzfetaminy 100 razy szybciej niż inne izoenzymy (39). Podanie 3-metylocholantrenu przyczynia się do wzrostu syntezy cytochromu P—450 u szczura, który jest od 50 do 100 razy bardziej aktywny w stosunku do hydroksylacji benzo/a/pirenu aniżeli cytochrom P—450LM<sub>4</sub> królika (40). Anilina jest hydroksylowana w stopniu porównywalnym przez cytochromy P—450a, P—450b, P—450c szczura (41), i przez cytochromy P—450LM<sub>2</sub> i P—450LM<sub>4</sub> królika (42). Można więc przypuszczać, że anilina nie jest metabolizowana przez specjalny izoenzym cytochromu P—450, a więc nie można regulować jej metabolizmu poprzez indukcję określonego izoenzymu.

Nie ulega już w tej chwili wątpliwości, że oczyszczone izoenzymy cytochromu P—450 działają wybiórczo na określone miejsce w substracie i w określonej konfiguracji przestrzennej tego substratu. Wykazano, że cytochromy P—450a, P—450b, P—450c szczura hydroksylują testosteron w pozycji: 7 alfa-, 16 alfa-, 6 beta-, (41). Izoenzymy cytochromu P—450 izolowane z wątroby królików: cytochromy P—450LM<sub>2</sub>, P—450LM<sub>3b</sub>, P—450LM<sub>4</sub>, także hydroksylują testosteron w określonych miejscach: 7 alfa-, 6 beta-, 16 alfa-, (43). Doskonałego przykładu dla swoistości izoenzymów w stosunku do substratu i do jego konfiguracji przestrzennej dostarcza metabolizm warfaryny /lek przeciwwątrobowy/. Fasco i w s p. (44) wykazali, że cytochrom P—450LM<sub>4</sub> królika łączy się z warfaryną tylko wtedy, gdy warfaryna jest w konfiguracji R i kumarynowa strona cząsteczki leku jest ustawiona w stronę aktywnego miejsca enzymu. Cytochrom P—450LM<sub>2</sub> królika, także łączy się z częścią kumarynową cząsteczki leku, ale preferowana jest konfiguracja S. Również metabolizm /—/trans-7,8-dihydroksy-7,8-dihydrobenzo/a/pirenu przez izoenzymy cytochromu P—450 szczura i królika jest uzależniony od konfiguracji przestrzennej tego związku (45).

Następstwa obecności wielu izoenzymów cytochromu P—450 są w dużej mierze poznane (46—50). Wiadomo, że izoenzymy te odgrywają doniosłą rolę w regulacji równowagi pomiędzy aktywacją i inaktywacją dróg metabolicznych różnych związków chemicznych. Uważa się, że zmieniając w sposób celowy (poprzez znany induktor lub inhibitor) aktywność izoenzymów cytochromu P—450, możemy wpływać na czas trwania i intensywność działania leków, hormonów i różnych ksenobiotyków (51—53).

*Zaakceptowano do druku 22 marca 1986 r.*

#### PIŚMIENNICTWO

1. Conney A. H., (1980) w: *Microsomes, Drug Oxidations and Chemical Carcinogenesis*, red. Coon M. J., Conney A. H., Estabrook R. W., Gelboin H. V., Gillette J. R., O'Brien P. J., t. 2, str. 1103—1118. Academic Press, New York.

3. Ryan D. E., Levin W., (1981, *Fed. Proc.*, **40**, 1640—1644.
4. Lampe J., Butschak G., Scheler W., (1984), w: *Cytochrome P-450*, red. Ruckpul K., Rein H., rozdz. 6, str. 277—336, Academie-Verlag, Berlin.
5. Ahmad S., (1979), *Drug Metab. Rev.*, **10**, 1—14.
6. Axelrod J., (1955), *J. Pharmacol.*, **114**, 430—438.
7. Brodie B., Axelrod J., Cooper J. R., Gaudette L., LaDu B. N., Mitoma C., Udenfriend S., (1955), *Science*, **121**, 603—604.
8. Garfinkel D., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 493—509.
9. Klingenberg M., (1958), *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376—386.
10. Omura T., Sato R., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370—2378.
11. Omura T., Sato R., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379—2385.
12. Mukhtar H., Elmamlouk T. H., Bend J. R., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 10—21.
13. Gillette J. R., (1963), *Progr. Drug Res.*, **6**, 13—73.
14. Nebert D. W., Felton J. S., Robinson J. R., (1975) w: *Developmental and Genetic Aspects of Drug and Environmental Toxicity*. Excerpta Medica, (American Elsevier), str. 73, New York.
15. Lu A. Y. H., Coon M. J., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1331—1332.
16. Gunsalus J. C., Meeks J. R., Lipscomb J. D., (1973), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **212**, 107—121.
17. Marshall W., McLean A. E. M., (1969), *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 153—157.
18. Ackermann E., (1978), *Pharmazie*, **33**, 400—406.
19. Coon M. J., Chiang Y. L., French J. S., (1979), w: *The Induction of Drug Metabolism*, wyd. Estabrook R. W., Lindenlaub E., str. 201—211, F. K. Schattauer, Verlag, Stuttgart.
20. Estabrook R. W., Suzuki K., Mason J. I., Baron J., Taylor W. E., Simpson E. R., Purris J., McCarthy J., (1973), w: *Iron-Sulfur Proteins Vol. 1*, wyd. Lovenberg W., str. 193—223, Academic Press, New York.
21. Bresuick E., Vaught J. B., Chuang A. H. L., Stoming T. A., Dockman D., Mukhtar H., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 257—269.
22. French J. S., Coon M. J., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 565—577.
23. Vermillion J. C., Coon M. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2694—2704.
24. Gum J. R., Strobel H. W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 4177—4185.
25. Strobel H. W., Lu A. Y. H., Heidema J., Coon M. J., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4851—4854.
26. Coon M. J., Strobel H. W., Autor A. P., Heidema J., Duppel W., (1972), w: *Biological Hydroxylation Mechanismus*, red. Boyd G. S., Smellie R. M. S., str. 45—54, Academic Press, New York.
27. Coon M. J., (1981), *Drug Metab. Dispos.*, **1**, 1—4.
28. Lu A. Y. H., (1979), *Drug Metab. Rev.*, **10**, 187—208.
29. Nakatsugawa T., Dahm P. A., (1968), wyd. Hodgson E., str. 89—112, North Carolina University Press, Raleigh.
30. Jerina D. M., Daly W. J., (1974), *Science*, **185**, 573—576.
31. Lampe J., Butschak G., (1978), *Pharmazie*, **33**, 407—411.
32. Mattocks A. R., (1972), w: *Phytochemical Ecology*, wyd. Harborne J. B., str. 129—200, Academic, New York.
33. Galdsteih J. A., (1984), *TIPS*, **5**, 290—292.
34. Lu A. Y. H., West S. B., (1980), *Pharmacol. Rev.*, **31**, 277—295.
35. Nebert D. W., Negishi M., (1982), *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2311—2317.
36. Welton A. F., Aust S. D., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 898—906.

37. Coon M. J., Koop D. R., Person A. V., Morgan E. T., (1980), w: *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P—450*, wyd. Gustafsson J. A., Carlstedt-Duke J., Mode A., Rafter J., str. 7—15, Elsevier North — Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
38. Johnson E. F., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 304—309.
39. Coon M. J., Vatsis K. P., (1978), w: *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, wyd. Gelboin H. V., Ts'o P. O., t. 1, str. 335—360, Academic, New York.
40. Kawalek J. C., Levin W., Ryan D., Thomas P. E., Lu A. Y. H., (1975), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 874—878.
41. Ryan D., Thomas P. E., Korzeniowski D., Levin W., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1365—1374.
42. Coon M. J., Vermilion L., Vatsis K. P., French J. S., Dean W. L., Haugen D. A., (1977), w: *Drug Metabolism Concepts*, wyd. Jerina D. M., str. 46—71, American Chemical Society, Washington, D.C.
43. Koop D. R., Coon M. J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 1075—1081.
44. Fasco M. J., Vatsis K. D., Kaminsky L. S., Coon M. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7813—7820.
45. Deutsch J., Leutz J. C., Yang S. K., Gelboin H. V., Chiang Y. L., Vatsis K. P., Coon M. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3123—3127.
46. Jänig G. R., Pfeil D., (1984), w: *Cytochrome P—450*, red. Ruckpaul K., Rein H., rozdz. 2, str. 58—110, Akademie-Verlag, Berlin.
47. Belvedere G., Miller H., Vatsis K. P., Coon J. M., Gelboin H. V., (1980), *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1693—1702.
48. Majesky M. W., Yang H. Y. L., Benditt E. P., Juchan M. R., (1983), *Carcinogenesis*, **4**, 647—652.
49. Luoma P. V., Sotaniemi E. A., Pelkonen R. O., Arranto A., Ehnholm C., (1982), *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **23**, 275—282.
50. Bridges J. W., Benford D. J., Hubbard S. A., (1983), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **407**, 42—63.
51. Hietanen E., Laitinen M., Vainio H., Hanninen O., (1975), *Lipids*, **10**, 467—472.
52. Campbell T. C., Hayes J. R., (1974), *Pharmacol. Rev.*, **25**, 171—197.
53. Coon M. J., (1981), *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 1—4.



