

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

PL ISSN
0032-5422

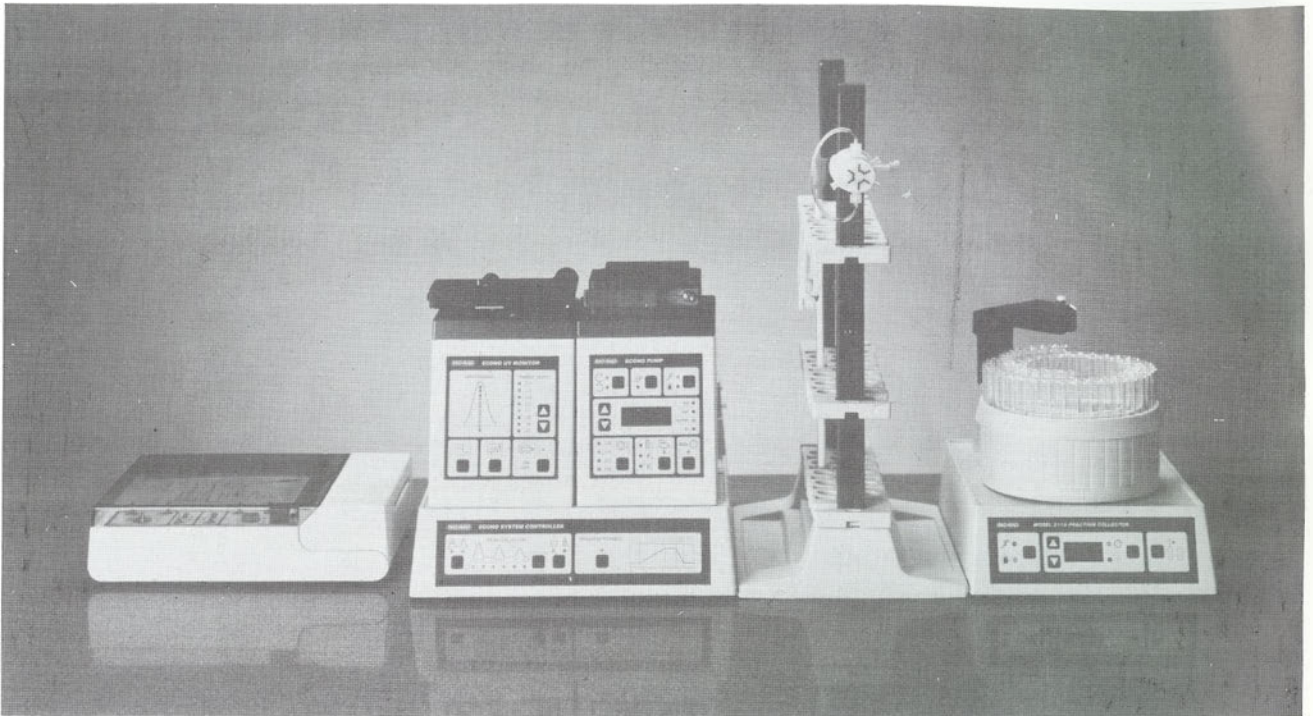
Advances in Biochemistry

TOM 36, NR 3-4, 1990

5S rRNA genes	2
Mutageneza DNA <i>in vitro</i>	5
Antymutageny i antykancerogeny	16
Molekularne podłoże fenylketonurii	24
Diagnostyka prenatalna	31
Nowe generacje aktywatorów plg	33
Kompleksy syntetaz aa-tRNA	41
XXVI Zjazd P.T. Bioch.	4
Sprawozdanie z działalności P.T. Bioch.	23
Kursy EMBO	52
Warunki prenumeraty	55
Leksykon terminów biochemicznych	i-xii

ECONO™ SYSTEM

Chromatography redesigned by *BIO-RAD* the leading company in bioseparations



The new modular Low Pressure Chromatography System will make your life much easier. Purchase the individual components or the complete ready-to-use system. The Gradient Econo Chromatography System consists of

- * Pump
- * Programmable Gradient Controller
- * Column Rack
- * UV Monitor 254/280 nm UV Detection
- * Fraction Collector
- * Strip Chart Recorder
- * Injector Valve

The Econo Low Pressure Chromatography system is cold-room compatible and has a protein friendly format. Now You don't have to design your protein chromatography system yourself anymore. Just order the complete Econo System.

Ordering address right from the stock:

BIO-RAD Laboratories Ges.m.b.H.
Auhofstraße 78 D
A-1130 WIEN
Tel. 222/82 89 010
Fax 222/82 85 629
Telex 136565 biora a

(1 year full warranty)

Introductory Price
US-\$ 9990.00

WYDAWCA

Editor
 POLSKIE TOWARZYSTWO
 BIOCHEMICZNE
 Polish Biochemical Society
 16 Freta Street
 00-227 Warszawa
 Poland

REDAKCJA

Editorial Board

REDAKTOR NACZELNY

Editor in chief
 ZOFIA ZIELIŃSKA
 tel. 31-24-03

REDAKTORZY

Editors
 GRAŻYNA PALAMARCZYK
 JACEK KUŹNICKI
 tel. 659-85-71
 fax: (22)22-53-42
 BOŻENA SZYMANOWSKA

RECENZENCI ZESZYTU

Referees of this issue
 EWA ŚLEDZIEWSKA-GÓJSKA
 (Warszawa)
 IRENA PIETRZYKOWSKA
 (Warszawa)
 BARBARA CZARTORYSKA
 (Warszawa)
 HANNA WEHR
 (Warszawa)
 MAŁGORZATA PIOTROWSKA
 (Warszawa)
 MARIA KOPEĆ
 (Warszawa)
 JERZY PAWEŁKIEWICZ
 (Poznań)

ADRES REDAKCJI

Address
 REDAKCJA
 „POSTĘPÓW BIOCHEMII”
 INSTYTUT BIOLOGII
 DOŚWIADCZALNEJ
 im. M. Nenckiego PAN
 ul. Pasteura 3
 02-093 Warszawa
 tel. (2)659-85-71 w. 209
 fax: (22) 22-53-42
 telex: 81-48-92

Skład i łamanie: sp. z o.o. Supergraf
 ul. Rakowiecka 32

SPIS TREŚCI CONTENTS

Structure and evolution of 5S rRNA genes MAREK GNIADKOWSKI, PIOTR BORSUK, JANUSZ FIETT, PIOTR STĘPIEŃ, AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA, EWA BARTNIK	2
Metody mutageny DNA <i>in vitro</i> Methods of <i>in vitro</i> mutagenesis MAŁGORZATA MEJNARTOWICZ, WŁODZIMIERZ J. KRZYŻOSIAK	5
Naturalne substancje antymutagenne i antykancerogenne Natural antimutagenic and anticarcinogenic compounds IWONNA RAHDEN-STAROŃ	16
Molekularne podłoże fenyloketonurii Molecular basis of phenylketonuria JADWIGA JARUZELSKA, RYSZARD SŁOMSKI.....	24
Diagnostyka prenatalna: szansa? zagrożenie? dylemat? — na marginesie artykułu J. Jaruzelskiej i R. Słomskiego „Molekularne podłoże fenyloketonurii” Prenatal Diagnosis: a chance? danger? dilemma? BARBARA CZARTORYSKA	31
Nowe odmiany aktywatorów plazminogenu New versions of plasminogen activators TADEUSZ PIETRUCHA, CZESŁAW CIERNIEWSKI	33
Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA High-molecular-weight complexes of aminoacyl-tRNA synthetases HENRYK BERBEĆ	41
Sprawozdanie z XXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	4
Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1990 roku	23
Kursy EMBO	52
Warunki prenumeraty	55
Leksykon nowych terminów biochemicznych	i-xii

Od Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i Redakcji Postępów Biochemii

Niedawno otrzymali Państwo z rocznym opóźnieniem zeszyt 1-2 tomu 36 [1990] naszego pisma. Teraz przekazujemy zeszyt 3-4 tegoż tomu. Przewidujemy, że pierwsze dwa zeszyty (już pojedynczo) tomu 37 [1991] ukażą się latem 1991.

Zapraszamy Koleżanki i Kolegów do dalszej współpracy i prosimy o nadsyłanie do Redakcji interesujących prac. Po akceptacji redakcyjnej ukazywać się one będą nie później niż po upływie trzech miesięcy. Zachęcamy do nadawania artykułom formy mini-reviews i prosimy o stosowanie się do zaleceń przedstawionych we wskazówkach dla Autorów.

Jak już informowaliśmy w poprzednich zeszytach, w najbliższym czasie podstawę materialną kwartalnika stanowić będą wpłaty z prenumerat i reklam. Anonsowaliśmy też przewidywaną konieczność czasowego zawieszenia wypłat honorariów za prace publikowane w najbliższych tomach. Wobec wzrostu kosztów poligraficznych znaleźliśmy się właśnie w takiej sytuacji. Przepraszamy przeto P.T. Autorów i Recenzentów prac publikowanych w tomie 36 i w pierwszych zeszytach tomu 37 za niemożność terminowej wypłaty honorariów. Jednocześnie informujemy, że nowa forma publikacji zeszytów Postępów Biochemii uniemożliwia sporządzenie odbitek. W zamian każdy z Autorów otrzymywać będzie zeszyt Postępów Biochemii ze swoim artykułem. Oczekujemy ze strony Państwa wyrozumiałości, a ze swej strony serdecznie przepraszamy.

Zofia Zielińska
 Redaktor Naczelny

Zofia Poremska
 Prezes Pol. Tow. Biochemicznego

Structure and evolution of 5S rRNA genes

MAREK GNIADKOWSKI¹

PIOTR BORSUK²

JANUSZ FIETT¹

PIOTR STĘPIEŃ³

AGNIESZKA SZPECHT-POTOCKA¹

EWA BARTNIK³

One of the favorite subjects in molecular biology has been the study of gene sequences in order to observe their evolution. The genes which code for the 4 classes of ribosomal RNA (rRNA) in eukaryotes (5S, 5.8S, 18S and 26S) have been very popular as the genes themselves are repeated many times in the genome and code for abundant transcripts, thus are easy to isolate and analyze. Genes coding for the 3 larger rRNA classes are transcribed by RNA polymerase I, and in most eukaryotes form tandemly repeated units [1]. A joint transcript of all three rRNAs is formed and subsequently processed to mature rRNAs by removal of sequences present between the coding regions and of 3' and 5' flanking sequences [1, 2]. The mechanisms of this process are poorly understood, but both transcription and processing appear to be species-specific.

The genes coding for the smallest rRNA molecule, the 120 nucleotide long 5S rRNA are transcribed by a different enzyme, RNA polymerase III, and can be organized in 3 different ways — they are part of the rDNA repeat unit, they are tandemly repeated or dispersed. The latter mode of organization has only been found in several species of fungi [1].

A fundamental problem as far as repeated genes are concerned is how their homogeneity is maintained, when a mutation in any single gene is obviously not lethal. The repeated rDNA transcription units are believed to be corrected by the mechanism of unequal crossing over, but even here the conservation of rRNA coding sequences is high, whereas the intervening and flanking sequences vary greatly even among related organisms, thus unequal crossing over by itself is not a sufficient explanation. A second mechanism which has been postulated is conversion in which one copy of

a gene (or its transcript) can participate in changing the sequence of a second very similar gene [3].

For many years we have been working on the rRNA genes in the fungus *Aspergillus nidulans*. We have cloned and sequenced the rDNA repeat unit from this organism and analyzed its *in vivo* transcription. In addition, we cloned several genes coding for 5S rRNA and found they are dispersed [1]. This was the third known case of such an organization after *Neurospora crassa* and *Schizosaccharomyces pombe* [3].

We have determined the sequence of 12 cloned fragments of *A. nidulans* DNA which hybridized to 5S rRNA. 3 of them contained sequences which were homologous only to the 5' part of the 5S rRNA gene (about 60 nucleotides) followed by a different sequence. The 5' halves bore 0-2 mutations compared to the appropriate 5S rRNA genes. The 3' flanking sequences had no homology to 5S rRNA, but about 70% homology among themselves. These sequences (which we call block C) exist in about 10 copies in the *A. nidulans* genome; 2 are known to occur in regions downstream from 2 normal 5S rRNA genes [4,5,6].

We compared the sequences of the 9 cloned genes including the 3' and 5' flanking sequences, and found that the coding sequences, but not the flanking sequences, were very highly conserved, but there were several positions at which variation occurred. 5S rRNA structure is well known, and a universal model structure for all eukaryotic 5S rRNAs has been proposed by De Wachter and co-workers [7], it is shown for *A. nidulans* 5S rRNA in Fig. 1. We found that the base changes shown in Table I occurred either in single stranded regions, or if they were present in double stranded regions they were accompanied by other changes which led to the maintenance of the secondary structure. The changes occurred in distinct positions.

In order to check whether the positions which are variable in 5S rRNA genes in *A. nidulans* are a species specific matter, we decided to analyze the 5S rRNA

¹ mgr, ² dr, ³ doc. dr, Zakład Genetyki Uniwersytetu Warszawskiego, Al. Ujazdowskie 4, 00-478 Warszawa, Poland

genes from two other species of *Aspergillus*: *A. wentii* and *A. awamori*. We found 8 genes and 2 pseudogenes in *A. wentii*, and 4 genes and 2 pseudogenes in *A. awamori* (In all 3 *Aspergillus* species there are about 100 5S rRNA genes dispersed in the genome). Comparison of the gene sequences indicated that *A. wentii* and *A. awamori* are very closely related and different from *A. nidulans*. As shown in Table I, some of the variable positions in *A. nidulans* are also variable in the two other *Aspergillus* species (eg. positions 12 and 23) but there are also obvious differences.

In both *A. awamori* and *A. wentii* we found one pseudogene similar to the *A. nidulans* pseudogenes — a 5' half of 5S

rDNA flanked by a sequence very similar to block C. In these species only a single copy of this sequence is present. Moreover, in *A. wentii* we found a pseudogene lacking the first 40 nucleotides of 5S rRNA and bearing numerous mutations, and in *A. awamori* a „classical” untruncated pseudogene bearing numerous deletions and insertions.