## ARTYKUŁ

WŁODZIMIERZ BEDNARSKI \*, JADWIGA KOWALEWSKA-PIONTAS \*\*

### Enzymy termostabilne w technologii żywności

#### Thermostable enzymes in food technology

##### *Spis treści*

- I. Wstęp
- II. Właściwości enzymów termostabilnych oraz ich identyfikacja
- III. Termostabilność hydrolaz węglowodanów
- IV. Metody zwiększania termostabilności enzymów
- V. Podsumowanie

##### *Contents*

- I. Introduction
- II. Properties of thermostable enzymes and their identification
- III. Thermostability of carbohydrate hydrolases
- IV. Methods of enzymes thermostability enhancement
- V. Summary

### I. Wstęp

Preparaty enzymatyczne stosowane w przemyśle spożywczym nie zawsze charakteryzują się zadawalającą termostabilnością. Termostabilność enzymów określa się jako zdolność zachowania ich aktywności w środowisku o temperaturze powyżej 60°C.

Stosowanie enzymów w długotrwałych procesach technologicznych, które można prowadzić w temperaturze powyżej 60°C sprzyja wyelimi-

---

\* dr hab., \*\* dr inż., Instytut Inżynierii i Biotechnologii Żywności, Akademia Rolniczo-Techniczna, 10—957 Olsztyn.

Wykaz stosowanych skrótów: CMC — Karboksymetyloceluloza; ONPG — o-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd; PNPG — p-nitrofenylo-β-D-galaktopiranozyd; DEAE — dwuetyloaminoetylo-celuloza; CM — karboksymetylo-sephadex; I<sub>A</sub> — indeks alifatyczny.

nowaniu niepożądaney mikroflory bez konieczności pasteryzacji środowiska. Enzymy termostabilne w przeciwieństwie do termolabilnych można łatwiej immobilizować i wielokrotnie stosować bez zmniejszania ich aktywności. Decyduje o tym większa stabilność termiczna białek podczas wiązania enzymów z nośnikami oraz w czasie reakcji enzymatycznych prowadzonych w temperaturze powyżej 60°C.

W celu zwiększenia termostabilności enzymów prowadzone są badania, które dotyczą następujących zagadnień:

— stabilizacji odporności termicznej enzymów przy zastosowaniu metod chemicznych,

— poszukiwania i selekcji drobnoustrojów syntetyzujących enzymy termostabilne,

— otrzymywania mutantów poprzez przemieszczanie genów enzymów termostabilnych z mikroorganizmów niedopuszczalnych do stosowania w technologii żywności do komórek mikroorganizmów nie kwestionowanych przez kompetentne władze sanitarne.

W opracowaniu przedstawiono biochemiczne i technologiczne uwarunkowania pozyskiwania i stosowania termostabilnych preparatów enzymatycznych, przydatnych w technologii żywności.

## **II. Właściwości enzymów termostabilnych oraz ich identyfikacja**

Jedną z właściwości znanych enzymów jest zanik aktywności biologicznej po ogrzewaniu, powodującym denaturację białek enzymatycznych. Mnogość metod oraz różnorodność interpretacji stabilności termicznej białek powoduje trudności w porównywaniu tej właściwości enzymów charakteryzowanych przez różnych autorów (1, 2, 3, 4). Ważnym wyznacznikiem stabilności termicznej enzymów są siły oraz interakcje niekowalencyjne odpowiedzialne za pierwszo-, drugo- oraz trzeciorzędowe struktury białek enzymatycznych. Są to najczęściej oddziaływania elektrostatyczne par jonowych, wiązania wodorowe lub interakcje hydrofobowe (5). Poprawę stabilności termicznej enzymów można uzyskać głównie poprzez zmiany w strukturze pierwszorzędowej. Określenie różnic strukturalnych enzymów opiera się na statystycznej analizie korelacji pomiędzy zmianami temperatury oraz takimi parametrami jak: dostępna powierzchnia cząsteczki (6), indeks alifatyczny (7) lub hydrofobowość (8).

W ocenie termostabilności enzymów zwraca się uwagę na zawartość niektórych aminokwasów. Skład aminokwasowy enzymów termostabilnych różni się od składu aminokwasów enzymów termolabilnych (7). Różnice dotyczą przede wszystkim zawartości alaniny, waliny, izoleucyny i leucyny. Do porównania termostabilności enzymów zaproponowano



obliczanie indeksu alifatycznego wg następującej zależności:

$$I_A = x_A + ax_w + b(x_{IL} + x_L)$$

gdzie:

$I_A$  — indeks alifatyczny,

$x_A$  — zawartość alaniny w % ciężaru cząsteczkowego białka enzymu

$x_w$  — zawartość waliny w % ciężaru cząsteczkowego białka enzymu

$x_{IL}$  — zawartość izoleucyny w % ciężaru cząsteczkowego białka enzymu

$x_L$  — zawartość leacyny w % ciężaru cząsteczkowego białka enzymu

współczynniki

$$a = 2,9 \pm 0,1$$

$$b = 3,9 \pm 0,1$$

Z badań I k a i (7) wynika, że indeks alifatyczny obliczony dla termostabilnej dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej (EC.1.2.1.12) wynosi 103, a dla formy termolabilnej tego enzymu 89, natomiast dla dehydrogenazy kwasu mlekowego (EC.1.1.2.3) wartości indeksu alifatycznego wynoszą odpowiednio 98 oraz 88. Oznaczanie indeksu alifatycznego dotyczy jedynie składu aminokwasów bez ich rozmieszczenia przestrzennego. Istnieją więc niejasności w teoretycznej interpretacji otrzymywanych wyników. Lepsze efekty uzyskuje się poprzez wskazanie w enzymach termostabilnych i termolabilnych umiejscowienia aminokwasów odpowiedzialnych za daną cechę enzymu. Zmusza to do analizy sekwencji aminokwasów w białkach enzymatycznych.

W tabeli 1 przedstawiono porównanie właściwości form termostabilnych oraz termolabilnych: ferrodoksyny EC.1.18.1.2, lizozymu EC.3.2.1.17, kinazy fosfoglicerynianowej EC.2.7.2.3, dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej EC.1.2.1.12 oraz monooksygenazy monofenolowej EC.1.14.18.1.

Stabilność termiczną enzymów wyrażano za pomocą:

— czasu niezbędnego do zmniejszenia aktywności o 50% —  $t_{1/2}$ , wyznaczonego w znanych warunkach inkubacji enzymu,

— temperatury topnienia  $T_m$ , wyznaczonej metodą różnicowej kolorymetrii skanningowej,

— temperatury, przy której aktywność enzymu w wyznaczonym czasie jest zmniejszona o 50% —  $T_{50}$ , np. aktywność dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej z *Bacillus stearothermophilus* jest zmniejszona o 50% po 20 minutach ogrzewania w 75°C a odpowiednie zmniejszenie aktywności termostabilnej formy dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej z *Thermus aquaticus* występuje po 20 min. ogrzewania w 100°C.

Jednym z czynników decydujących o termostabilności enzymów jest wytwarzanie w nich nowych par jonowych (9). W mezofilnej formie ferrodoksyny występują aminokwasy hydrofobowe, które w formie termofilnej tego enzymu są zamienione przez aminokwasy z resztami naładowanymi elektrycznie. Są one rozmieszczone na powierzchni cząsteczki ferredoksyny i powiązane elektrostatycznie (10). Aminokwasy, które łączą się ze sobą zaznaczono klamrami (tabela 1).

Tabela 1

Porównanie właściwości termolabilnych i termostabilnych form wybranych enzymów (8)

Enzym	Ciężar cząsteczkowy	Źródło i aktywność enzymu		Różnice w strukturze białek enzymatycznych	Wpływ czynnika
		termolabilne	termostabilne		
Ferredoksyna	6 000	C. past. 70°C $t_{1/2} = 40$ min.	C. Therm. 70°C $t_{1/2} = 465$ min.	Ser <sub>7</sub> → Gln Val <sub>53</sub> → Lys Ser <sub>2,4</sub> → His Gln <sub>2,5</sub> → Gln Ile <sub>2,9</sub> → Lys Val <sub>31</sub> → Gln	1. Formowanie par jonów 2. Formowanie wiązań wodorowych
Lizozym	14 300	T <sub>u</sub> -t <sub>s</sub> T <sub>M</sub> = 39°C	T <sub>u</sub> -wt T <sub>M</sub> = 53	His <sub>96</sub> → Arg	Zmniejszenie wewnętrznej hydrofobowości
Kinaza fosfoglicerynianowa	43 000	Hum-Abnl 45°C $t_{1/2} = 3$	Hum-Nrml 45°C $t_{1/2} = 160$ min.	Asn <sub>268</sub> → Asp	Tworzenie par jonowych
Dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa	140 000	homar 20 min. T <sub>50%</sub> = 58°C B.st. 20 min. T <sub>50%</sub> = 75°C	B.st. 20 min. T <sub>50%</sub> = 75°C T.ag. 20 min. T <sub>50%</sub> = 100°C	130 podmian  Przemieszczanie reszt hydrofobowych w cząsteczce	1. Powstawanie par jonów 2. Nowe wewnętrzne interakcje hydrofobowe 1. Blokowanie wody 2. Nowe interakcje hydrofobowe
Monooksygenaza monofenolowa (tyrozynaza)	46 000	N.cr.-TL 60°C $t_{1/2} = 4$ min.	N.cr.-Ts 60°C $t_{1/2} = 70$ min.	Asn <sub>201</sub> → Asp	Nowe pary jonów

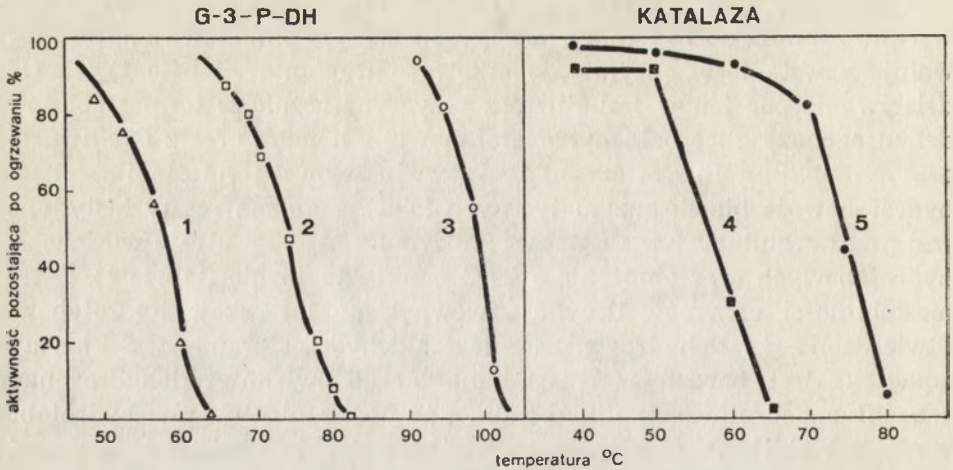
Objaśnienia: C. past. — *Clostridium pasteurianum*, C. Therm. — *Clostridium thermosaccharobiticum*, T<sub>4</sub>-T<sub>5</sub> — Bakteriofag, t<sub>4</sub> — Wrażliwy na temperaturę mutant, T<sub>4</sub> — wt — Bakteriofag, T<sub>4</sub> — Dzikoty, Hum-Abnl — Ludzka (nienormalna), Hum-Nrml = Ludzka (normalna), B.st. = *Bacillus stearothermophilus*, T.ag. = *Thermus aquaticus*, N.cr.TI = *Neurospora Crassa*-termolabilna, N.cr.T<sub>5</sub> = *Neurospora Crassa*-termostabilna,

Czas połowicznej inaktywacji tyrozynazy z *Neurospora crassa* w 60°C wzrasta z 4 min. do 70 min. po substytucji jednego aminokwasu, która wywołuje powstanie w enzymie dodatkowej pary jonów (tabela 1) (4). Oddziaływanie par jonów jest również przyczyną różnic w termostabilności dehydrogenazy gliceroaldehydrofosforanowej z homara oraz z *Bacillus stearothermophilus*. Innym czynnikiem decydującym o termostabilności jest hydrofobowość białek enzymatycznych (8,11). Zamiana reszty histydynowej przez argininową w cząsteczce lizozymu powoduje utratę właściwości hydrofobowych oraz obniżenie o 14°C punktu topnienia (tabela 1). O termostabilności enzymów decydują wewnętrzne interakcje hydrofobowe. Stwierdzono, że dehydrogenaza gliceroaldehydrofosforanowa z *Thermus aquaticus* jest bardziej termostabilna od odpowiedniej dehydrogenazy z *Bacillus stearothermophilus* pomimo, że ilość aminokwasów hydrofobowych jest zbliżona. O różnicy termostabilności decyduje rozmieszczenie reszt hydrofobowych w cząsteczce. W dehydrogenazie z *Thermus aquaticus* występuje więcej reszt hydrofobowych w pierwszorzędowej strukturze białek enzymatycznych i w rezultacie posiada ona większą wewnętrzną hydrofobowość (8, 11).

Termostabilność enzymów zależy również od innych czynników np. możliwości wiązania metali (12, 13, 14), od rodzaju wiązania z substratem (3) oraz od glikozylacji (15, 16). W ocenie termostabilności enzymów uwzględnia się również wpływ kwasowości środowiska na reakcje enzymatyczne. Na przykład  $\beta$ -D-galaktozydaza EC.3.2.1.23, z *Aspergillus niger*, jeden z bardziej termostabilnych enzymów dopuszczonych do żywności może być stosowany w środowisku o pH 3,5. Stosowanie  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Aspergillus niger* do hydrolizy w mleku (pH 6,5) nie jest zalecane, gdyż w tych warunkach wykazuje ona jedynie 5% maksymalnej aktywności (8).

Termostabilność enzymów różnego pochodzenia nie jest jednakowa (Ryc. 1). Enzymy termostabilne są najczęściej syntetyzowane przez mikroorganizmy termofilne. Do najlepiej poznanych źródeł enzymów termofilnych zaliczyć można *Thermus aquaticus*, *Bacillus stearothermophilus*, drobnoustroje, które rozmnażają się w temperaturze powyżej 60°C. Przydatność tych organizmów do biosyntezy enzymów, z wyjątkiem  $\alpha$ -amylazy, EC.3.2.1.1. z *Bacillus stearothermophilus* stosowanych w żywności nie była dotychczas badana (14, 17).

Większą uwagę w biosyntezie enzymów zwraca się na drobnoustroje mezofilne lub względnie termofilne. Zazwyczaj enzymy stosowane w technologii żywności otrzymuje się z różnych szczepów: *Aspergillus*, *Bacillus* lub z drożdży. Enzymy syntetyzowane przez pleśnie i bakterie są na ogół bardziej termostabilne od enzymów syntetyzowanych przez drożdże. Często drobnoustroje syntetyzują enzymy stabilne w temperaturach znacznie przewyższających optymalne temperatury ich rozwoju. Na przykład optymalna temperatura rozwoju *Aspergillus niger* mieści się w gra-



Ryc. 1. Termostabilność dehydrogenazy gliceroaldehidofosforanowej oraz katalazy z różnych źródeł (8).

Symbole dehydrogenazy gliceroaldehidofosforanowej:  $\Delta$  — z królika,  $\square$  — z *Bacillus stearothermophilus*,  $\circ$  — z *Thermus aquaticus*. Symbole katalazy:  $\blacksquare$  — z wątroby wołowej,  $\bullet$  — *Aspergillus niger*.

nicach 30—40°C ale syntetyzowana przez ten szczep katalaza EC.1.11.1.6. jest stabilna w temperaturze powyżej 60°C (8, 18). Poszukiwanie mikroorganizmów, które syntetyzują enzymy termostabilne, przydatne w technologii żywności jest nadal aktualne. Kontynuowane są również badania nad otrzymywaniem, oczyszczaniem oraz immobilizacją enzymów termostabilnych. Do lepiej poznanych enzymów stosowanych w przemyśle spożywczym zalicza się hydrolazy węglowodanów.