We thus have a collection of altogether 21 genes and 7 pseudogenes from 3 closely related species. The one classical pseudogene from *A. awamori* is obviously the result of mutations which went uncorrected and eventually led to the loss of function. The *A. wentii* pseudogene which lacks the first 40 nucleotides also bears numerous mutations. The truncated 5' half pseudogenes of *A. nidulans* are different — they bear 0 to 2 changes compared to the genes, in *A. wentii* and *A. awamori* there are 6 changes. The truncated 5' pseudogenes could either be recent creations, and thus have accumulated few mutations, or, as seems more probable, still be subject to the correction mechanisms presumably conversion [3] which maintain the homogeneity of the 5S rRNA genes themselves. We believe that their formation predates the separation of the 3 investigated *Aspergillus* species, as this type of pseudogene is found in all 3 species. How were these pseudogenes formed? There is evidence that some 7SK RNA pseudogenes were formed by self priming of reverse transcription by 7SK RNA molecules [8]. We have not found a structure in 5S rRNA which would allow for self-priming of an intact molecule. However, in all 3 species a characteristic sequence is found in some 5S rRNA molecules and flanking the 5' end of 26S rRNA. This sequence is probably recognized by

a processing RNase which liberates the 5' end of 26S rRNA from the longer precursor transcript. If this sequence were recognized by a processing enzyme in 5S rRNA a shorter molecule potentially capable of self-priming the formation a 5' half 5S cDNA would be formed.

Why are all five 5' half pseudogenes flanked by the non-5S rRNA sequence which we call block C and which is over 60% conserved between the 3 species? We have been unable to detect transcripts of the C sequence, and it does not code for any potential polypeptides. Sequences without function normally are not conserved in the process of evolution. The event leading to the creation of the truncated pseudogenes probably occurred before the *A. nidulans* lineage separated from the *A. wentii* and *A. awamori* lines, which are much more closely related. The 5' halves underwent correction by conversion, the C blocks accumulated mutations — for some reason very slowly. The other possible scenario is that the creation of the 5' halves occurred independently in the three species, and that the C block was the preferred integration site for these events. Why the sequence is present in one copy in *A. wentii* and *A. awamori* and in 10 copies in *A. nidulans* is a matter for speculation.

Summing up we have found that sequence conservation mechanism operate in the dispersed 5S rRNA gene family in the genus *Aspergillus*, and that the sequences which remain constant are to some extent species specific. We have also found an unexpectedly large number of pseudogenes of 3 different types — lacking part of the 5' coding sequence, lacking the 3' half of the 5S rDNA and an untruncated pseudogene with mutations in the whole 5S rRNA-like sequence. So far mammals have been the favorite object for

Fig 1. The secondary structure of *A. nidulans* 5S rRNA

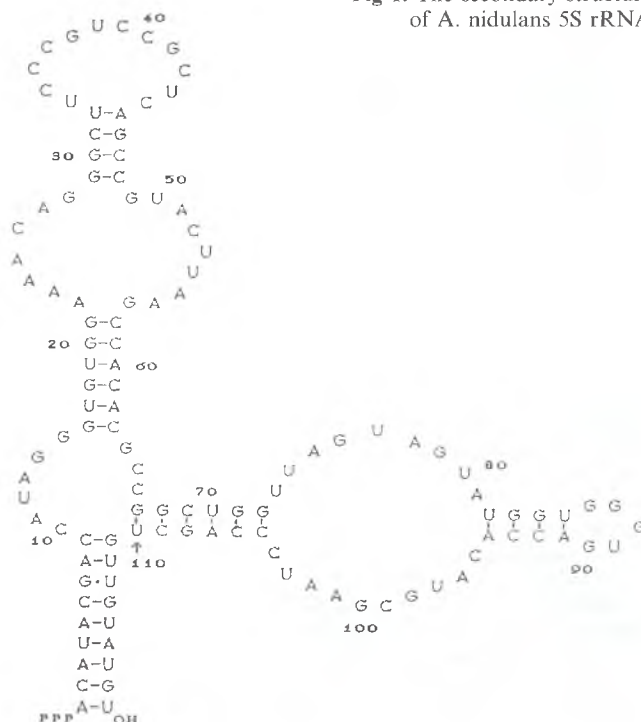


Table 1

5S rRNA gene sequence variation in three species of *Aspergillus*. V — variable, T/C, A/G etc — two different nucleotides found with approximately equal frequencies, A[±] and T^c — one of all known genes has the nucleotide shown with a small letter in this position.

Origin of sequences	Positions									
	1	12	23	26	54	69,70	81,82	96,97	107,108	112
<i>A. nidulans</i>	A	T/C	A/G	C	T	V,T/A	A,T	A/T	A/T,V	T ^c
<i>A. wentii</i> and <i>A. awamori</i>	A [±]	T/C	A/G	C/T	T/C	G,A	T,G	C,A	T,T	T

pseudogene analysis, as they have a lot of pseudogenes; fungi, with their small genomes, were considered to be relatively free from pseudogenes, though a 5S rRNA pseudogene had been found in *N. crassa* [3]. Our system of three closely related species of *Aspergillus* has enabled us to look at the fate of a family of dispersed genes in order to check what mechanism may operate in the maintenance of these sequences. It is worthwhile noting that the sequences which flank the 5S rRNA genes are not conserved, and vary from gene to gene, which is an indication that probably the 5S rRNA transcripts are responsible for conversion.

Artykuł otrzymano 18 września 1990 r.
Zaakceptowano do druku 19 września 1990 r.

References

1. Bartnik E., (1983), *Post. Mikrobiol.*, **22**, 29-42.
2. Grummt I., (1989), w *Nucleic Acids and Molecular Biology* (red. Eckstein F., Lilley D. M. J.), t. 3, str. 148-163, Springer Verlag, Berlin.
3. Morzycka-Wróblewska E., Selker E. U., Stevens J. N., Metzner R., L., (1985), *Mol. Cell Biol.*, **5**, 46-51.
4. Bartnik E., Bartoszewski S., Borsuk P., Empel J., (1986), *Current Genet.*, **10**, 453-457.
5. Bartoszewski S., Borsuk P., Kern I., Bartnik E. (1987), *Current Genet.* **11**, 571-573.
6. Borsuk P., Gniadkowski M., Bartnik E., Stępień P. P., (1988), *J. Mol. Evol.*, **28**, 125-130.
7. De Wachter R., Chen M. W., Vandenberghe A., (1982), *Biochimie*, **64**, 311-329.
8. Suh D., Yuan Y., Henning D., Reedy R., (1989), *Eur. J. Biochem.*, **186**, 221-226.

XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Gdańsk, 13-15.09.1990

SPRAWOZDANIE

W dniach 13-15 września 1990 obradował w budynku Zakładów Teoretycznych Akademii Medycznej w Gdańsku XXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Gdańsku. W Zjeździe wzięło udział 375 zarejestrowanych uczestników z kraju i 30 zaproszonych gości, w tym 12 gości z zagranicy.

Większość uczestników Zjazdu korzystała z zakwaterowania w Domach Studenckich AMC, pozostali mieszkali w hotelu „HEVELTIUS” i hotelu Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej. Wszystkim chętnym zapewniono śniadania i obiady w stołówce studenckiej AMG po umiarkowanych cenach.

- Zjazd rozpoczęła 2-godzinna sesja plenarna na której referaty wygłosili:
- prof. dr Mariusz Żydowo (Gdańsk) — „UNIWERSALNE ZNACZENIE METABOLIZMU ADENYLANÓW”
 - prof. dr Shi Chen (Szanghaj) — „A STUDY OF THE STRUCTURE AND THE EXPRESSION OF PROTOONCOGENES IN HUMAN PRIMARY GASTRIC CANCER”
 - prof. dr Konstancja Raczyńska-Bojanowska (Warszawa) — „PUBLIKOWANIE EKSPERYMENTALNYCH PRAC POLSKICH BIOCHEMIKÓW”

Program naukowy Zjazdu obejmował 5 sympozjów tematycznych, a mianowicie:

- A. METABOLIZM I EFEKTY REGULACYJNE POCHODNYCH PURYNOWYCH I PIRYMIDYNOWYCH (organizator: prof. dr M. Żydowo),
- B. BIOCHEMIA NERKI I TRANSPORT JONÓW PRZEZ BŁONY (organizator: prof. dr S. Angielski),
- C. MOLEKULARNE PODSTAWY OCHRONY I WYKORZYSTANIA EKOSYSTEMÓW MORSKICH (organizator: prof. dr K. Taylor),
- D. HORMONALNA REGULACJA METABOLIZMU (organizator: prof. dr Jerzy Rogulski),
- E. GLIKOKONJUGATY (organizator: prof. dr J. Kościelak).

Ponadto Sekcja Biochemii Klinicznej PTBioch, zorganizowała w ramach Zjazdu w sobotę dnia 15.09.1990 sympozjum „METODY IMMUNOCHEMICZNE W BIOCHEMII KLINICZNEJ” (organizator: prof. dr S. Angielski), w którym wzięło udział około 80 osób.

W poszczególnych sympozjach tematycznych wygłoszono łącznie 17 referatów sympozjalnych i przedstawiono ustnie 64 komunikatów. Ponadto w czterech sesjach obejmujących zróżnicowaną tematykę zaprezentowano 213 doniesień w formie plakatów.

Podczas Zjazdu odbył się konkurs dla młodych biochemików o nagrodę im. Włodzimierza Mozołowskiego. Konkurs przebiegał według nowego, zmienionego w stosunku do lat poprzednich regulaminu. Komisji konkursowej przewodniczył prof. dr Leon Żelewski z Katedry i Zakładu Biochemii Farmaceutycznej AMG. Lauretem konkursu został dr Grzegorz Nowak z Katedry i Zakładu Biochemii AMG, który przedstawił pracę p.t. „IZOLACJA I MECHANIZMY REGULACYJNE DEAMINAZY

AMP Z MIĘŚNIA GŁADKIEGO MACICY KROWY”. Laureat został uhonorowany pamiątkową akwafortą przedstawiającą Ratusz Głównego Miasta w Gdańsku i czekiem na kwotę 1.000.000 zł (jeden milion złotych). Wyróżnienia w Konkursie otrzymali ponadto kol. Katarzyna Kwiatkowska z Warszawy i Grzegorz Bukato oraz Ryszard Smoleński z Gdańska. Ogłoszenie wyników Konkursu i uroczyste wręczenie Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego odbyło się w drugim dniu Zjazdu w sali wykładowej imienia Profesora.

Obradom zjazdu towarzyszyła wystawa sprzętu laboratoryjnego, aparatury, odczynników i leków w której wzięły udział 28 firmy krajowe i zagraniczne.

W przeddzień Zjazdu odbyło się posiedzenie Zarządu Głównego PTBioch., a w godzinach wieczornych koktail powitalny w KLUBIE „MEDYK” na terenie Osiedla Akademickiego z udziałem około 80 zaproszonych osób.

W pierwszym dniu Zjazdu w godzinach wieczornych (20⁰⁰-23⁰⁰) odbyło się spotkanie towarzyskie na statku Żegluga Gdańskiej n-s „SZAFIR” odbywającym rejs na Zatokę Gdańską. W spotkaniu wzięło udział około 180 osób. Goście bawili się znakomicie, a tańce na statku przeciągały się dla niektórych aż do godzin rannych.

Wieczór w drugim dniu Zjazdu wypełnił koncert muzyki barokowej w wykonaniu oryginalnego zespołu wokально-instrumentalnego Capella Gedanensis. Koncert odbył się w zabytkowych wnętrzach dawnego Pałacu Opatów na terenie Parku Oliwskiego. Koncertowi przysłuchiwało się około 90 uczestników Zjazdu i zaproszeni goście. Wszyscy byli pod silnym wrażeniem oryginalności i poziomu instrumentalnego i wokálního zespołu jak również muzealnych wnętrz zabytkowego Pałacu.

W sobotę dnia 15.09.1990 organizatorzy przygotowywali szereg wycieczek po Trójmieście i okolicach na które niestety nie było zbyt wielu chętnych. Największym zainteresowaniem cieszyła się całodzienna wycieczka do Fromborka połączona ze zwiedzaniem Katedry i Muzeum Kopernika.

Zjazd finansował się sam nie korzystając z żadnych dotacji ze strony Towarzystwa Biochemicznego ani Polskiej Akademii Nauk. Koszty organizacji Zjazdu zostały pokryte w 52% z dochodów z wystawy i reklam, oraz w 24% z dotacji pieniężnych od sponsorujących firm z terenu Wybrzeża i w pozostałych 24% z wpisowego wniesionego przez uczestników. Ponadto Zjazd korzystał z pomocy licznych instytucji sponsorujących, które świadczyły nieodpłatnie lub po niższej cenie liczne usługi na rzecz Zjazdu (udostępnienie sal wykładowych, transport, papier, druk etc.).

W rozliczeniu finansowym organizacji Zjazdu pozostaje pewna nadwyżka finansowa, którą Komitet Organizacyjny chciałby przeznaczyć na wsparcie finansowe redakcji LISTÓW oraz prac przygotowawczych do następnego Zjazdu organizowanego w roku 1991 w Lublinie, w tym ufundowanie w Lublinie Nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego.

Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego Przewodniczący Oddziału PTBioch w Gdańsku
prof. dr Wiesław Makarewicz

Metody mutagenезy DNA *in vitro*

Methods of *in vitro* mutagenesis

MAŁGORZATA MEJNARTOWICZ^{1*}

WŁODZIMIERZ J. KRZYŻOSIAK²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mutagenезa chemiczna
- III. Mutagenезa sterowana przez oligonukleotydy
- IV. Mutagenезa kasetowa
- V. Mutagenезa poprzez częściową lub całkowitą syntezę genu
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Chemical mutagenesis
- III. Oligonucleotide-directed mutagenesis
- IV. Cassette mutagenesis
- V. Mutagenesis by partial or total gene synthesis
- VI. Final remarks

I. Wstęp

Genetyka klasyczna wykorzystuje mutagenезę w warunkach *in vivo* w badaniach lokalizacji i funkcji genów. Zwiększenie częstości mutacji spontanicznych, niezbędne w tych badaniach, osiągane jest dzięki stosowaniu mutagenów chemicznych, promieniowania ultrafioletowego lub jonizującego. Mutacje indukowane w genomie charakteryzują się w pewnym uproszczeniu rozkładem losowym a selekcje mutantów prowadzi się na podstawie zmian fenotypowych. Precyzyjne przypisanie poszczególnych zmian fenotypowych zmianom w genomie pozostaje jednak sprawą bardzo skomplikowaną.