### III. Termostabilność hydrolaz węglowodanów

#### III-1. Amylazy, (1,4,α-D-glukan glukanohydrolazy) EC.3.2.1.1., EC.3.2.1.2.

Amylazy są stosowane w przemyśle piwowarskim, gorzelnicznym, piekarskim, w technologii produkcji syropów cukrowych oraz glukozy. Substratem reakcji z amylazą jest skrobia zbóż lub ziemniaków. W pierwszym etapie skrobia jest hydrolizowana przez amylazy do dekstryn a następnie do maltozy. Pełną przemianę skrobi do glukozy można otrzymać stosując oprócz amylaz takie enzymy jak: egzo-1,4-α-D-glukozydaza (amyloglukozydaza) EC.3.2.1.3. oraz pululanaza (1,6-glukan hydrolaza) — EC.3.2.1.41. (8,19).

Właściwości niektórych α-amylaz pochodzenia mikrobiologicznego przedstawiono w tabeli 2. Ich termostabilność oraz wrażliwość na zmiany pH bardzo się różnią. Pod względem termostabilności najlepsza jest

$\alpha$ -amylaza z *Bacillus licheniformis*. Optymalna temperatura reakcji tego enzymu ze skrobią wynosi 90°C. Jedną z głównych przeszkód w stosowaniu tej amylazy do tradycyjnej dwustopniowej hydrolizy skrobi jest niekorzystne, alkaliczne optimum pH (tabela 2). Wymaga to korygowania pH od 4,5 do 8 przed reakcją  $\alpha$ -amylazy ze skrobią a następnie przed reakcją z amyloglukozydazą ponownie do pH 4,5. Różnice w optimum pH amylazy i amyloglukozydazy wykluczają również możliwości ich łącznej imobilizacji, bardzo przydatnej w ciągłej hydrolizie skrobi do glukozy.

Tabela 2

Właściwości niektórych  $\alpha$ -amylaz ze źródeł mikrobiologicznych (8)

Źródło	Ciężar cząsteczkowy	Zakres pH(a)	Temperatura optymalna (b)	Stabilność (c) °C
<i>Aspergillus oryzae</i>	56 000	4—6	55	50
<i>Bacillus subtilis</i> Na 64	48 000	5—7	55	50
<i>B. amyloliquefaciens</i> F	49 000	5—9	65	45
<i>B. stearothermophilus</i> B.S.1	48 000	5—6	65	50
1503-4	53 000	5,4—6,1	55	55(-Ca <sup>++</sup> )
<i>Bacillus</i> sp. 11-1S	54 000	1,5—4,0	70	60(+Ca <sup>++</sup> )
<i>B. acidocaldarius</i> 68	68 000	2—6	75	60
<i>B. licheniformis</i> NCIB 6346	63 000	5—10	90	75

(a) — Zakres pH w którym 80% aktywności jest zachowane, (b) — Temperatura przy której oznaczono maksimum aktywności, (c) — Możliwie najwyższa temperatura przy której ogrzewanie przez 30 min. umożliwia zatrzymanie 90% aktywności.

Pozostałe  $\alpha$ -amylazy przedstawione w tabeli 2 charakteryzują się znacznie niższą termostabilnością. W celu poprawy termostabilności amylaz np. z *Bacillus subtilis* i *Bacillus stearothermophilus* opracowano metody genetycznego doskonalenia tych szczepów. Otrzymano amylazy o wyższej odporności termicznej, o bardzo korzystnej aktywności przy kwasowości poniżej pH 4,0 oraz o niewielkich wymaganiach wobec Ca<sup>++</sup> (8, 18).

### III-2. Egzo-1,4- $\alpha$ -D-glukozydaza

W technologii produkcji glukozy, w browarnictwie, w gorzelnictwie amyloglukozydazę stosuje się do pełnej hydrolizy skrobi oraz dekstryn do glukozy. Preparaty amyloglukozydazy otrzymuje się głównie ze szczepów pleśni z rodzajów *Aspergillus* lub *Rhizopus*. Większość preparatów charakteryzuje się podobnymi właściwościami, optimum pH 4—6 i maksimum aktywności w temperaturze 55—65°C (8). W poszukiwaniu termostabilnej amyloglukozydazy wyselekcjonowano termofilne szczepy pleśni, które syntetyzują enzym o optymalnej temperaturze powyżej 70°C (20, 21).

### III-3. Pululanaza

Enzym hydrolizuje wiązania  $\alpha$ -1,6-glukozydowe w skrobi oraz w dekstrynach granicznych, pululanaza jest stosowana do poprawy wydajności enzymatycznej hydrolizy skrobi w technologii produkcji glukozy, w gorzelnictwie oraz w browarnictwie (22). Większość dotychczas znanych mikroorganizmów syntetyzuje pululanazę o optimum reakcji przy pH 5—7 w temperaturze 40—50°C (8). W temperaturze powyżej 60°C stwierdza się zmniejszenie aktywności enzymu. Źródłem pululanazy o podwyższonej termostabilności jest *Bacillus stearothermophilus* K. P.1064 (23). Enzym ten wykazuje 100% aktywności podczas ogrzewania przez 10 min. w temperaturze 65°C przy pH 6,0. W dalszym ciągu poszukuje się termostabilnej pululanazy reagującej z substratem w środowisku kwaśnym, która mogłaby być stosowana równocześnie z amyloglukozydazą w celu uzyskania najkorzystniejszego stopnia hydrolizy skrobi.

### III-4. $\beta$ -D-galaktozydaza (galaktohydrolaza $\beta$ -D-galaktozydów) EC.3.2.1.23.

Jest enzymem powszechnie stosowanym w przemyśle mleczarskim do hydrolizy laktozy w mleku lub w serwatce. Wśród preparatów  $\beta$ -D-galaktozydazy przeważają enzymy z pleśni lub z drożdży. Enzymy z pleśni są aktywne w środowisku kwaśnym o pH 3—4 i są bardzo przydatne do hydrolizy laktozy w serwatce (24). Natomiast enzymy z drożdży są aktywne w pH 6,0—7,0 i są stosowane do hydrolizy laktozy w mleku (tabela 3).  $\beta$ -D-galaktozydaza z drożdży jest znacznie mniej termostabilna od enzymu z pleśni (25).

Tabela 3

Właściwości niektórych preparatów  $\beta$ -D-galaktozydazy

Źródło	Ciężar cząsteczkowy (kilodaltony)	Zakres pH (a)	Temperatura optymalna (b) °C	Stabilność (c) °C
<i>Aspergillus niger</i>	123—173	2—4	60	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	4,5—5,5	65	65
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	201	6,5—7,0	45	40
<i>Kluyveromyces lactis</i>	—	6—7	40	30—35
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	215	6,0—6,4	65	50
<i>Streptococcus thermophilus</i>	500—600	6,5—7,5	55	50
<i>Mucor pusillus</i>	—	4,5—6,0	60	60
<i>Alternaria alternata</i>	—	4,5—5,5	60—70	60
<i>Thermus aquaticus</i>	570	4,5—5,5	80	70(d)

(a) — zakres pH w którym 80% aktywności enzymu jest utrzymywana, (b) — temperatura przy której oznaczono aktywność, (c) — temperatura przy której enzym ogrzewany przez 30 minut zachowuje 90% aktywności (d) — inkubowano przy pH 7,0.

Aktywną w środowisku o pH 6—7 termostabilną  $\beta$ -D-galaktozydazę otrzymano z *Bacillus stearothermophilus*; nadaje się ona do hydrolizy laktozy w 50°C (26). Źródłem termostabilnej  $\beta$ -D-galaktozydazy jest także szczep *Streptococcus thermophilus*; izolowany enzym jest stabilny w środowisku o temperaturze 50°C. Aktywność  $\beta$ -D-galaktozydazy z *Thermus aquaticus* jest stabilna w 70—80°C przy pH 5 (27, 28, 29). Poprawę termostabilności enzymu można uzyskać poprzez stosowanie  $\beta$ -D-galaktozydazy z dodatkiem preparatu białek serwatkowych. Umożliwia to prowadzenie hydrolizy laktozy w temperaturze o 5—10°C wyższej niż bez dodatku białek przy tej samej efektywności reakcji.