Klonowanie genów i inne techniki współczesnej biologii molekularnej umożliwiają prowadzenie analizy mutacyjnej wielu genów poza ich naturalnym środowiskiem. Wśród metod mutagenезy *in vitro* wyróżnia się mutagenезę ukierunkowaną pozwalającą na osiąganie zaprogramowanych, ściśle określonych zmian w strukturze genu o znanej sekwencji nukleotydów i mutagenезę chemiczną, która ma charakter mniej specyficzny. Metody te umożliwiają precyzyjne powiązanie zmian w budowie genów lub produktów ich ekspresji ze zmianami w ich funkcji.

Znaczenie mutagenезy *in vitro* w badaniach kwasów nukleinowych i białek ciągle wzrasta. Obecnie, po upływie dziesięciu lat od wprowadzenia tej metody, nie sposób już zliczyć wszystkich jej zastosowań, a tym bardziej dokonać ich pełnego przeglądu. Znacznie

zwiększyła się też różnorodność i efektywność stosowanych technik mutagenезy. Zagadnienia te dyskutowano w kilku opracowaniach przeglądowych [1-8], wyczerpujących temat w zróżnicowanym stopniu i nie obejmujących osiągnięć metodycznych ostatnich kilku lat.

Celem tego artykułu jest przedstawienie różnych technik stosowanych w mutagenезie *in vitro*, ocena ich efektywności oraz zakresu zastosowań. Opisane będą kolejno metody mutagenезy chemicznej sterowanej oligonukleotydami, kasetowej oraz osiąganej przez częściową lub całkowitą syntezę genu.

II. Mutagenезa chemiczna

Wiele związków chemicznych modyfikuje specyficznie reszty zasad purynowych i pirymidynowych w DNA [6, 9-11]. Modyfikacje te często indukują zmiany w parowaniu zasad, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia zmutowanych cząsteczek DNA. Zestawienie najczęściej stosowanych mutagenów chemicznych wraz z ich krótką charakterystyką zawiera tabela 1.

Istotną sprawą jest sposób przygotowania badanego DNA do mutagenезy. Trzy reprezentatywne podejścia stosowane w mutagenезie chemicznej przedstawione są na rycinie 1.

Pierwsze z nich polega na wydzieleniu badanego odcinka DNA ze zrekombinowanego plazmidu po wycięciu enzymami restrykcyjnymi i poddaniu go chemicznej modyfikacji na przykład kwasem azotowym lub hydroksyloaminą. Zmodyfikowany fragment wprowadzany jest ponownie do plazmidu, którym transformowane są komórki bakteryjne [12-14]. Ponieważ selektywne wydzielenie badanego, najczęściej dość krótkiego, fragmentu DNA z plazmidu może nastąpić jedynie w przypadku korzystnego rozkładu miejsc restrykcyjnych, metoda ta nie znalazła szerszego zastosowania, również z powodu niskiej wydajności reakcji wprowadzania zmodyfikowanego fragmentu do wektora. Jednakże tę trudność można pokonać hybrydując badany fragment restrykcyjny z jednoniciową formą zrekombinowanego DNA i syntetyzując enzymatycznie pełną drugą nici [15].

Kolejnym sposobem przeprowadzenia mutagenезy chemicznej jest miejscowe odsłonięcie badanego odcinka DNA i jego modyfikacja odczynnikiem specyficznym dla pojedynczej nici, zazwyczaj wodorosiarc-

¹ mgr, ² doc. dr hab.: Instytut Chemii Bioorganicznej PAN 61-704 Poznań ul. Noskowskiego 12/14

* aktualny adres: Abteilung für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Universität Göttingen 3400 Göttingen, Buesgenweg 2

Tabela 1

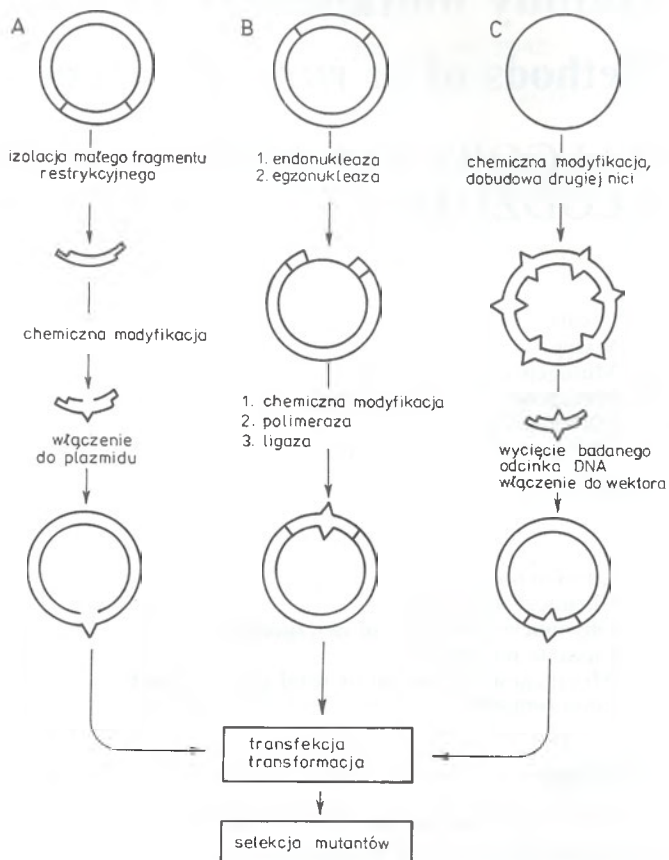
Charakterystyka odczynników stosowanych w mutagenезie chemicznej

Odczynnik	Rodzaj modyfikacji	Wywoływane mutacje *	Literatura
kwaśny siarczyn sodu	dezaminacja dC → dU	C → T	10,16 17,29 30
hydroksyloamina	substytucja grupy aminowej hydroksylaminową w dC	C → T	13,31
hydrazyna	otwarcie pierścienia pirymidynowego w dT i dC	T → C T → G C → T	23,28 32
kwas mrówkowy	hydroliza wiązania N-glikozydowego (depurynacja)	G → T A → T G → C	23 33-36
kwas azotawy	dezaminacja dC → dU dG → dX dA → dHX	C → T A → G	15,23 37

*) najczęściej obserwowane

czynem sodu [16]. Dwuniciowy DNA zawierający krótki odcinek jednoniciowy można otrzymać enzymatycznie [17]. Stosowane są w tym celu najczęściej kontrolowane trawienia odpowiednią restryktazą i egz nukleazą na przykład Exo III [18, 19]. Fragment DNA poddawany mutagenезie może też stanowić pętlę delecynną lub pętlę nie parującą z wektorem [17]. Zmodyfikowany jednoniciowy odcinek DNA uzupełniany jest następnie do formy dwuniciowej polimerazą DNA i łączony z wektorem za pomocą ligazy DNA [20-22]. Poważnym ograniczeniem metody, w której stosowany jest niemal wyłącznie wodorosiarczyn sodu, jest możliwość uzyskania mutacji polegających jedynie na zamianie par C-G w pary T-A (Tabela 1).

Trzecią strategią, w której mutagenезie poddawana jest jednoniciowa forma rekombinanta fagowego reprezentuje metoda opisana przez Meyersa i Maniatisa [23]. Zmodyfikowany DNA parowany jest z oligonukleotydowym „primerem” używanym standardowo do enzymatycznego sekwencjonowania w układzie faga M13 [21-25]. Wydłużanie primera odwrotną transkryptazą prowadzi do utworzenia dwuniciowego DNA. Odwrotna transkryptaza wirusa AMV w porównaniu z innymi polimerazami DNA charakteryzuje się większą zdolnością tworzenia drugiej nici DNA na zmodyfikowanych matrycach. Z większą częstotliwością wprowadza też pożądane mutacje związane z modyfikacją zasad [23]. W kolejnym etapie odcinek DNA izolowany jest z replikatywnej formy rekombinanta



Ryc. 1. Trzy sposoby prowadzenia mutagenезy chemicznej polegające na chemicznej modyfikacji: A-izolowanego fragmentu restrykcyjnego, B-jednoniciowego fragmentu zrekombinowanego plazmidu, C-jednoniciowej formy rekombinanta fagowego.

fagowego za pomocą enzymów restrykcyjnych i włączony do niemodyfikowanego wektora, którym transformowane są komórki bakteryjne. Zmutowane fragmenty rozdzielane są elektroforetycznie, wykorzystując się przy tym ich zróżnicowaną zdolność do denaturacji na żelach z gradientem czynnika denaturującego [26, 27]. Technika ta pozwala na rozdzielanie odcinków zmutowanego DNA różniących się zaledwie jedną parą zasad, co wykazano sekwencjonując poszczególne frakcje DNA [23, 28].

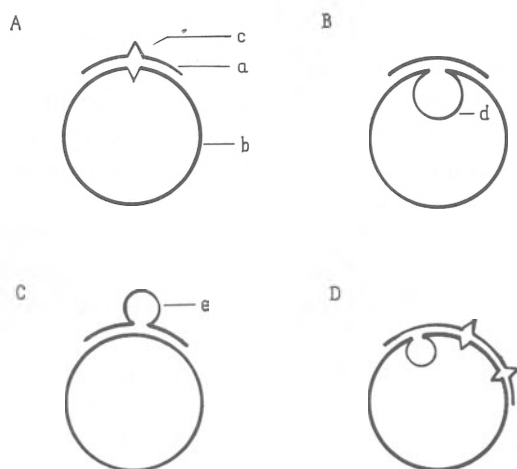
Końcowym etapem procesu mutagenезy jest wykrycie mutantów. Jeżeli mutacje spowodowały zmiany fenotypowe, wstępna selekcja może zachodzić na tej podstawie. W przypadku mutacji nie ujawniających się fenotypowo określenie miejsca i rodzaju mutacji wykrywa się poprzez sekwencjonowanie DNA.

We wszystkich przedstawionych metodach stosowania mutagenезy chemicznej analizowany jest jedynie niewielki odcinek DNA będący na przykład elementem regulatorowym lub fragmentem genu struktury. Stosując omówione techniki otrzymuje się przeważnie spektrum mutacji zlokalizowanych w badanym fragmencie. Jest to korzystne, gdy badania zakładają utworzenie biblioteki mutantów. Krytycznym etapem w podejściu chemicznym jest wyszukiwanie określonych mutantów, często spośród wielu setek różnych

klonów. Wiąże się to zazwyczaj z ogromnym nakładem pracy przy sekwencjonowaniu DNA.

III. Mutageniza sterowana przez oligonukleotydy

Zbiór technik opisanych w tym rozdziale umożliwia precyzyjne wprowadzenie zaprogramowanych zmian do sekwencji badanego DNA za pomocą syntetycznych oligonukleotydów. Możliwe jest uzyskanie substytucji zasad, insercji oraz delecji. Mutacje te mogą być wprowadzone pojedynczo lub łączone w różnych kombinacjach (Ryc. 2).



Ryc. 2. Trzy typy mutacji osiągnięte za pomocą syntetycznych oligonukleotydów. A-pojedyncza mutacja typu substytucji: a-mutageniczny oligonukleotyd, b-jednoniciowy matrycowy DNA, c-mutageniczna zasada. B-Mutacja typu delecji: d-fragment ulegający delecji. C-Mutacja typu insercji: e-fragment ulegający insercji. D-Kombinacja dwóch mutacji typu substytucji zasad delecji fragmentu matrycowego DNA.

Do wprowadzenia pojedynczej mutacji typu substytucji wystarcza użycie oligomeru składającego się z 15-20 nukleotydów [38, 39]. Stosując mieszanie oligomerów tej długości można uzyskać wiele substytucji zasad w jednym doświadczeniu [40, 41]. W celu uzyskania insercji lub delecji stosowane są zazwyczaj nieco dłuższe oligonukleotydy [42-44]. Stwierdzono, że długość odcinków DNA ulegających delecji w stosunku do długości oligonukleotydów koniecznych do wprowadzenia tej mutacji może być bardzo duża. Za pomocą odcinków DNA o długości 18 i 21 nukleotydów uzyskano 1000-nukleotydowe delecje [45, 46]. Insercje natomiast mają wielkość ograniczoną długością oligonukleotydu mutagenicznego [43-47].

Oligonukleotydy wykorzystywane w mutagenie posiadają sekwencję komplementarną do badanego fragmentu DNA z wyjątkiem zasady wprowadzającej mutację lub fragmentu, który ma ulegać insercji lub delecji (Ryc. 2). Nieparująca się zasada umieszczana jest w dostatecznej odległości od końca 3'-oligomeru, najlepiej w jego środku [38, 48]. Celem takiego po-

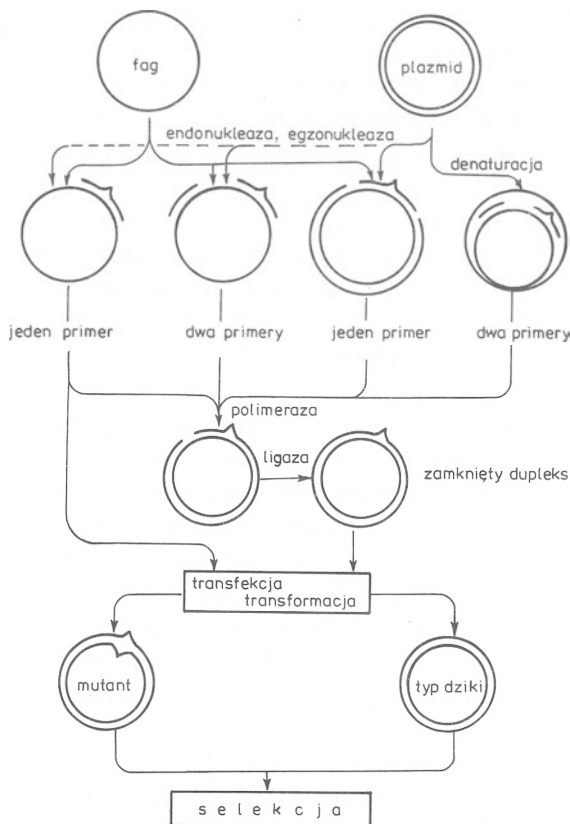
stępowania jest ochrona nukleotydu wprowadzającego mutację przed usunięciem z oligomeru, co mogłoby być wynikiem egzonukleazowej aktywności 3'-5' fragmentu Klenowa polimerazy I DNA, katalizującego syntezę drugiej nici DNA. Dla podniesienia wydajności syntezy stosuje się niekiedy dłuższe oligomery, tworzące trwalsze kompleksy z matrycą oraz nadmiar oligonukleotydu w stosunku do matrycy [49, 50]. Istotną sprawą jest też zapewnienie specyficzności procesu hybrydacji. Dostępne programy komputerowe [51, 52] umożliwiają szybkie sprawdzenie stopnia niepożądanego tworzenia kompleksów mutagenicznych oligonukleotydów z innymi regionami badanego DNA. Testem eksperymentalnym na specyficzność parowania jest sekwencjonowanie badanego fragmentu DNA z wykorzystaniem oligonukleotydu mutagenicznego jako primera sekwencyjnego [39, 53, 54].