### III-5. Celulazy (1,4- $\beta$ -D-glukan 4-glukan hydrolaza) EC.3.2.1.4.

W przemyśle spożywczym celulazy stosuje się do poprawy właściwości strukturalnych i reologicznych różnych produktów roślinnych np. pod-

Tabela 4

Termostabilność celulaz z różnych źródeł (8)

Źródło	Substrat (a)	Zakres pH (b)	Optimum (c) temperatury °C	Stabilność (d) °C
<i>Aspergillus niger</i>	CMC	3,8—4,0	45	40
<i>Trichoderma reesei</i> R—10	FP	4,0—5,0	60	$t_{1/2}^{\circ} = 2h$
	CMC	4,5—5,0	50	24h
	ONPG	4,0—4,5	60	4h
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC 27405	CMC	5,5—7,0	70	30
	p-NPG	6,0	65	55—60
NCIS 10682	CMC	5,0	50	60
<i>Humicola insolens</i> YH—8	CMC	5,0	50	60
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	CMC(Celulaza I)	4,0—5,5	75	65
	CMC(Celulaza III)	4,0—5,5	65	65
	FP	4,0—5,5	68	65
	p-NPG	4,0—5,5	70	70
	CMC	5,5—7,0	70	65
<i>Thermomonospora</i> YX	p-NPG	6,2—6,6	55	55
	FP	4,0—5,5	65	$t_{1/2}^{\circ} = 24h$
<i>Thielavia terrestris</i>	CMC	3,0—4,5	65	24h
	ONPG	3,5—4,5	70	20h

(a) — CMC — karboksymetyloceluloza, FP — bibuła filtracyjna, ONPG = o-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd p-NPG = p-nitrofenylo- $\beta$ -D-galaktopiranozyd; (b) — zakres pH, w którym enzym wykazuje 80% aktywności; (c) — temperatura, w której enzym wykazuje najkorzystniejszą aktywność; (d) — w przybliżeniu najwyższa temperatura, przy której enzym może być ogrzewany przez 30 min. ze stratą 10% aktywności.

noszenia wydajności ekstrakcji soków owoców i warzyw, do izolowania białek z nasion roślin oleistych itp. Celulazy stosuje się również do przetwarzania produktów ubocznych przemysłu owocowo-warzywnego. Często stosuje się je łącznie z enzymem pektolitycznym — poligalakturonazą EC.3.2.1.15.

Celem otrzymania celulaz najczęściej stosuje się szczepy z rodzaju *Trichoderma*. Opracowano warunki hodowli pleśni, zapewniające dużą wydajność biosyntezy celulaz zewnątrzkomórkowych. Celulazy z *Trichoderma* są termolabilne i powyżej 50°C tracą aktywność (8).

W poszukiwaniu nowych źródeł celulaz przebadano liczne mikroorganizmy termofilne. Nowe źródła enzymów celulozowych przedstawiono w tabeli 4. Spośród wymienionych źródeł na podkreślenie zasługuje pleśń *Thielavia terrestris* syntetyzująca celulazy, które zachowują 50% aktywności nawet po gotowaniu przez 60 minut (8). Pozostałe mikroorganizmy wymienione w tabeli 4 również syntetyzują termostabilne celulazy. Zastosowanie tych szczepów w skali przemysłowej wymaga jednak zwiększenia wydajności biosyntezy celulaz zewnątrzkomórkowych.

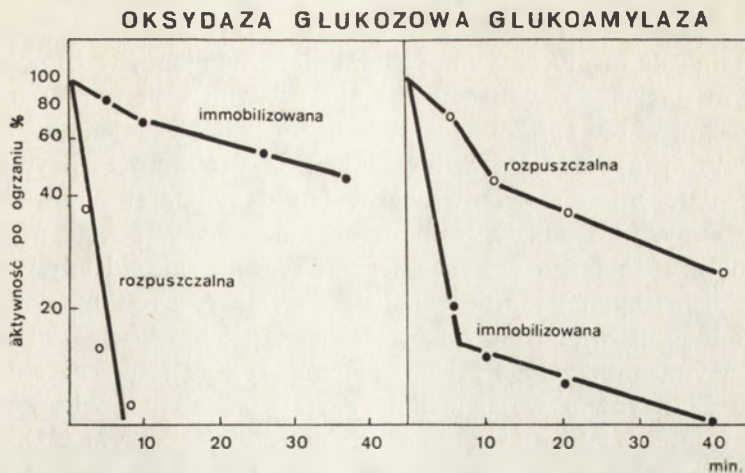
W zakresie poprawy właściwości celulaz opracowano metodę klonowania genów do odpowiednich plazmidów oraz otrzymano mutanty syntetyzujące celulazy przydatne do hydrolizy celulozy oraz jej pochodnych w produktach ubocznych przemysłu drzewnego i papierniczego (8, 30).

#### IV. Metody zwiększania termostabilności enzymów

##### IV-1. Immobilizacja enzymów

Analiza różnych metod immobilizacji enzymów sugeruje, że efekty zwiększenia ich termostabilności zależą od techniki wiązania oraz od rodzaju enzymów. Na przykład adsorpcja oraz wiązanie z aldehydem glutarowym oksydazy glukozy EC.1.1.3.4. oraz amyloglukozydazy na kulczkach szklanych powleczonych polietyleniminą w odmienny sposób oddziałują na termostabilność enzymów. Immobilizacja oksydazy glukozy spowodowała (w porównaniu do postaci natywnej enzymu) wydłużenie czasu połowicznej inaktywacji z 2 do 35 minut w wariacie, gdzie do unieruchamiania stosowano aldehyd glutarowy oraz do 27 minut w przypadku enzymu zaadsorbowanego na nośniku z pominięciem aldehydu glutarowego. Natomiast zastosowana metoda immobilizacji spowodowała skrócenie czasu połowicznej inaktywacji amyloglukozydazy do 7 minut (ryc. 2). W praktyce trudno jest przewidzieć w jaki sposób immobilizacja wpłynie na termostabilność enzymów (31). Wiadomo jednak, że wywołuje ona zmiany w białkach enzymatycznych, które zależnie od wiązania z nośnikiem współdecydują o właściwościach enzymu.





**Ryc. 2.** Wpływ immobilizacji na polietyloiminie na termostabilność oksydazy glukozowej (61°C) oraz glucoamylazy (68°C).

Bissett i Sternberg (31) stwierdzili, że immobilizacja oksydazy glukozowej na chitosanie z użyciem aldehydu glutarowego powoduje zwiększenie termostabilności w 65°C wyrażoną przedłużonym czasem połowicznej inaktywacji enzymu z 0,5 do 252 godzin. Enzymem wykazującym zarówno zmniejszenie jak i zwiększenie termostabilności w zależności od rodzaju nośnika stosowanego do immobilizacji jest inwertaza ( $\beta$ -D-frukto-furanozydo, fruktohydrolaza EC.3.2.1.26.) (32). Zwiększenie termostabilności uzyskano po unieruchomieniu enzymu na celulozie mikrokrystalicznej lub na sepharozie. Natomiast zastosowanie nośników jonowych np. DEAE celulozy lub CM-Sephadex spowodowało zmniejszenie termostabilności inwertazy. Przypuszcza się, że przyczyną zmniejszenia termostabilności inwertazy jest rozrywanie krytycznych wiązań wewnętrznych poprzez oddziaływanie jonowych grup w nośnikach. Metodą immobilizacji, która może zwiększyć termostabilność enzymów jest ich zamykanie w żelach.