Dobór wektora, w którym znajdzie się badany DNA w trakcie mutagenyzy, zależy od planów dalszego wykorzystania zmutowanych cząsteczek DNA. Stosowane są wektory jednoniciowe i dwuniciowe, pochodne fagowe oraz plazmidowe. Wektory fagowe są najczęściej pochodnymi DNA faga M13, na przykład M13mp18 lub M13mp19 [25, 55]. Wektory te niosą marker genetyczny, gen galaktozydazy i umożliwiają łatwe, fenotypowe wyszukiwanie rekombinantów. Posiadają też dużo unikatowych miejsc restrykcyjnych zgromadzonych w krótkim fragmencie DNA, umieszczonym w sekwencji kodującej enzym markerowy. Wykorzystanie plazmidów jako wektorów w mutagenie ma tę zaletę, że większość manipulacji rekombinacyjnych wykonywana jest w plazmidach. Służą one również jako wektory w badaniach ekspresji genów. Wystąpienie mutacji można także potwierdzić bez konieczności przenoszenia badanego DNA do wektora M13, sekwencjonując bezpośrednio dwuniciowy, plazmidowy DNA [56, 57].

Różne stosowane kombinacje wektorów i primerów oligonukleotydowych, a także dalszy przebieg procesu mutagenyzy przedstawia ryc. 3.

Do mutagenyzy sterowanej oligonukleotydami konieczne jest przygotowanie badanego odcinka DNA w formie jednoniciowej. Zatem gen zawarty w plazmidzie musi być również doprowadzony do takiej postaci. Jednym z rozwiązań jest całkowite usunięcie jednej nici plazmidu [58]. Procedura polega na selektywnej hydrolizie jednej nici endonukleazą restrykcyjną lub DNAzą I w obecności bromku etydyny [29, 59], gdyż w takich warunkach DNA jest substratem dla egzonukleazy Exo III. Po trawieniu tym enzymem pozostaje jednoniciowa cząsteczka DNA [60, 63].

Pewną odmianą powyższej metody jest częściowe, kontrolowane trawienie Exo III, które powoduje luki w jednej z nici DNA [64, 65]. Jednoniciowe odcinki DNA można też utworzyć poprzez hybrydację plazmidowego, zrekombinowanego DNA przeciętego w pewnej odległości od miejsca dołączenia badanego genu z DNA samego plazmidu przeciętym w miejscu



Ryc. 3. Różne sposoby przygotowania matrycy DNA do mutagenyzy sterowanej oligonukleotydami i techniki prowadzenia mutagenyzy.

insercyjnym [66-68]. Można też utworzyć tak krótką jednoniciową lukę w dwuniciowym DNA, że mutageniczny oligonukleotyd wypełnia ją w całości [69, 70]. Dwuniciowy DNA zawierający fragment jednoniciowy można również przygotować z fagowego DNA. Konstrukcja takiego układu polega na hybrydyzacji kolistego zrekombinowanego fagowego DNA z dużym fragmentem restrykcyjnym wektora fagowego [71-73]. Opisano też technikę w której dwuniciowy „kolista” DNA poddawany jest jedynie denaturacji i hybrydyzacji z jednym lub dwoma oligonukleotydami [74]. Podejście to jest eksperymentalnie bardzo proste, prowadzi jednak do niskiej wydajności mutagenyzy.

Stosując opisywane techniki parowano z matrycą jeden [39, 58] lub dwa [42, 74] „primery”. Zabieg wprowadzania drugiego oligonukleotydu służy zwiększeniu wydajności mutagenyzy. Przyspiesza on tworzenie drugiej nici, której synteza rozpoczyna się w dwóch miejscach i chroni oligonukleotyd mutageniczny przed usunięciem z matrycy [6, 7, 42, 74].

Po etapie hybrydyzacji we wszystkich odmianach metody oligonukleotyd jest wydłużany enzymatycznie do postaci pełnej drugiej nici. Stosowane są w tym celu polimerazy DNA, głównie fragment Klenowa polimerazy I DNA [39, 75], a od niedawna także polimeraza DNA faga T4 [76]. Enzym ten w znacznie mniejszym stopniu powoduje usuwanie primera z matrycy, umożliwiając w ten sposób nawet dwukrotny wzrost wydaj-

ności mutagenyzy [77, 78]. Opisano też przykłady bezpośredniej kotransformacji komórek bakterii lub drożdży za pomocą jednoniciowego matrycowego DNA i oligonukleotydu mutagenicznego [79, 80]. Innym, nie przedstawionym na ryc. 3, podejściem jest technika wprowadzona przez Norrisa [81], w której dwuniciowy fragment restrykcyjny zawierający mutację indukowaną za pomocą dwóch primerów jest przenoszony z wektora fagowego do plazmidowego, co w rezultacie w istotny sposób zwiększa wydajność mutagenyzy.

Po izolacji DNA z transformowanych komórek otrzymuje się zarówno cząsteczki zmutowane jak i typu dzikiego. Kolejnym etapem jest selekcja mutantów. Kryterium selekcji stanowią zmiany fenotypowe w mutantach, o czym wspomniano w poprzednim rozdziale. Sytuacje takie występują jednak dość rzadko, podobnie jak pojawianie się lub likwidacja w wyniku mutacji miejsca restrykcyjnego, którego wykorzystanie mogłoby stanowić podstawę selekcji [60, 82, 83]. Częściej stosowana jest hybrydyzacja wyizolowanego DNA ze znakowanym oligonukleotydem mutagenicznym [39, 42, 58]. Ostateczne potwierdzenie wystąpienia i specyficzności mutacji osiągane jest po sekwencjonowaniu DNA.

Maksymalna teoretyczna wydajność mutagenyzy prowadzonej technikami opisanymi powyżej może wynosić jedynie 50%, ponieważ mutację zawiera tylko jedna nić cząsteczki, którą transformowane są bakterie, zatem po replikacji DNA w komórkach, tylko połowa cząsteczek potomnych może być zmutowana. W praktyce wydajność mutagenyzy waha się w zależności od wybranej metody od kilku [39] do ponad 40% [79, 81]. Przyczyny zaniżonej wydajności tworzenia mutantów mogą być bardzo różne. Należą do nich: mała efektywność parowania primera z matrycą, usuwanie primera (głównie przez polimerazę DNA), niska wydajność transfekcji lub transformacji, usuwanie mutagenicznego nukleotydu przez systemy naprawcze komórki, czy też letalny efekt mutacji. Na wydajność mutagenyzy ma również wpływ stechiometria procesu, tak na etapie hybrydyzacji primera, jak i wydłużania oraz cyklizacji drugiej nici DNA. Dotyczy ona stopnia nadmiaru primera mutagenicznego w stosunku do matrycy, jak również względnych ilości polimerazy i ligazy [6, 78].

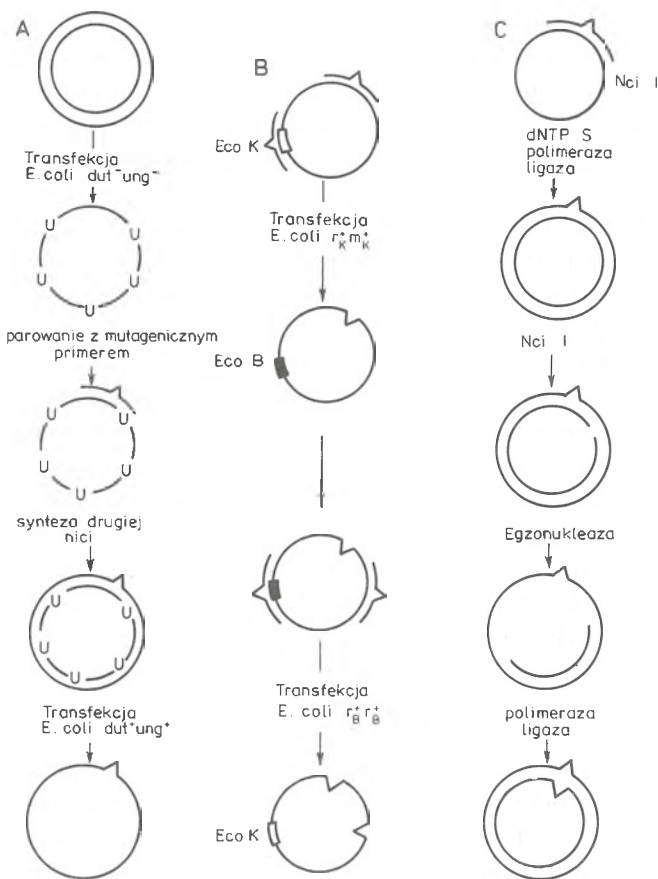
Próby optymalizacji poszczególnych etapów procesu przynosiły niekiedy znaczny wzrost wydajności mutagenyzy [79, 81], w większości przypadków pozostawała ona jednak dość odległa od wartości teoretycznej. Pojawiło się więc kilka nowych koncepcji prowadzenia mutagenyzy, których wspólną cechą jest dążenie do biologicznej dezaktywacji lub usunięcia niezmutowanej nici matrycy, co podnosiłoby teoretyczną wydajność procesu do 100%. Aktualnie znanych jest pięć technik wprowadzania pożądanej asymetrii pomiędzy dwie nici DNA. Zostały one zestawione w tabeli 2.

Tabela 2

Sposoby osiągnięcia asymetrii nici w heterodupleksie DNA, polegające na usuwaniu lub dezaktywacji nici niezmutowanej

Rodzaj asymetrii nici	Zasada eliminacji nici niezmutowanej
metylowana / niemetylowana	systemy naprawcze
aktywna / kodon amber	mutacja nonsensowna
Eco K / Eco B	restrykcyjna — modyfikacja
α -S-dNTP / dNTP	endonukleaza restrykcyjna
tymina / uracyl	glikozylaza uracylowa

Trzy spośród powyższych technik przedstawiono schematycznie na ryc. 4. Pierwsza z nich (A) [78, 84, 85] posługuje się DNA uzyskanym z komórek *E.coli*, które na skutek odpowiednich mutacji pozbawione zostały enzymów dUTP-azy i uracylo-N-glikozylazy (*E.coli* *dut⁻ ung⁻*). Brak dUTP-azy, enzymu hydrolizującego trójfosforan dezoksyurydyny powoduje podwyższenie



Ryc. 4. Metody osiągnięcia dodatkowej asymetrii w heterodupleksie DNA polegające na wprowadzeniu: A-reszt uracylu do nici niezmutowanej, B-miejsce restrykcyjnych w kombinacji ze szczepami bakteryjnymi zdolnymi lub niezdolnymi do ich restrykcji, C-tiofosforanów nukleozydów do nici zawierającej mutację.

stężenia dUTP w komórce przez co może on konkurować z dTTP w syntezie DNA. Uracylo-N-glikozylaza jest enzymem systemu naprawczego odpowiedzialnym za usuwanie z DNA reszt uracylu. DNA pochodzący z komórek, w których brak obu enzymów, zawiera niewielką ilość nukleotydów urydynowych w miejsce tymidynowych. Po hybrydacji mutagenicznego oligonukleotydu z tak przygotowaną matrycą następuje etap enzymatycznego wydłużania primera do postaci heterodupleksu. Nowo powstała nić nie zawiera reszt uracylowych lecz tymidynowe. Transformacja komórek *E.coli* nie pozbawionych wspomnianych aktywności enzymatycznych powoduje usuwanie uracylu z nici matrycy, a przez to powstawanie miejsc apirymidynowych. Uszkodzona nić jest mało aktywna biologicznie i w zestawieniu z nicią zmutowaną nieporównanie słabiej ulega ekspresji. Średnia wydajność tworzenia mutantów wynosi w tej metodzie ponad 50%, a w optymalnych warunkach przekracza 90% [78].

Dруга technika (B) przedstawiona na ryc. 4B polega na jednoczesnym zastosowaniu oligonukleotydu mutagenicznego i selekcyjnego [86, 87]. Primer selekcyjny, będący w istocie również primerem mutagenicznym, po włączeniu do nowo tworzonej nici heterodupleksu zmienia sekwencję rozpoznawaną przez restryktazę EcoB na sekwencję rozpoznawaną przez EcoK, podczas gdy drugi oligonukleotyd mutageniczny, wywołuje jednocześnie pożądaną mutację w badanym genie. Sekwencja rozpoznawana przez restryktazę EcoK wprowadzona została uprzednio do wektorów M13mp18 i M13mp19 w postaci kasety selekcyjnej.

W wyniku transformacji linii komórkowej *E.coli* z aktywną restryktazą EcoK heterodupleksem, w którym nić matrycy posiada sekwencję rozpoznawaną przez EcoK, a nić zmutowana sekwencję dla EcoB, ta pierwsza będzie ulegała restrykcji, natomiast w stanie biologicznie czynnym pozostanie nić zmutowana. Stosując przemiennie primery selekcyjne i linie komórkowe EcoK lub EcoB można wprowadzać kolejno szereg mutacji do badanego DNA. Technika tą uzyskuje się mutanty z wydajnością około 70%.

Kolejne podejście (C) z zastosowaniem restryktaz (Ryc. 4C) wykorzystuje właściwości niektórych enzymów restrykcyjnych (np. Nci I, Ava I, Ava II, Ban II) polegające na hamowaniu zdolności enzymu do restrykcji wobec tiofosforanów nukleozydów w sekwencji rozpoznawanej [89-92]. Nić DNA zawierająca mutageniczny oligonukleotyd jest syntetyzowana w obecności czterech nukleozydotrifosforanów, w tym jednego tiolowanego. Po połączeniu końców nowo utworzonej nici przeprowadzane jest trawienie odpowiednią restryktazą, która hydrolizuje wyłącznie nietiolowaną nić matrycy. Następnym etapem jest reakcja z egzonukleazą (Exo III, T7 lub λ), która prowadzi do usunięcia części pękniętej nici. Proces ten przebiega w kontrolowany sposób, tak aby odsłonięty

został fragment DNA zawierający mutację. Powstała luka wypełniona jest enzymatycznie za pomocą fragmentu Klenowa lub polimerazy DNA faga T4 i w wyniku ligowania następuje utworzenie w pełni zmutowanego homodupleksu. Średnia wydajność metody wynosi 80% [90, 91].

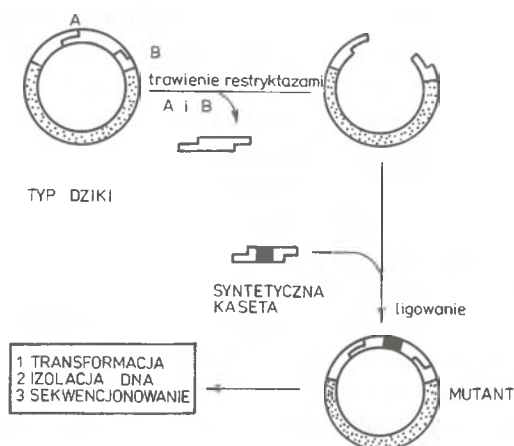
W innej metodzie, (D) nie przedstawionej na ryc. 4, wykorzystywano aktywność systemu naprawczego, istniejącego w komórkach *E.coli*, który usuwa preferencyjnie niesparowane zasady z niemetylowanego DNA, wykazując znacznie osłabioną aktywność w stosunku do nici metylowanych [93]. Utworzono taki heterodupleks DNA, w którym nić matrycy była niemetylowana, a nić zawierająca mutageniczny oligonukleotyd metylowana. W rezultacie wprowadzenia takiego układu do komórek *E.coli*, uprzywilejowanej ekspresji ulegała nić DNA zawierająca mutację [94, 95].

Silną selekcję mutantów uzyskano także wykorzystując kodony nonsensowne (E) [7, 8, 86]. Skonstruowano heterodupleks DNA, w którym tylko nić zawierająca mutageniczny oligonukleotyd nie posiadała mutacji amber w genach istotnych dla funkcjonowania wektora. Transfekcja komórek *E.coli* pozbawionych supresorów amber prowadziła do wybiórczej ekspresji nici zawierającej pożądaną mutację [86, 96, 97].

Przedstawione powyżej techniki mutagenезy, wprowadzające asymetrię dwu nici DNA, umożliwiają uzyskiwanie mutantów z wysoką wydajnością, co pozwala na ich selekcję bezpośrednio po sekwencjonowaniu. Techniki te nie są jednak pozbawione istotnych wad. Należą do nich: dość duża pracochłonność, konieczność dysponowania specyficznymi szczepami bakteryjnymi, lub konieczność specjalnego przygotowania wektora.

IV. Mutagenезa kasetowa

Zasada tej metody mutagenезy, przedstawiona na ryc. 5, jest bardzo prosta i polega na wymianie analizowanego fragmentu genu ograniczonego dwoma unikatowymi miejscami restrykcyjnymi, na syntetyczny dupleks zawierający pożądaną mutację czy



Ryc. 5. Ogólny schemat przebiegu mutagenезy kasetowej.

zespół mutacji. Metoda może być stosowana wyłącznie do dwuniciowych DNA i pozwala na uzyskiwanie substytucji zasad, insercji lub delecji z wydajnością sięgającą 100%.

Miejsca restrykcyjne wykorzystywane w mutagenезie kasetowej nie powinny znajdować się w odległości mniejszej niż 10 par zasad z uwagi na mogące wystąpić trudności z ilościowym usunięciem fragmentu naturalnego genu. Nie powinny też być oddalone bardziej niż o 100 pz ze względu na wysokie koszty chemicznej syntezy DNA. W sytuacjach gdzie miejsca restrykcyjne użyteczne dla mutagenезy kasetowej obejmują dłuższy odcinek DNA niż fragment, który ma być poddany analizie mutacyjnej, dobrym rozwiązaniem jest podzielenie kasety na część stałą, syntetyzowaną jednorazowo, oraz zmienną, zawierającą każdorazowo nowe mutacje [98-101].

Obok kryterium odległości pomiędzy miejscami restrykcyjnymi istotne są rodzaje końców pozostawionych w plazmidzie w wyniku usunięcia fragmentu naturalnego DNA. Pożądane jest, aby obydwa enzymy pozostawiały w DNA lepkie końce, o strukturach wykazujących znikomą tendencję do wzajemnych oddziaływań komplementarnych [102, 103]. Użycie pary restryktaz generujących tępe końce nie ma praktycznego zastosowania z uwagi na znacznie niższą efektywność ligowania insertu DNA i jego występowanie w dwóch orientacjach.

Warunek wystąpienia dwu blisko leżących miejsc restrykcyjnych w analizowanej części sklonowanego genu, nie posiadających powtórzeń w jego innych częściach i w wektorowym DNA, jest zwykle bardzo trudny do spełnienia. Nie oznacza to jednak, że zastosowania mutagenезy kasetowej ograniczają się do nielicznych przypadków korzystnego rozmieszczenia miejsc restrykcyjnych w plazmidzie [99, 101, 104]. Pożądane miejsca restrykcyjne można utworzyć jedną z metod opisanych w rozdziale III. W sytuacji gdy badana sekwencja koduje białko, możliwe jest wprowadzenie „cichych” mutacji. Polega to na utworzeniu w tzw. potencjalnych miejscach restrykcyjnych nowych sekwencji poprzez zamianę jednej lub dwóch zasad. Sekwencje te, nie zmieniając właściwości kodujących DNA, są rozpoznawane przez odpowiednie restryktazy [103, 105, 106]. Do wyszukiwania potencjalnych miejsc restrykcyjnych służą przygotowane w tym celu programy komputerowe [107, 108]. Schemat eksperymentu, w którym najpierw za pomocą mutagenicznego oligonukleotydu utworzono obydwie unikatowe sekwencje rozpoznawane, a następnie wykorzystano je w mutagenезie kasetowej, przedstawiony jest na Ryc. 6. W eksperymencie tym jeden z kodonów metioniny w genie białka subtylizyny zastępowano kodonami dla pozostałych 19-tu aminokwasów [103].

Syntetyczna kasetka zawierać może pojedyncze mutacje [98, 102] lub ich większą ilość w miejscu jednej zasady, na krótkim odcinku DNA np. kodonie [103,

sunku do wektora może mieć również wpływ na wydajność procesu, chociaż bardzo dobre wydajności mutantów osiągnano stosując zarówno dwukrotny [101] jak i 30-krotny [103] nadmiar kasyety.

Metoda mutagenazy kasetowej zalecana jest w przypadkach gdy małe fragmenty genów lub inne niewielkie segmenty DNA poddawane będą intensywnej analizie mutacyjnej.

V. Mutagenaza przez częściową lub całkowitą syntezę genu

Pożądaną mutację lub miejsca restrykcyjne niezbędne do prowadzenia mutagenazy kasetowej wprowadzano również poprzez częściową [98, 102] lub całkowitą [114] syntezę genu. W przypadku krótkich genów, które można utworzyć z 2-4 syntetycznych dupleksów, kolejne mutanty otrzymywano powtarzając wielokrotnie proces składania genu, każdorazowo z innym zestawem dupleksów [115]. Rozwój tej metody nastąpił w wyniku znacznego postępu metodycznego i technicznego w syntezie chemicznej oligodezoksynukleotydów [116-122]. Automatyczne syntezatory DNA umożliwiają syntezę oligomerów o długości do 200 nukleotydów [123]. Tak długie fragmenty DNA wykorzystywane są obecnie jedynie w chemiczno-enzymatycznej metodzie syntezy genów [124-127]. Optymalna długość fragmentów stosowanych w metodzie chemicznej wynosi 50-80 nukleotydów, gdyż takie oligomery można znacznie oczyścić na żelach poliakrylamidowych. Obydwie metody syntezy genów przedstawiono schematycznie na ryc. 7.

Całkowita synteza genu w przeciwieństwie do klonowania genomowego DNA lub cDNA zapewnia możliwość pełnej kontroli nad sekwencją. Odpowiednio zaprojektowane miejsca klonowania, czy sekwencje oskrzydłające gen struktury eliminują konieczność złożonych niekiedy zabiegów, jakich wymaga adaptacja naturalnego genu lub cDNA do klonowania w wektorze.

Dla celów mutagenazy bardzo istotna jest możliwość wykorzystania zjawiska degeneracji kodu gene-

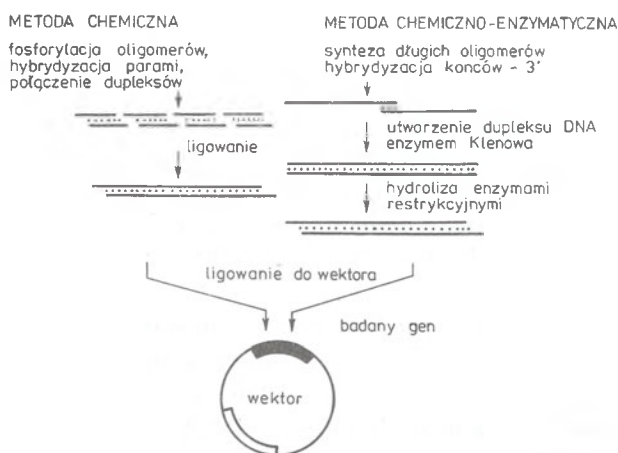
tycznego i zaprojektowania struktury genu w taki sposób, aby zawierał unikatowe miejsca restrykcyjne, rozmieszczone w odpowiednio krótkich odstępach. W praktyce każdy gen kodujący białko można tak skonstruować, aby posiadał pożądane miejsca restrykcyjne w odstępach nie większych niż 50 par zasad [123]. Przy modyfikacji struktury genu i wprowadzaniu nowych miejsc restrykcyjnych warto pamiętać o zróżnicowanym wykorzystywaniu poszczególnych kodonów przez komórki różnych organizmów [128-132]. Sprawa ta nabiera szczególnego znaczenia gdy planowane jest badanie ekspresji syntetycznego genu i jego mutantów zarówno w systemach homo- jak i heterologicznych. Odpowiednio zaprojektowaną strukturę genu kodującego interferony [133] przedstawia ryc. 8.

Opisano już wiele przypadków ekspresji syntetycznych genów kodujących najczęściej mutanty naturalnie występujących enzymów [123, 134-138]. Od niedawna otrzymywane są w ten sposób białka nieposiadające odpowiedników w przyrodzie, na przykład charakteryzujące się składem aminokwasów zapewniającym optymalne wartości żywieniowe [127, 129]. Podobne zastosowania syntetycznych genów mogą być podstawą rozwoju nowych, bardzo atrakcyjnych biotechnologii.

VI. Uwagi końcowe

W artykule przedstawiono cztery najważniejsze metody stosowane w mutagenzie *in vitro*. Z uwagi na objętość pracy pominięto szereg zagadnień szczegółowych oraz pewne problemy ogólne mutagenazy, których dyskusję czytelnik znajdzie w materiale źródłowym i w obszernych pracach przeglądowych [5, 6, 10, 140]. Więcej uwagi niż w innych opracowaniach poświęcono natomiast ostatnio wprowadzonym modyfikacjom metod mutagenazy sterowanej oligonukleotydami, a także mutagenzie kasetowej oraz osiąganą przez syntezę genu. Dwie ostatnie metody zilustrowano także szczegółowymi, reprezentatywnymi przykładami zastosowań.

Informacje przedstawione w artykule nie wyróżniają szczególnie żadnej z przedstawionych metod. Jest to zgodne z intencją autorów, gdyż wybór optymalnej metody mutagenazy spośród szeregu niemal równie efektywnych procedur zależeć będzie tak od celu mutagenazy i charakterystyki badanego materiału genetycznego, jak od posiadanego zaplecza laboratoryjnego. Mutagenaza chemiczna nie wymaga na przykład stosowania syntetycznych oligonukleotydów, podczas gdy kolejne przedstawione metody opierają się we wzrastającym stopniu na sprawnie działającym warsztacie syntezy chemicznej oligodezoksynukleotydów. Warunkiem niezbędnym dla stosowania każdej z metod mutagenazy jest natomiast stosowanie technik sekwencjonowania DNA. Z uwagi na konieczność szybkiego potwierdzenia wystąpienia mutacji w genie o znanej sekwencji nukleotydów, zalecana jest, prosta



Ryc. 7. Dwie metody syntezy genów.