Basavaswara, Rao i inni (21) unieruchamiali oksydazę glukozową z *Aspergillus niger* oraz amyloglukozydazę z *Thermomyces lanuginosus* i *Rhizopus* sp. wewnątrz żelów: poliakrylowego lub poliakryloamidowego. Stabilność termiczną enzymów natywnych oraz związanych w żelach porównywano poprzez oznaczanie ich aktywności w zakresie temperatur 40–78°C. Autorzy stwierdzili, że o stopniu immobilizowania enzymów oraz o ich termostabilności decyduje stężenie żelów w granicach 20–40%. Zwiększenie termostabilności oksydazy glukozowej otrzymano po jej unieruchomieniu w 20% żelu poliakryloamidowym, a amyloglukozydazy unieruchomionej w 40% żelu poliakrylowym. Okres połowicznej inaktywacji oksydazy glukozowej związanej w 20% żelu poliakryloamidowym w porównaniu z enzymem natywnym wzrósł 12-krotnie podczas

reakcji z substratem w 60°C. Porównanie aktywności amyloglukozydazy z *T. lannginosus* formy natywnej oraz unieruchomionej w 40% żelu poliakrylowym (podczas reakcji z substratem w 70°C), pozwoliło na ustalenie, że można w ten sposób zwiększyć okres połowicznej inaktywacji enzymu. Autorzy uzasadniają zwiększenie termostabilności enzymów elektrostatycznymi właściwościami żelów, ich dużym stężeniem (20—40%) a przede wszystkim oddziaływaniem niekowalentnych wiązań pomiędzy enzymami oraz żelami a w konsekwencji ochronnym oddziaływaniem żelów zmniejszających podatność białek enzymatycznych na denaturację. Efekty immobilizowania enzymów oraz zmian ich właściwości zależą od doboru enzymu oraz żelu. Potwierdzeniem tej tezy jest skrócenie (w porównaniu z enzymem w postaci natywnej) okresu połowicznej inaktywacji amyloglukozydazy związanej z żelem poliakrylowym (21). Prawdopodobnie elektrostatyczne oddziaływanie enzymu i żelu zamiast poprawić termostabilność amyloglukozydazy spowodowało zwiększenie jej podatności na denaturację termiczną.

Żele zastosowano również do immobilizacji całych komórek mikroorganizmów (8). Stwierdzono, że stabilność termiczna enzymów unieruchomionych w żelach zależy, między innymi, od rozmieszczenia enzymów w komórkach. Jeżeli enzym związany jest z błoną komórkową lub znajduje się wewnątrz ściany komórkowej wykazuje wówczas lepszą termostabilność od enzymów obecnych w protoplazmie komórki. Przyczyną zwiększonej termostabilności enzymów znajdujących się na powierzchni komórek jest bezpośrednia reakcja z żelem. Stwierdzono również, że o termostabilności izomerazy glukozy EC.5.3.1.18. w komórkach unieruchomionych w żelach decyduje utrwalanie chemiczne lub termiczne (8).

#### IV-2. Modyfikacja chemiczna

Modyfikacja chemiczna jest sposobem najczęściej stosowanym do zwiększenia termostabilności enzymów reagujących z nierozpuszczalnym substratem. Chemiczną modyfikację enzymów uzyskuje się poprzez:

- reakcję enzymów z odczynnikami jednofunkcyjnymi, o niskim ciężarze cząsteczkowym,
- sieciowanie tzn. sprzęganie enzymów z nośnikami z udziałem dialdehydów, karbimidów lub związków epoksydowych,
- wiązanie enzymów z polimerami np. z dekstranem.

Modyfikacja chemiczna enzymów przy zastosowaniu odczynników jednofunkcyjnych o niskim ciężarze cząsteczkowym powoduje zmiany ładunku na powierzchni enzymów. Dobór odczynników, które reagują z grupami funkcyjnymi enzymów wymaga ich eksperymentalnej selekcji. Po doborze odczynnika oraz optymalnych warunków reakcji można otrzymać znaczne zwiększenie stabilności termicznej enzymów. Przykładem

może być zwiększenie termostabilności dehydrogenazy kwasu mlekowego EC.1.1.2.3. po reakcji z metyloacetoimidem (33). Odczynniki dwufunkcyjne stosuje się w celu powiązania cząsteczek dwóch różnych białek z jednoczesnym ich zabezpieczeniem przed destabilizacją. Znanych jest wiele odczynników dwufunkcyjnych, przydatnych w wiązaniach poprzecznych. Przykładem mogą być glioksal, aldehyd malonowy oraz aldehyd glutarowy, który od dawna stosowany jest jako utrwalacz w przygotowaniu preparatów do mikroskopii elektronowej oraz w garbarstwie. Aldehyd glutarowy jest odczynnikiem często stosowanym do modyfikacji oraz wiązania enzymów z nośnikami. Łatwo reaguje z grupą  $\epsilon$ -aminową lizyny. Połączenie aldehydu glutarowego z oksydazą glukozową poprawiło stabilność termiczną enzymu (18).

Do metod najkorzystniej oddziaływujących na termostabilność enzymów zalicza się ich wiązanie z polimerami. Szczególnie interesująca jest technika kowalentnego wiązania enzymów z dekstranem, aktywowanym bromkiem cyjanu. Marshal i Rabinowitz (34) oraz Blomhoff i Christensen (35) poprawili termostabilność  $\beta$ -D-galaktozydazy poprzez reakcję z acetylowanym dekstranem (tabela 5).

Tabela 5

Termostabilność enzymów związanych z dekstranem

Enzym	Temperatura (°C)	Czas ogrzewania (min)	Aktywność (%)	
			naturalny	modyfikowany
$\alpha$ -amylaza (a)	65	30	0	70
$\beta$ -amylaza (b)	60	30	10	90
katalaza (c)	52	60	40	90
$\beta$ -D-galaktozydaza (d)	50	180	10	92
$\beta$ -D-galaktozydaza stabilizowana acetylowanym dekstranem	50	180	10	100
$\beta$ -D-galaktozydaza stabilizowana metylowanym dekstranem	50	180	10	85

(a) — *Bacillus amyloliquefaciens*, (b) — słodkie ziemniaki, (c) — wątroba wołowa, (d) — jelita wołowe.

Do modyfikacji struktury białek enzymatycznych może być również stosowany dekstran metylowany. Jego oddziaływanie na stabilność termiczną enzymów jest jednak mniejsze niż dekstranu acetylowanego (18). Czynnikiem decydującym o poprawie termostabilności enzymów są wiązania wodorowe pomiędzy enzymami a polimerami. Polimery spełniają funkcję ochronną wobec enzymów w czasie reakcji prowadzonych w wyższych temperaturach. Do poprawy termostabilności enzymów stosuje się: laktozę, alkohol poliwinylowy oraz glikol polietylenowy (36, 37, 38).

#### IV-3. Metody stosowane w biosyntezie enzymów

Postęp w biotechnologii enzymów zwykle polega na zwiększeniu syntezy danego produktu bądź na otrzymaniu nowego szczepu produkującego enzym o korzystniejszych parametrach.

Jednym ze sposobów zwiększenia wydajności w produkcji enzymów jest stosowanie induktorów. Induktory są już powszechnie stosowane w przemysłowej produkcji enzymów jak np. wprowadzanie substratu do hodowli drobnoustrojów. Szczególną uwagę zwraca się obecnie na zmniejszenie lub całkowite wyeliminowanie represji powodowanej przez produkty przemiany materii drobnoustrojów, a także hamujący wpływ produktu końcowego.

Mutagenesa jest również powszechnie stosowanym sposobem otrzymywania nowych szczepów produkujących zazwyczaj 2—10-krotnie więcej enzymu niż szczep macierzysty (8).

Inną możliwością otrzymywania nowych szczepów jest transformacja. Y o n e d a (44) otrzymał szczep produkujący 250 razy więcej  $\alpha$ -amylazy poprzez transformację DNA izolowanego ze szczepu dzikiego *Bacillus subtilis* var. *amylosaccharificus* do szczepu *Bacillus subtilis* Marburg 6160. Zwiększenie produkcji enzymu nastąpiło wskutek synergistycznego współdziałania pięciu genów. Możliwość selektywnego przenoszenia genów jednego organizmu do innego pozwala na syntezę enzymów termofilnych w organizmach takich jak: *Bacillus subtilis* lub drożdże.

S h i n o m i j a i w s p. (40, 41) przeprowadzili transformację DNA z niezidentyfikowanego szczepu bakterii termofilnych do szczepu *Bacillus subtilis* nie wytwarzającego  $\alpha$ -amylazy. Szczep otrzymany po transformacji DNA syntetyzował  $\alpha$ -amylazę o termostabilności podobnej do właściwości szczepu donora.

Połączenie metody mutacji i transformacji pozwoliło na otrzymanie szczepu *Bacillus subtilis* wytwarzającego 1500 do 2000 razy więcej  $\alpha$ -amylazy niż produkował go szczep macierzysty (39).