M Q D P Y V K E A E N L K K Y F N
GAATTCATATGCAGGACCCGTACGTAAGGAAGCGGAGAACCTGAAAAAGTACTTCAAC
EcoRI *SnaBI* *ScaI*
CTTAAGGTATACGTCCTGGGCATGCATTTCTTCGCCTCTTGGACTTTTTTCATGAAGTTG
10 20 30 40 50 60
A G H S D V A D N G T L F L G I L K N W
GCAGGTCACTCTGATGTAGCAGACAATGGTACCCTGTTTCTGGGCATCCTGAAGAAGTGG
KpnI
CGTCCAGTGAGACTACATCGTCTGTTACCATGGGACAAAGACCCGTAGGACTTCTTGACC
70 80 90 100 110 120
K E E S D R K I M Q S Q I V S F Y F K L
AAAGAAGAATCGGACCGTAAAATCATGCAAAGCCAAATCGTAAGCTTCTATTTCAAACCTG
RsrII *HindIII*
TTTCTTCTTAGCCTGGCATTTTTAGTACGTTTCGGTTTAGCATTTCGAAGATAAAGTTTGAC
130 140 150 160 170 180
F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D
TTCAAGAACTTCAAAGACGACCAATCGATCCAGAAATCCGTTGAAACCATTAAAGACGAT
Clai
AAGTTCTTGAAGTTTCTGCTGGTTAGCTAGGTCTTTAGGCAACTTTGGTAATTTCTCCTA
190 200 210 220 230 240
M N V K F F N S N K K K R D D F E K L T
ATGAACGTGAAGTTTTTCAACTCCAACAAAAAGAAACGCGATGACTTCGAAAAGTTAACT
XmnI *HpaI*
TACTTGCACTTCAAAAAGTTGAGGTTGTTTTTCTTTGCGCTACTGAAGCTTTTCAATTGA
250 260 270 280 290 300
N Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q W
AACTATTCGGTGACCGACCTGAACGTACAACGCAAAGCTATCCACGAGCTCATCCAGGTT
BstEII *SacI*
TTGATAAGCCACTGGCTGGACTTGCAATGTTGCGTTTCGATAGGTGCTCGAGTAGGTCCAA
310 320 330 340 350 360
M A E L S P A A K T G K R K R S Q M L F
ATGGCTGAACTGTCTCCTGCAGCTAAAACCGGCAAGCGTAAACGTTCCCAAATGCTGTTT
PstI
TACCGACTTGACAGAGGACGTCGATTTTGGCCGTTTCGCATTTGCAAGGGTTTACGACAAG
370 380 390 400 410 420
Q G R R A S Q
CAAGGTCGTCGCGCTAGCCAGTAATAAGGATCCGAGCTT
NheI *BamHI*
GTTCCAGCAGCGGATCGGTCATTATTCCTAGGCTCGAA
430 440 450

Ryc. 8. Struktura syntetycznego genu interferonu- δ , z miejscami restrykcyjnymi zaprojektowanymi w niewielkich odstępach. Powyżej sekwencji obydwu nici DNA zaznaczono sekwencje aminokwasów wyrażoną kodem jednoliterowym.

w użyciu, enzymatyczna metoda sekwencjonowania [24, 141, 142].

Ogromna większość dotychczasowych zastosowań mutagenyzy *in vitro* dotyczy modyfikacji struktury genów kodujących białka. Od 1986 roku ukazuje się nowy periodyk naukowy *Protein Engineering* prezentujący prace z tej dziedziny.

Szerokie perspektywy stosowania metody mutagenyzy sterowanej w badaniach różnych klas kwasów rybonukleinowych otworzyły się dopiero niedawno wraz z opracowaniem układów wydajnej transkrypcji *in vitro* wykorzystujących właściwości polimeraz RNA fagów SP6 [143, 144], T7 [145, 146] i T3 [147, 148]. Opisano już przykłady zastosowania mutagenyzy i transkrypcji *in vitro* w badaniach prekursorów mRNA [149, 150] i tRNA [151], dojrzałych cząsteczek tRNA [115], 5S-rRNA [152], 16S-rRNA [101, 102] i snRNA [153, 154] oraz wirusowych [155] i wiroidowych RNA [156, 157]. Aktualny stan rozwoju technik transkrypcji *in vitro* jest przedmiotem przygotowywanego odrębnego opracowania przeglądowego.

Artykuł otrzymano 22 września 1988 r.

Zaakceptowano do druku 20 listopada 1989 r.

Piśmiennictwo

1. Shortle D., DiMaio D., Nathans D., (1981) *Ann. Rev. Genet.*, **15**, 265-294
2. Smith M., (1982), *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 440-442.
3. Itakura K., Rossi J. J., Wallace R. B., (1984), *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 323-356.
4. Graik C. S., (1985), *BioTechniques*, **3**, 12-17.
5. Botstein D., Shortle D., (1985), *Science*, **229**, 1193-1201.
6. Smith M., (1985), *Ann. Rev. Genet.*, **19**, 423-462.
7. Carter P., (1986), *Biochem. J.*, **237**, 1-7.
8. Kunkel T. A., (1987), *Bio Rad Mol. Biol. Rep.*, **1**, 1-2.
9. Singer B., Kroger M., (1979), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **23**, 151-194.
10. Singer B., Kuśmirek J. T., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 655-693.
11. Leonard N. J., (1984), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **15**, 125-199.
12. Solnick D., (1981), *Nature*, **291**, 508-510.
13. Busby S., Irani M., de Crombrughe B., (1982), *J. Mol. Biol.*, **154**, 197-211.

14. Kadonaga J. T., Knowles J. R., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 1733-1745.
15. Hirose S., Takeuchi K., Suzuki Y., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 7258-7262.
16. Pine R., Huang P. C., (1987), *Methods in Enzymol.*, **154**, 415-430.
17. Shortle D., Botstein D., (1983), *Methods in Enzymol.*, **100**, 457-468.
18. Rogers S., Weiss B., (1980), *Methods in Enzymol.*, **65**, 201-211.
19. Ciampi M. S., Melton D. A., Cortese R., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 1388-1392
20. DiMaio D., Nathans D., (1980), *J. Mol. Biol.*, **140**, 129-142.
21. Kalderon D., Oostra B. A., Ely B. K., Smith A. S., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5161-5171.
22. Peden K. W. C., Nathans D., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 7214-7217.
23. Meyers R. M., Maniatis T., (1985), *Science*, **229**, 242-247.
24. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463-5467.
25. Messing J., (1983), *Methods in Enzymol.*, **101**, 20-78.
26. Fisher S. G., Lerman L. S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 1579-1583.
27. Myers R. M., Fisher S. G., Maniatis T., Lerman L. S., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3147-3159.
28. Myers R. M., Fisher S. G., Lerman L. S., Maniatis T., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3131-3145.
29. Shortle D., Nathans D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2170-2174.
30. Merlo D. J., Thompson D. V., (1987), *Anal. Biochem.*, **163**, 79-85.
31. Singer B., (1975), *Proc. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, **15**, 219-284.
32. Maxam A., Gilbert W., (1980), *Methods in Enzymol.*, **65**, 499-560.
33. Kunkel T. A., Schaaper R. M., Loeb L. A., (1983), *Biochemistry*, **22**, 2378-2384.
34. Kunkel T. A., Shearman C. W., Loeb L. A., (1981), *Nature*, **291**, 349-351.
35. Loeb L. A., (1985), *Cell*, **40**, 483-484.
36. Schaaper R. M., Kunkel T. A., Loeb L. A., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 487-491.
37. Warburton N., Boseley P. G., Porter A. G., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5837-5854.
38. Smith M., Gillam S., (1981), in "Genetic Engineering" vol.3, pp.1-32, Setlow J.K. and Hollander A. eds., Plenum Publ. Corp., New York.
39. Zoller M. J., Smith M., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6487-6500.
40. Ner S. S., Goodin D. B., Smith M., (1988) *DNA*, **7**, 127-134.
41. Hill D. E., Oliphant A. R., Struhl K., (1987), *Methods in Enzymol.*, **155**, 558-568.
42. Zoller M. J., Smith M., (1984), *DNA*, **3**, 479-488.
43. Nisbet I. T., Beilharz M. W., (1985), *Gene Anal. Techn.*, **2**, 23-29.
44. Wang A. M., Creasey A. A., Ladner M. B., Lin L., Strickler J., (1985), *Science*, **228**, 149-154.
45. Osinga K. A., van der Blick A. M., van der Horst G., Tabak H. F., Veeneman G. G., van Boom J. H., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 8595-8608.
46. Winter G., Carter P., Wayne M. M. Y., Blow D. M., Wilkinson A. J., Shi J. P., Fersht A. R., (1984), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 224-225.
47. Norrander J., Kempe T., Messing J., (1983), *Gene*, **26**, 101-106.
48. Gillam S., Smith M., (1979), *Gene*, **8**, 81-97.
49. Razin A., Hirose T., Itakura K., Riggs A. D., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4268-4270.
50. Gilam S., Smith M., (1979), *Gene*, **8**, 99-106.
51. Rawlings C. J., (1986), "Software Directory for Molecular Biologists", Macmillan Publishers Ltd., M Stockton Press.
52. Bishop M. J., Rawlings C. J., (1987), "Nucleic Acids and Protein Sequence Analysis", IRL Press, Oxford-Washington.

The European School of Oncology

1991

General information

on ESO Courses

and Seminars from:

ESO Vienna Office Hormayrgasse 51/7,
A-1170 Vienna Austria

Tel: 43/222/4501052 FAX: 4501051

53. Gillam S., Astell C. R., Smith M., (1980), *Gene*, **12**, 129-137.
54. Zoller M. J., Smith M., (1983), *Methods in Enzymol.*, **100**, 468-500.
55. Yanish-Perron C., Viera J., Messing J., (1985), *Gene*, **33**, 103-107.
56. Zagursky R. J., Baumeister K., Lomax M., Berman M. L., (1985), *Gene Anal. Techn.*, **2**, 89-94.
57. Chen E. Y., Seeburg P. M., (1985), *DNA*, **4**, 165-170.
58. Wallace R. B., Johnson P. F., Tanaka S., Shold M., Itakura K., Abelson J., (1980), *Science*, **209**, 1396-1400.
59. Greenfield L., Simpson L., Kaplan D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **407**, 365-375.
60. Charles A. D., Gautier A. E., Edge M. D., Knowles J. R., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 7930-7932.
61. Nilsson B., Uhlen M., Josephson S., Gatenbeck S., Philipson L., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 8019-8030.
62. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K., (1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3647-3656.
63. Baldi M. I., Mattocia E., Tocchini-Valentini G. P., (1983), *Cell*, **35**, 109-115.
64. Dalbadie-McFarland G., Cohen L. W., Riggs A. D., Morin C., Itakura K., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 6409-6413.
65. Rettenmeyer C. W., Roussel M. F., Quinn C. O., Kitchingam G., Look A. T., Sherr C. J., (1985), *Cell*, **40**, 471-481.
66. Morinaga Y., Franceschini T., Inouye S., Inouye M., (1984), *DNA Biotechnol.*, **2**, 636-639.
67. Oostra B. A., Harvey R., Ely B. K., Markham A. F., Smith A. E., (1983), *Nature*, **304**, 456-459.
68. Straus D., Raines R., Kawashima E., Knowles J. R., Gilbert W., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 2272-2276.
69. Kalderson D., Richardson W. D., Markham A. F., Smith A. E., (1984), *Nature*, **311**, 33-38.
70. Kozak M., (1984), *Nature*, **308**, 241-246.
71. Kramer B., Kramer W., Fritz H. J., (1984), *Cell*, **38**, 879-887.
72. Mantsala P., Zalkin H., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14230-14236.
73. Paluh J. L., Zalkin H., Betsch D., Weith M. L., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 1889-1894.
74. Schold M., Colombero A., Reyes A., Wallace R. B., (1984), *DNA*, **3**, 469-477.
75. Lewis E. D., Chen S., Kumar A., Blanck G., Pollack R. E., Manley J. L., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7065-7069.
76. Nossal N. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5668-5678.
77. Geisselsolder J., (1987), *BioRad Mol. Biol. Rep.*, **1**, 6-7.
78. Geisselsolder J., Witney F., Yuckenberg P., (1987), *BioTechniques*, **5**, 786-797.
79. Walder R. Y., Walder J. A., (1986), *Gene*, **42**, 133-139.
80. Burke D. T., Olson M. V., (1986), *DNA*, **5**, 325-332.
81. Norris K., Norris F., Christiansen L., Fill N., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 5103-5112.
82. Gillam S., Astell C. R., Jahnke P., Hutchison C. A. H., Smith M., (1984), *J. Virol.*, **52**, 892-896.
83. Gillam S., Atkinson T., Markham A., Smith M., (1985), *J. Virol.*, **53**, 708-709.
84. Kunkel T. A., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 488-492.
85. Kunkel T. A., Roberts J. D., Zakour R. A., (1987), *Methods in Enzymol.*, **154**, 367-382.
86. Carter P., Bedouelle H., Winter G., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4431-4443.
87. Garter P., (1987), *Methods in Enzymol.*, **154**, 382-403.
88. Vosberg H. P., Eckstein F., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6595-6599.
89. Potter B. V. L., Eckstein F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 14243-14248.
90. Taylor J. W., Schmidt W., Cosstick R., Okruszek A., Eckstein F., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8749-8764.
91. Taylor J. W., Ott J., Eckstein F., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8765-8785.
92. Sayers J. R., Schmidt W., Eckstein F., (1988), *Nucleic Acids Res.*, **16**, 791-802.
93. Horton R., Lord S., (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5112.
94. Kramer W., Schughart K., Fritz H. J., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6475-6485.
95. Marmenout A., Remaut E., van Boom J., Fiers W., (1984), *Mol. Gen. Genet.*, **196**, 126-133.
96. Kramer W., Drutsa V., Jansen H. W., Kramer B., Pflugfelder M., Fritz H. J., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 9441-9456.
97. Kramer W., Fritz H. J., (1987), *Methods in Enzymol.*, **154**, 350-367.
98. Lo K. M., Hackett N. R., Khorana H. G., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 2285-2289.
99. Eisenbeis S. J., Nasoff M. S., Noble S. A., Bracco L. P., Dodds D. R., Caruthers M. M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1084-1088.
100. Grundsrom T., Zenke W. M., Wintzerith M., Matthes H. W. D., Straub A., Chambon P., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3305-3316.
101. Krzyżosiak W. J., Denman R., Cunningham P., Ofengand J., (1988), *Mol. Gen. Genet. w druku*.
102. Krzyżosiak W. J., Denman R., Nurse K., Hellmann W., Boubik M., Gehrke C. W., Agris P., Ofengand J., (1987), *Biochemistry*, **26**, 2353-2364.
103. Wells J. A., Vasser M., Powers D. B., (1985), *Gene*, **34**, 315-323.
104. Hui A., Hayflick J., Dinkespiel K., de Boer H. A., (1984) *EMBO J*, **3**, 623-629.
105. Wharton R. P., Brown E. L., Ptashne M., (1984), *Cell*, **38**, 361-369.
106. Kadonaga J. T., Gauthier A. E., Straus D. R., Charles A. D., Edge M. D., Knowles J. R., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 2149-2154.
107. Arentzen R., Ripka W. C., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 777-787.
108. Little J. W., Mount D. W., (1984), *Gene*, **32**, 67-73.
109. Looman A. C., Bodlaender A., Comstock L. J., Eaton D., Jhurani P., de Boer H. A., van Knippenberg P. H., (1987), *EMBO J.*, **6**, 2489-2492.
110. Lin C. C., Simonsen C. C., Levinson A. D., (1984), *Nature*, **309**, 82-85.
111. Matteuci M. D., Hayneker H. L., (1983), *Nucleic Acids Res.*, **11**, 3113-3121.
112. Huthinson C. A., Norden S. K., Vogt K., Edgel M. H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 710-714.
113. Porter S. D., Smith M., (1986), *Nature*, **320**, 766-768.
114. Nambiar K. P., Stackhouse J., Stauffer D. M., Kennedy W. P., Eldredge J., Benner S. A., (1984), *Science*, **223**, 1299-1301.
115. Lowary P., Sampson J., Milligan J., Groebe D., Uhlenbeck O. C., (1986), *NATO ASI Ser., A* **110**, 69-76.
116. Sinha N. D., Biernat J., McManus J., Koster H., (1983) *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4539-4557.
117. Garegg P. J., Regberg T., Stawiński J., Stromberg R., (1985), *Chemica Scripta*, **26**, 280-285.
118. McBride L. J., Kierzek R., Beaucage S. L., Caruthers M. M., (1986), *J. Amer. Chem. Soc.*, **108**, 2040-2048.
119. Froehler B. C., Matteuci M. D., (1986), *Nucleic Acids Res.*, **14**, 5399-5407.
120. Caruthers M. M., (1985), *Science*, **230**, 281-285.
121. Stawiński J., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 45-69.
122. Markiewicz W. T., (1987), *Kosmos*, **36**, 281-288.
123. Edwards M., (1987), *Int. Biotech. Lab.*, **10**, 19-25.
124. Rossi J. J., Kierzek R., Huang T., Walker P., Itakura K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 9226-9229.
125. Scarpulla R. C., Narang S. A., Wu R., (1982), *Anal. Biochem.* **121**, 356-365.
126. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6369-6387.
127. Biernat J., Hasselmann H., Hofer B., Kennedy N., Koster H., (1987), *Protein Eng.*, **1**, 353-358.
128. Grosjean H., Fiers W., (1982), *Gene*, **18**, 199-209.
129. Ikemura T., (1981), *J. Mol. Biol.*, **151**, 389-409.
130. Sharp P. M., Li W. H., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1281-1295.
131. Varenne S., Buc J., Lloubes R., Lazdunski C., (1984), *J. Mol. Biol.*, **180**, 549-576.

132. Kozak M., (1983), *Microbiol. Rev.*, **47**, 1-45.
133. Jay E, McKnight D., Lutze-Wallace C., Harrison D., Wishart P., Liu W. Y., Asundi V., Pomeroy-Cloney L., Rommens J., Eglinton L., Pawlak J., Jay F., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 6311-6317.
134. Leathebarrow R. J., Fersht A. R., (1986), *Protein Eng.*, **1**, 7-16.
135. Gearing D. P., McMullen G. L., Nagley P., (1985), *Biochem. Int.*, **10**, 907-915.
136. Ikehara M., Ohtsuka E., Tokunaga T., Nashikawa S., Uesugi S., Tanaka T., Aoyama Y., Kidyodani S., Fujimoto K., Yanase K., Fachimura K., Marioka H., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4695-4699.
137. Nambiar K. P., Stackhouse J., Presnell S. R., Benner S. A., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **163**, 67-71.
138. Jigami Y., Muraki M., Harada N., Tanaka H., (1986), *Gene*, **43**, 273-279.
139. Biernat J., Koster H., (1987), *Protein. Eng.*, **1**, 353-358.
140. Wood R. D., Sedgwick S. G., (1986), *Mutagenesis*, **1**, 399-405.
141. Wrzesiński J., Krzyżosiak W. J., (1990), *Post. Biochem.*, artykuł poprzedzający.
142. Płaza G., (1987), *Post. Biochem.*, **33**, 489-500.
143. Butler E. T., Chamberlin H. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5772-5778.
144. Kontani H., Ishizaki Y., Hiraoka N., Obayashi A., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2653-2661.
145. Davanloo P., Rosenberg A., Dunn J. J., Studier F. W., (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 2035-2039.
146. Tabor S., Richardson C. C., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **82**, 1074-1078.
147. Bailey J. N., McAllister W. T., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5071-5088.
148. Bailey J. N., Klement J. F., McAllister W. T., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 2814-2818.
149. Melton D. A., Krieg P. A., Rebagliati M. R., Maniatis T., Zinn K., Green M. R., (1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7035-7056.
150. Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Seiler S., Sharp P. A., (1986), *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 1119-1150.
151. Reyes V. M., Abelson J., (1987), *Anal. Biochem.*, **166**, 90-106.
152. Romaniuk P. J., de Stevenson I. L., Wong A., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2737-2755.
153. Hamm J., Kazmaier M., Mattaj J. W., (1987), *EMBO J.*, **6**, 3479-3485.
154. Maniatis T., Reed R., (1987), *Nature*, **325**, 673-678.
155. van der Werf S., Bradley J., Wimmer E., Studier F. W., Dunn J. J., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2330-2334.
156. Visvader J. E., Forster A. C., Symons R. M., (1985), *Nucleic Acids Res.*, **13**, 5843-5856.
157. Tabler M., Sanger H. L., (1985), *EMBO J.*, **4**, 2191-2199.

Naturalne substancje antymutagenne i antykancerogenne

Natural antimutagenic and anticarcinogenic compounds

IWONNA RAHDEN-STAROŃ¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Inhibitory mutageny działające poza komórką docelową
 - II-1. Związki hamujące powstawanie endogennych mutagenów
 - II-2. Związki inaktywujące mutageny
- III. Inhibitory mutageny działające wewnątrz komórki docelowej
 - III-1. Związki działające na metabolizm komórkowy
 - III-1.1. Związki obniżające częstość podziałów komórkowych
 - III-1.2. Związki działające na mikrosomowe enzymy metabolizujące ksenobiotyki
 - III-1.3. Związki działające na enzymy pozamikrosomowe
 - III-2. Związki blokujące reaktywne mutageny i kancerogeny
 - III-3. Związki wpływające na procesy naprawy i replikację DNA
- IV. Inhibitory promocyjnej fazy kancerogenezy
- V. Inhibitory fazy progresji
- VI. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Inhibitors of mutagenesis acting extracellularly
 - II-1. Inhibitors of the endogenous formation of mutagens
 - II-2. Compounds inactivating mutagens
- III. Inhibitors of mutagenesis acting intracellularly
 - III-1. Modulators of metabolism
 - III-1.1. Compounds lowering the frequency of mitosis
 - III-1.2. Compounds affecting microsomal drug metabolizing enzymes
 - III-1.3. Compounds affecting non-microsomal enzymes
 - III-2. Compounds blocking reactive molecules of mutagens and carcinogens
- III-3. Modulators of DNA repair of replication
- IV. Inhibitors of tumor promotion
- V. Inhibitors of tumor progression
- VI. Final remarks

Stosowane skróty:

Trp-P-1 (3-amino-1,4-dimetylo-5) H-pirido [4, 3-b] indol
 Trp-P-2 (3-amino-1-metylo-5) H-pirido [4, 3-b] indol
 Glu-P-1 (2-amino-6-metylodipiridol [1, 2-a:3; 2'-d]-imidazol
 IQ (2-amino-3-metyloimidazo [4, 5-f] chinolina

I. Wstęp

Coraz powszechniejsza obecność związków mutagennych w środowisku człowieka powoduje częste

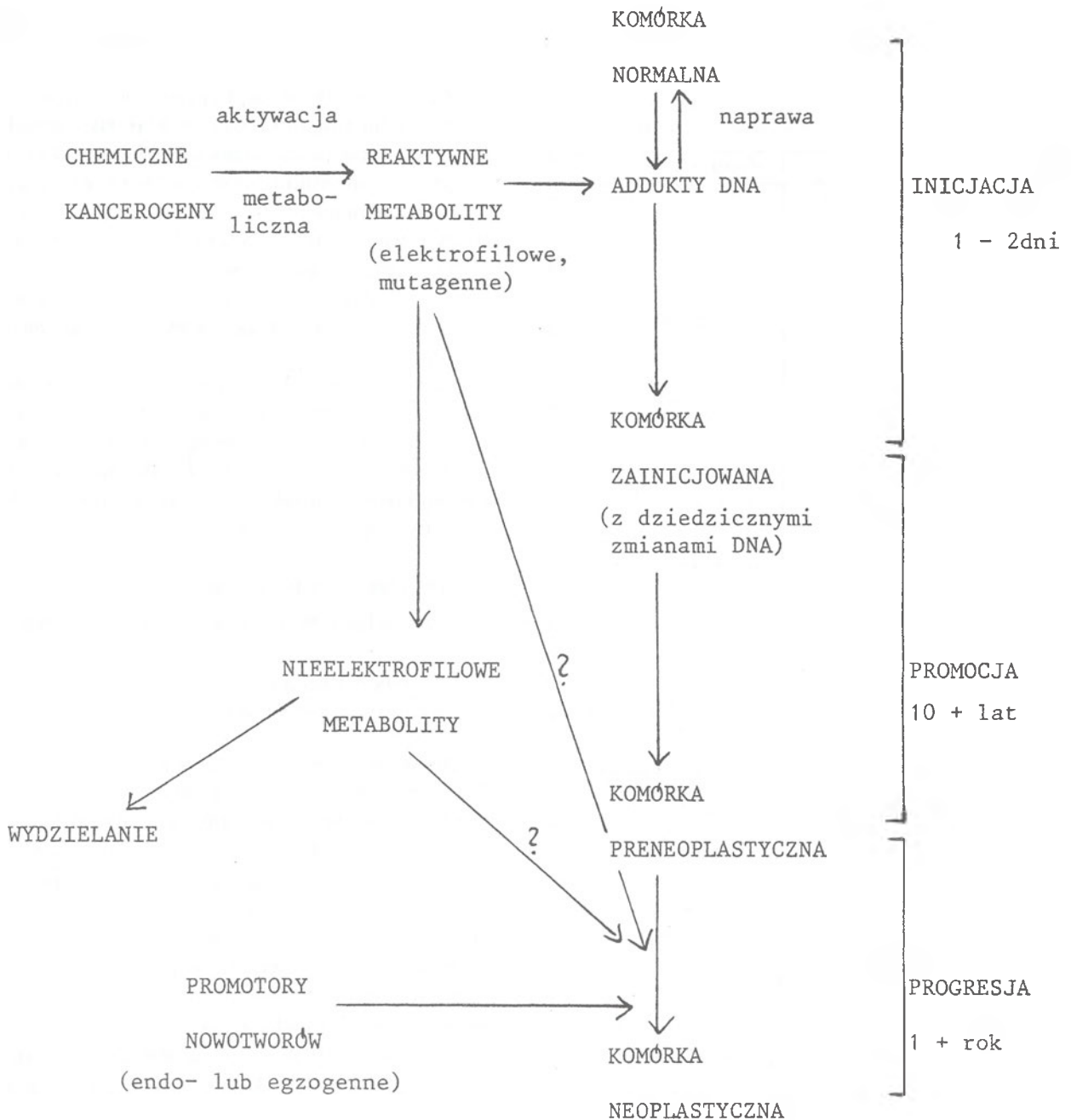
¹ dr n. przyr., Zakład Biochemii, Instytut Biofarmacji, Akademia Medyczna, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa
 Artykuł napisano w ramach prac finansowanych z C.P.B.R. 11.5.4 „Zwalczanie chorób nowotworowych” koordynowanych przez Instytut Onkologii w Warszawie.

i liczne uszkodzenia DNA, które są jedną z przyczyn powstawania nowotworów i zaburzeń genetycznych. Pomimo wysiłków na rzecz ograniczenia poziomu czynników mutagennych (oraz niemutagennych kancerogenów) w otoczeniu człowieka wydaje się, że długo jeszcze będą one poważnym źródłem zagrożenia. Stąd poszukiwanie czynników o charakterze antymutagenów i antykancerogenów, przeciwdziałających lub znoszących aktywność środowiskowych mutagenów i kancerogenów. Znaczną grupę antymutagenów i antykancerogenów zidentyfikowano wśród naturalnych składników pożywienia [1,2]. Im właśnie poświęcony jest niniejszy artykuł.

Znajomość działania związków o charakterze antymutagenów i antykancerogenów wiąże się ściśle

z naszą wiedzą o mutagenezie i kancerogenezie. Ta pierwsza jest stosunkowo dobrze poznana i zdefiniowana. Nie da się tego natomiast powiedzieć o znacznie bardziej złożonym procesie powstawania nowotworów. Z praktycznego punktu widzenia wyróżnia się trzy etapy kancerogenezy: inicjację, promocję i progresję. Każdy z nich stwarza możliwość interwencji mającej na celu niedopuszczenie do powstania nowotworu (ryc. 1).

Procesy zachodzące podczas inicjacji prowadzą do powstania mutacji somatycznych. Wiele wywołujących je związków nie ma żadnych właściwości genotoksycznych (promutageny). Pojawiają się one dopiero po przekształceniu tych związków w reaktywne pochodne w mikrosomach wątroby. Procesy takie za-



Ryc. 1. Schemat wieloetapowego procesu kancerogenezy indukowanego przez chemiczne kancerogeny lub kancerogeny i związki promotorowe.

chodzą w ciągu kilku pierwszych godzin ekspozycji. Biorąc jednak pod uwagę to, że wiele tkanek ma zdolność reperacji powstałych uszkodzeń DNA w ciągu kilku dni, a czasem tygodni, zanim zostaną utrwalone w stabilne mutacje, okres skutecznej interwencji może ulec pewnemu wydłużeniu.

Zdecydowanie dłuższy jest okres promocji, kiedy to zainicjowana komórka przekształca się w komórkę preneoplastyczną lub całkowicie zmienioną. Może to trwać kilka lat. Promocja może mieć charakter spontaniczny, może jednak zachodzić w wyniku działania promotorów, tj. związków chemicznych przyspieszających etap promocji. W tym ostatnim przypadku istnieje możliwość zahamowania procesów zachodzących podczas promocji. Taka interwencja, następująca po lub w czasie długotrwałej ekspozycji na promotor, może owocować opóźnionym pojawieniem się objawów chorobowych.