W literaturze pojawiają się informacje o możliwości klonowania genów jako metody poprawy cech osobniczych organizmów syntetyzujących enzymy lub też zwiększania wydajności przez łączenie genów strukturalnych z bardziej wydajnymi promotorami. W a s s e r m a n (8) podaje, że C o r n e l i s i w s p. przeprowadzili klonowanie genów odpowiedzialnych za syntezę  $\alpha$ -amylazy z *Bacillus coagulans* w *Escherichia coli* stosując fagi jako wektory. W komórkach *E. coli* zawierających hybrydowy fag (niosący gen  $\alpha$ -amylazy) stwierdzono aktywność enzymu o termostabilności charakterystycznej dla *B. coagulans*. Wasserman (8) podaje również, że P a l v a sklonował gen odpowiedzialny za syntezę  $\alpha$ -amylazy z *Bacillus amyloliquefaciens* w *Bacillus subtilis*, stosując metodę tzw. podwójną z wykorzystaniem plazmidu p UB. 110. Aktywność amylazy w pozakomórkowym ekstrakcie z *B. subtilis* była 2500

razy wyższa od aktywności odpowiedniego enzymu w ekstrakcie wydzielanym przez komórki gospodarza. Wasserman (8) za Ortleppem podaje, że poprzez transformację plazmidu p SA.33 pochodzącego z *B. licheniformis* do *B. subtilis* można otrzymać wyraźnie wyższą termostabilność  $\alpha$ -amylazy syntetyzowanej przez *B. subtilis*. Fuji i wsp. /43/ gen z *B. stearothermophilus* CU—21 odpowiedzialny za syntezę neutralnej proteazy klonowali w *B. subtilis* lub w *B. stearothermophilus*, szczepy pozbawione zdolności biosyntezy proteazy neutralnej. Po sklonowaniu obydwu szczepów wykazywały zdolność syntezy neutralnej proteazy o termostabilności odpowiadającej termostabilności proteazy z *B. stearothermophilus* CU—21.

Przedstawione przykłady świadczą o wykorzystaniu metod inżynierii genetycznej w biotechnologii. Połączenie metod inżynierii genetycznej ze znajomością struktury enzymów stwarza duże możliwości w sterowaniu biosyntezą enzymów o zwiększonej termostabilności.

## V. Podsumowanie

W opracowaniu przedstawiono charakterystykę enzymów termostabilnych stosowanych w technologii żywności. Szczególną uwagę zwrócono na enzymy hydrolizujące węglowodany. Przedstawiono również metody poprawy termostabilności enzymów. Podano przykłady modyfikacji chemicznej, immobilizacji enzymów, doskonalenia genetycznego mikroorganizmów syntetyzujących enzymy. Przykłady te są potwierdzeniem postępu biotechnologii produkcji enzymów o pożądanych właściwościach, w tym również o podwyższonej termostabilności.

Zaakceptowano do druku 22 kwietnia 1986 r.

## PIŚMIENNICTWO

1. Back J. F., Oakenfull D., Smith M. B., (1979), *Biochem.*, **18**, 5191—5201.
2. Bull H. B., Breese K., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 681—692.
3. Pace C. N., McGrath T., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 3862—3869.
4. Rüegg C., Ammer O., Lerch K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6420—6431.
5. Singleton R., Amelunxen R. E., (1973), *Bacteriol. Rev.*, **37**, 320—342.
6. Stellwagen E., Wilgus H., (1978), *Nature*, **275**, 342—343.
7. Ikai A., (1980), *J. Biochem.*, **88**, 1895—1902.
8. Wasserman B. P., (1984), *Food Technol.*, **38**, 78—89.
9. Perutz M. F., (1978), *Science*, **201**, 1187—1191.
10. Perutz M. F., Raidt M., (1975), *Nature*, **255**, 256—259.
11. Walker J. E., Wonacolt A. J., Harris J. I., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **108**, 581—586.
12. Dahlquist F. W., Long J. W., Bigbec W. L., (1976), *Biochem.*, **15**, 1103—1109.

13. Frommel C., Hohne W. E., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **670**, 25—31.
14. Pfueller S. L., Elliott W. H., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 48—59.
15. Chu F. K., Trimble R. B., Maley F., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8691—8699.
16. Hayashiola S., Yoshioka H., (1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1721—1730.
17. Ogasahara K., Imanishi A., Isamura T., (1970), *J. Biochem.*, **67**, 77—87.
18. Wasserman B. P., Hultin H. O., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 385—391.
19. Kindle K. L., (1983), *Appl. Biochem. Biotech.*, **8**, 153—164.
20. Basavaswara Rao V., Sastri N. V. S., Subba Rao P. V., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 379—389.
21. Basavaswara Rao V., Sastri N. V. S., Subba Rao P. V., (1981), *Biochem. J.*, **193**, 389—397.
22. Ram K. A., Venkatasubramanian K., (1982), *Biotech. Bioeng.*, **24**, 355—363.
23. Suzuki Y., Chishiro M., (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **17**, 24—37.
24. Nevalainen K. M., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 593—601.
25. Park Y. K., De Santi M. S. S., Pastore G. M., (1979), *J. Food Sci.*, **44**, 100—103.
26. Goodman R. E., Pederson D. M., (1976), *Can. J. Microbiol.*, **22**, 817—825.
27. Greenberg N. A., Mahoney R. R., (1982), *J. Food Sci.*, **47**, 1824—1828.
28. Ramana Rao M. V., Dutta S. M., (1981), *J. Food Sci.*, **46**, 1419—1423.
29. Ulrich J. T., McFeters G. A., Temple K. L., (1972), *J. Bacteriol.*, **110**, 691—698.
30. Montenecourt B. S., Eveleigh D. E., (1977), *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 777—785.
31. Bissett F., Sternberg D., (1978), *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 750—755.
32. Woodward J., Wiseman A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 8—16.
33. Tueugler P., Pfleiderer G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **484**, 1—13.
34. Marshall J. J., Rabinowitz M. L., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 777—789.
35. Blomhoff H. K., Christensen T. B., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **743**, 401—409.
36. Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., van Es T., Davis F. F., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3582—3587.
37. Hixon H. F., (1973), *Biotech. Bioeng.*, **15**, 1011—1016.
38. Marsh J. W., Denis J., Wriston J. C., (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 7678—7685.
39. Mitotsuyanagi K., Yamano K., Maruo B., (1979), *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2343—2351.
40. Shinomiya S., Yamano K., Oshima T., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 175—184.
41. Shinomiya S., Oshima T., Yamano K., (1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 345—352.
42. Takeichi Y., Ohmura K., Nakamura A., Otozai K., Yamane Y., (1983), *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 159—168.
43. Fuji M., Takaga M., Imanaka T., Aiba S., (1983), *J. Bacteriol.*, **154**, 831—838.
44. Yoneda Y., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 274—276.

## SPIS TREŚCI — TOM 32, 1986

### ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

J. Kuźnicki — Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część I. Miozyna komórek mięśniowych . . . . .	15
J. Kuźnicki — Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część II. Miozyna mięśniowa . . . . .	35
Z. A. Wojciechowski — Białkowe aktywatory biosyntezy i metabolizm cholesterolu . . . . .	59
W. Janiszowska — Biosynteza tokoferoli . . . . .	79
A. Jerzmanowski — Rola histonu H-1 w strukturze chromosomów . . . . .	97
K. Staroń — Mitotyczna kondensacja chromosomów . . . . .	129
M. Garstka — Regulacja cyklu mocznikowego . . . . .	147
E. Piasecki — Struktura interferonów . . . . .	187
P. P. Liberski — Struktura czynnika infekcyjnego <i>scrapie</i> . . . . .	203
J. Kuźnicki, K. Famulski — Rola kinaz białkowych i fosfatyzacji w regulacji metabolizmu glikogenu . . . . .	283
K. Bogucka — Kompleks ATPazy transportującej białka . . . . .	299
J. Dziuba — Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej struktury kazeiny . . . . .	333
W. Dobryszczycka — Wpływ modyfikacji struktury haptoglobiny na jej właściwości biologiczne . . . . .	351
W. Rode — Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych . . . . .	401
J. Wild — Fuzje genów w badaniach regulacji ekspresji i w analizie białek. Zastosowanie fuzji <i>lac</i> . . . . .	421
A. Kurdowska — Struktura, zmiany konformacyjne i funkcja $\alpha_2$ -makroglobuliny . . . . .	445
W. Bednarski, J. Kowalewska-Piontas — Enzymy termostabilne w technologii żywności . . . . .	469

### MINIREVIEWS

B. Sieliwanowicz — Struktura i funkcja 3'-końcowych sekwencji eukariotycznych mRNA . . . . .	173
J. Kwiatkowska — Fosfolipidy izotylole w przetwarzaniu informacji w komórkach . . . . .	327
H. Szafran — Biologiczne aktywne peptydy przewodu pokarmowego i trzustki . . . . .	363
B. Bartłomowicz — Wątrobowy cytochrom P-450 . . . . .	459

### NOWE W BIOCHEMII

H. Wehr — Nagroda Nobla w roku 1985 za osiągnięcia z dziedziny Fizjologii lub Medycyny . . . . .	395
--	-----

## Z HISTORII BIOCHEMII

E. Lisowska — Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych . . . . .	5
---	---

## SŁOWNICTWO BIOCHEMICZNE

E. Kopieczna-Grzebieniak, D. Jakubowska — Synteza czy syntetaza karbomioilofosforanowa? . . . . .	225
Uwagi Komisji Słownictwa Biochemicznego na temat nazw „syntazy” i „syntetazy” (tłum. J. Kwiatkowska) . . . . .	227
J. K. Parnas — W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej (fragmenty) . . . . .	371
Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego. Zmiany w słownictwie enzymów (J. Kwiatkowska) . . . . .	373

## KRONIKA

W setną rocznicę urodzin Jakuba Karola Parnasa . . . . .	243
W. S. Ostrowski — Jakub Karol Parnas — Życie i twórczość . . . . .	245
W. Mejbaum-Katzenellenbogen — Jakub Karol Parnas we wspomnieniach Wandy Mejbaum . . . . .	259
Spis publikacji Jakuba Karola Parnasa i Jego współpracowników . . . . .	263
Kurs FEBS na temat „Izolowanie i charakterystyka białek błonowych: aspekty biochemiczne i biofizyczne” we Włoszech (M. Michalik) . . . . .	377
Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie (A. Kordowiak, Z. Żak) . . . . .	379
Dwudziestopięciolecie Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (Z. Machoy, D. Samojoł) . . . . .	382

## RECENZJA KSIĄŻKI

J. Kączkowski — „Pflanzenphysiologie” . . . . .	385
---	-----

## INDEKS AUTORÓW — TOM 32, 1986

B	
Bartłomowicz B. — Wątrobowy cytochrom P-450 . . . . .	459
Bednarski W., Kowalewska-Piontas — Enzymy termostabilne w technologii żywności . . . . .	469
Bogucka K. — Kompleks ATPazy transportującej protony . . . . .	299
D	
Dobryczycka W. — Wpływ modyfikacji struktury haptoglobiny na jej właściwości biologiczne . . . . .	351
Dziuba J. — Molekularne i koloidalne aspekty micelarnej struktury kazeiny . . . . .	333



F		
Famulski K. — (patrz J. Kuźnicki, K. Famulski) . . . . .		283
G		
Garstka M. — Regulacja cyklu mocznikowego . . . . .		147
J		
Jakubowska D. — (patrz E. Kopieczna-Grzebieniak, D. Jakubowska) . . . . .		225
Janiszowska W. — Biosynteza tokoferoli . . . . .		79
Jerzmanowski A. — Rola histonu H-1 w strukturze chromosomów . . . . .		97
K		
Kączkowski J. — recenzja książki „Pflanzenphysiologie” . . . . .		385
Kopieczna-Grzebieniak E., Jakubowska D. — Synteza czy syntetaza karbomioilofosforanowa? . . . . .		225
Kordowiak A., Żak Z. — XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Krakowie . . . . .		379
Kurdowska A. — Struktura, zmiany konformacyjne i funkcje $\alpha_2$ -makroglobuliny . . . . .		445
Kuźnicki J. — Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część I. Miozyna komórek mięśniowych . . . . .		15
Kuźnicki J. — Fosforylacja miozyny <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> . Część II. Miozyna mięśniowa . . . . .		35
Kuźnicki J., Famulski K. — Rola kinaz białkowych i fosfatyzacji w regulacji metabolizmu glikogenu . . . . .		283
Kwiatkowska J. Fosfolipidy izotylole w przetwarzaniu informat nazw „syntazy” i „syntetazy” . . . . .		327
Kwiatkowska J. Uwagi Komisji Słownictwa Biochemicznego na temat nazw „syntazy i „syntetazy” . . . . .		227
Kwiatkowska J. — Komunikat Komisji Słownictwa Biochemicznego. Zmiany w słownictwie enzymów . . . . .		373
L		
Liberski P. P. — Struktura czynnika infekcyjnego <i>scrapie</i> . . . . .		203
Lisowska E. — Przeciwciała monoklonalne i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych . . . . .		5
M		
Machoy Z., Samojło D. — Dwudziestopięciolecie Oddziału Szczecińskiego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .		382
Mejbaum-Katzenellenbogen W. — Jakub Karol Parnas we wspomnieniach Wandy Mejbaum . . . . .		259
Michalik M. — Kurs FEBS na temat: „Izolowanie i charakterystyka białek błonowych i aspekty biochemiczne i biofizyczne” we Włoszech . . . . .		377
O		
Ostrowski W. S. — Jakub Karol Parnas — Życie i twórczość . . . . .		245

## P

- Parnas J. K. — W sprawie polskiej terminologii fizjologiczno-chemicznej (fragmenty) . . . . . 371  
Piasecki E. — Struktura interferonów . . . . . 185

## R

- Rode W. — Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych . . . . . 401

## S

- Samojło D. — (patrz Z. Machoy, D. Samojło) . . . . . 382  
Sieliwanowicz B. — Struktura i funkcja 3'-końcowych sekwencji eukariotycznych mRNA . . . . . 173  
Staroń K. — Mitotyczna kondensacja chromosomów . . . . . 129  
Szafran H. — Biologiczne aktywne peptydy przewodu pokarmowego i trzustki . . . . . 363

## W

- Wild J. — Funkcje genów w badaniach regulacji ekspresji i w analizie białek. Zastosowanie fuzji *lac* . . . . . 421  
Wehr H. — Nagroda Nobla w roku 1985 za osiągnięcia z dziedziny Fizjologii i Medycyny . . . . . 395  
Wojciechowski Z. A. — Białkowe aktywatory biosyntezy i metabolizm cholesterolu . . . . . 59

## Ż

- Żak Z. — (patrz A. Kordowiak, Z. Żak) . . . . . 379

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 omawiając przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawionej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnośniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 271, 1 np.

Pispa 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 stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Langmans 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. Tytuły tabel 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 podejmie 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 maszynopis i ilustracje przed pogięciem.

## SPIS TREŚCI

	str.
<b>Z historii biochemii:</b>	
H. Wehr — Nagroda Nobla w roku 1985 za osiągnięcia z dziedziny Fizjologii lub Medycyny . . . . .	395
<b>Artykuły:</b>	
W. Rode — Biosynteza tymidylanu: rola biologiczna i regulacja w komórkach zwierzęcych . . . . .	401
J. Wild — Fuzje genów w badaniach regulacji ekspresji i w analizie białek. Zastosowanie fuzji lac . . . . .	421
A. Kurdowska — Struktura, zmiany konformacyjne i funkcja $\alpha_2$ -makroglobuliny . . . . .	445
<b>Minireview</b>	
B. Bartłomowicz — Wątrobowy cytochrom P—450 . . . . .	459
W. Bednarski, J. Kowalewska-Piontas — Enzymy termostabilne w technologii żywności . . . . .	469
Spis treści tomu 32, 1986 . . . . .	485

## ARTICLES IN POLISH

## Volume 32

## Number 4

## Historical

H. Wehr — The Nobel Prize for Physiology or Medicine 1985 (Department of Genetics, Institute of Psychoneurology, Warszawa) . . . . .	395
--	-----

## Articles

W. Rode — Thymidylate biosynthesis: biological role and regulation in animal cells (Department of Cellular Biochemistry, Nencki Institute of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	401
J. Wild — Genetic fusion for studying the regulation of gene expression and to analyze proteins. Uses of lac fusion. (Institute of Biochemistry and Biophysics, Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . . . .	421
A. Kurdowska — Structure, conformational alterations and role of $\alpha_2$ -macroglobulin (Institute of Molecular Biology, Jagiellonian University, Kraków) . . . . .	445

## Minireview

B. Bartłomowicz — Hepatic cytochrome P—450 (Department of Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Academy, Szczecin) . . . . .	459
--	-----

## Article

W. Bednarski, J. Kowalewska-Piontas — Thermostable enzymes in food technology (University of Agriculture Institute of Food Engineering and Biotechnology, Olsztyn) . . . . .	469
Contents of the volume 32, 1986 . . . . .	487

Post. Biochemii. 32, z. 4, s. 393—488

Indeks 36969

<http://rcin.org.pl>