Ostatni etap kancerogenezy, progresja, może być

również wykorzystany do interwencji, przynajmniej w niektórych przypadkach.

Działanie antymutagenne i antykancerogenne w różnych etapach procesu nowotworowego stwierdzono dla licznych związków chemicznych, tworzących ponad 20 różnych grup [3]. W niniejszym artykule będą omówione tylko te spośród nich, które są składnikami naturalnego pożywienia.

Do niedawna jeszcze punktem ciężkości badań nad związkami antymutagennymi i antykancerogennymi była ich identyfikacja oraz empiryczne poznanie skutków ich działania. Obecnie coraz więcej prac koncentruje się na mechanizmach antymutagennej czy antykancerogennej aktywności zidentyfikowanych już substancji. Próbuje się one wyjaśnić, czy aktywne związki działają przez hamowanie oddziaływań między DNA a mutagenem, rozkład aktywnej formy mutagenu, hamowanie metabolicznej aktywacji promutagenu czy też inaktywację enzymów aktywujących promutagen. W przypadku naturalnych składników pokarmowych nie są to jeszcze prace bardzo zaawansowane. Pozwalają jednak na opracowanie klasyfikacji tych związków opartej o mechanizmy ich działania. Taki system klasyfikacji antymutagenów i antykancerogenów, sformułowany przez W a t t e n b e r g a [3], K a d a i n; [4], R a m e l a i n. [5], S h a n k e l a i n. [6] oraz D e F l o r e i n. [7] przedstawiony jest w tabeli 1.

Procesy chemicznej kancerogenezy zachodzą nie tylko w komórce, która ulegnie transformacji, lecz również w wielu innych komórkach, tkankach oraz płynach ustrojowych. Dlatego też inhibitory mutageny i kancerogenezy podzielono generalnie na takie, które działają poza- i wewnątrz komórki docelowej. W dalszej części artykułu omawiane są naturalne antymutageny i antykancerogeny w oparciu o klasyfikację przedstawioną w tabeli 1.

II. Inhibitory mutageny działające poza komórką docelową

II-1. Związki hamujące powstawanie endogennych mutagenów

Klasyką reakcją prowadzącą do powstania endogennych mutagenów i kancerogenów jest reakcja między azotynami i aminami zachodząca w kwaśnym środowisku żołądka. Powstające związki N-nitrozowe stanowią dobrze scharakteryzowaną grupę mutagenów i kancerogenów. Spośród przetestowanych 300 takich związków ponad 90% wywołuje nowotwory u 40 gatunków zwierząt, w tym u naczelnych [8]. Jednym z najlepiej poznanych związków hamujących powstawanie związków N-nitrozowych jest kwas askorbinowy, który w środowisku kwaśnym (pH 2–5) *in vitro* i *in vivo* redukuje kwas azotawy do NO [9, 10, 11].

Innymi — poza kwasem askorbinowym — inhibitorami powstawania związków N-nitrozowych są: dzia-

Tabela 1

Mechanizmy działania inhibitorów mutageny i kancerogenezy

klasyfikacja	przykłady
1. Inhibitory mutageny działające poza komórką docelową	
1.1. Hamujące powstawanie endogennych mutagenów	
1.1.1. hamujące reakcje nitrowania	wit. C, tokoferole, fenole
1.2. Deaktywujące mutageny	
1.2.1. przez reakcje chemiczne	tiole, przeciwutleniacze
1.2.2. przez reakcje enzymatyczne	warzywa z aktywnością peroksydazy
2. Inhibitory mutageny działające wewnątrz komórki docelowej	
2.1. Modulatory metabolizmu	
2.1.1. hamujące replikację	retinoidy
2.1.2. hamujące aktywację promutagenów	modulatory reakcji fazy I (rośliny krzyżowe)
2.1.3. hamujące mechanizmy detoksykacyjne	fenole, tiole
2.2. Blokujące reaktywne cząsteczki	
2.2.1. reagujące z elektrofilami	
2.2.1.1. przez reakcje chemiczne	związki siarkowe
2.2.1.2. przez reakcje enzymatyczne	induktory reakcji fazy II
2.2.2. „zmiatacze” reaktywnych rodzajów tlenu	przeciwutleniacze
2.2.3. ochraniające nukleofilowe miejsca w DNA	kwas elagowy, retinoidy
2.3. Modulatory procesów naprawy lub replikacji DNA	
2.3.1. faworyzujące naprawę DNA	aldehyd cynamonowy, wanilina, tiole
3. Inhibitory działające na komórkę zainicjowaną lub neoplastyczną	
3.1. Modulatory etapu promocji nowotworu	
3.1.1. hamujące efekty genotoksyczne	patrz punkt 1 i 2
3.1.2. „zmiatające” wolne rodniki	przeciwutleniacze
3.1.3. hamujące proliferację komórki	retinoidy

lająca w warstwie lipidowej oraz w emulsjach witamina E [α - i γ - tokoferol [11, 12] oraz aktywne w środowisku kwaśnym 1,2- i 1,4-dihydroksyfenole (katechol, hydrochinon); 1,2,3-trihydroksyfenole (pirogalol, kwas galusowy); fenole z podstawnikami w pozycji p- (wanilina) i polifenole (kwas fenolowy, cynamonowy, tanninowy) [2, 11].

Związki N-nitrozowe, a w szczególności N-nitrozamidy, wydają się być odpowiedzialne za powstawanie nowotworów żołądka (typu nabłonkowego). Inicjacja tego procesu zachodzi prawdopodobnie już we wczesnym okresie życia jako konsekwencja spożywania pokarmów bogatych w azotyny i azotany oraz suszonych, wędzonych i konserwowanych ryb. Pewne znaczenie ma tu również dieta o dużej zawartości soli, prowadząca do uszkodzenia błony śluzowej żołądka. Zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka żołądka wiąże się więc w sposób oczywisty z ograniczeniem spożycia wymienionych wyżej produktów. Bardzo istotnym elementem zmniejszenia ryzyka jest jednak również zwiększenie spożycia, już od wczesnego dzieciństwa, tych owoców i jarzyn, które podnoszą poziom kwasu askorbinowego, witaminy E oraz polifenoli w żołądku. Pozytywna korelacja między spożyciem owoców i jarzyn a zmniejszonym występowaniem nowotworów żołądka i przełyku ma swoje potwierdzenie w badaniach epidemiologicznych [13].

II-2. Związki inaktywujące mutageny

Mutageny pochodzenia egzogenne mogą tracić swą aktywność przed osiągnięciem komórki docelowej. Wiele z nich ulega inaktywacji już w przewodzie pokarmowym. W reakcjach tych biorą udział obecne w diecie substancje o charakterze antymutagenów. Soki z wielu warzyw, w szczególności z kapusty [14] i brokułów [15] są źródłem peroksydazy oraz oksydazy NADPH, które zmniejszają mutagenność np. produktów pirolizy tryptofanu (Trp-P-2) [16].

Inaktywacja szeregu mutagenów, jak np. pirolizatów Trp-P-1, Trp-P-2 i Glu-P-1, odbywa się również przez nieodwracalną adsorpcję na włóknach obecnych w kapuście, łopianie czy rzodkiewce [17, 18]. Zjawisko adsorpcji wiąże się prawdopodobnie z wielokrotnie obserwowanym w badaniach epidemiologicznych antykancerogennym efektem diety bogato-resztkowej [19].

III. Inhibitory mutagenezy działające wewnątrz komórki docelowej

III-1. Związki działające na metabolizm komórkowy

III-1.1. Związki obniżające częstość podziałów komórkowych

Częstość podziałów komórkowych ma bezpośredni wpływ na inicjację kancerogenezy. Czym częstsze są

podziały komórkowe, tym mniejsza jest szansa naprawy uszkodzenia DNA i uniknięcia utrwalenia w postaci mutacji. To też komórki szybko dzielące się są bardziej podatne na działanie inicjatorów niż komórki nie ulegające podziałom [20]. Przykładem antykancerogennego działania opartego na obniżaniu częstości podziałów komórkowych jest ochronny efekt retinoidów na komórki epidermalne [21].

III-1.2. Związki działające na mikrosomowe enzymy metabolizujące ksenobiotyki

Jak już wspomniano na wstępie, większość chemicznych mutagenów nabywa właściwości mutagennych po przekształceniach zachodzących w komórce. Wiele prac, zapoczątkowanych przez badania Miller i Miller [22], wskazuje na wspólny mechanizm powstawania aktywnych form dla licznych mutagenów i kancerogenów. Mechanizm ten został poznany na podstawie badań nad działaniem enzymów metabolizujących ksenobiotyki.

Enzymy metabolizujące ksenobiotyki, obecne w wielu różnych tkankach, przekształcają niepolarne związki w formy lepiej rozpuszczalne w wodzie, a więc łatwiej usuwane z organizmu. Zaproponowana przez Williama [23] i uznawana powszechnie klasyfikacja tych enzymów wyróżnia dwie grupy. Do pierwszej należą enzymy katalizujące reakcje fazy I, tzn. wprowadzające do ksenobiotyków grupy polarne. Są to przede wszystkim reakcje katalizowane przez mikrosomalny system monoooksygenaz. Obecność grup polarnych umożliwia reakcje fazy II, katalizowane przez inną grupę enzymów, polegające na sprzęganiu przekształconych ksenobiotyków z kwasem glukuronowym, glutationem (GSH) lub siarczanami.

Aktywacja promutagenów i prokancerogenów dokonywana jest przez enzymy katalizujące reakcje fazy I. Enzymy katalizujące reakcje fazy II mogą brać udział w inaktywacji mutagenów i kancerogenów. W efekcie poziom mutagenów i kancerogenów ustala się jako wynik pewnej równowagi, na którą obok wymienionych wyżej procesów, wpływa szybkość rozkładania aktywnych form przez inne enzymy oraz ich spontaniczny rozkład.

Interwencja w działanie enzymów detoksykujących dotyczy przede wszystkim mikrosomowych enzymów systemu monoooksygenazy. Czynniki hamujące ich aktywność nazwane zostały przez W a t t e n b e r g a [3] czynnikami blokującymi.

Skutki interwencji w działanie enzymów detoksykujących są niezmiernie trudne do przewidzenia. Przede wszystkim enzymy te odpowiedzialne są za usuwanie z organizmu wszelkich niepolarnych ksenobiotyków i każda ingerencja zakłóca ten proces. Dalej — poszczególne grupy kancerogenów są aktywowane w odmienny sposób (np. C-hydroksylacja nitrozoamin, N-hydroksylacja amin aromatycznych, epoksydacja pierścieni węglowodorów aromatycznych, itd.). W efekcie ochronne działanie w stosunku do jednego kan-

cerogenu może wzmacniać aktywację innego. Wreszcie — niektóre działające w tym miejscu czynniki blokujące mają niekorzystne działania uboczne. I tak np. dodawany do pożywienia zwierząt selen powoduje wzrost aktywności jednego z enzymów detoksykujących, peroksydazy glutationowej [24], wzmacniając jednocześnie metaboliczną aktywację 2-acetyloaminofluorenu [25]. Wydaje się więc, że interwencje w działanie enzymów detoksykujących najłatwiej jest zaplanować wówczas, gdy ma ona dotyczyć dużych grup ludności narażonych na dominujące i silne czynniki kancerogenne.

Pomimo złożonych zależności między poszczególnymi elementami systemu enzymów detoksykujących niektóre dane doświadczalne wskazują na korzystny, z punktu widzenia działania przeciwnowotworowego, efekt netto wielu związków działających na te enzymy. Efekt taki obserwuje się np. dla flawonów, izotiocyjanianów, fenoli i indoli obecnych w roślinach krzyżowych, tak w warunkach eksperymentalnych [26], jak i w niektórych badaniach epidemiologicznych. Te ostatnie, choć jeszcze niekompletne, wskazują że spożywanie brukselki, kalafiorów, kapusty i brokułów zmniejsza ryzyko zachorowania na raka przewodu pokarmowego [27, 28]. Ów wielostronny efekt wyizolowanych z tych roślin fenoli, izotiocyjanianów i pochodnych indolu (indol-3-karbinol, 3,3'-diindolyl metan i indol-3-acetonitryl) dotyczy indukcji hydroksylazy aryłowęgłowodorowej, aktywującej niektóre prokancerogeny, ale również cytoplazmatycznej transferazy glutationowej, usuwającej aktywne formy innych związków rakotwórczych [29].

III-1.3. Związki działające na enzymy pozamikrosomowe

W cytozolu komórki obecne są, obok mikrosomowych enzymów detoksykujących, inne enzymy zaangażowane w metabolizm mutagenów i kancerogenów. Ulegają one łatwo indukcji, co stwarza możliwość interwencji. Należy tu przede wszystkim szereg enzymów cyklu glutationowego [30]. Innym enzymem jest DT diaforaza, obecnie intensywnie badana pod kątem jej aktywności antymutagennej i antykancerogennej. Wiąże się to z katalizowaną przez DT diaforazę dwuelektronową reakcją przekształcania barwników azowych i chinonów. Prowadzi to do powstania nieaktywnych produktów końcowych, co stanowi konkurencję dla 1 elektronowych reakcji zachodzących z udziałem cytochromu P-450, które prowadzą do powstania toksycznych semichinonów i reaktywnego tlenu [31]. DT diaforaza jest indukowana przez wiele związków, m.in. β -naftoflawony, które równocześnie indukują cytochrom P-450 przez wiązanie specyficznego receptora Ah [7].

III-2. Związki blokujące reaktywne mutageny i kancerogeny

Usuwanie reaktywnych mutagenów i kancerogenów z komórki jest bardzo obiecującą strategią w profilaktyce przeciwnowotworowej. Najczęściej stosowanymi inhibitorami są związki wiążące elektrofilowe metabolity oraz „zmiatające” rodniki tlenowe. Stąd są to często związki o właściwościach nukleofilowych i przeciwutleniające.

Wiązanie reaktywnych cząsteczek odbywa się na drodze enzymatycznej lub spontanicznie. Ten pierwszy mechanizm obejmuje wspomniane wcześniej (pkt. III-1.2) reakcje fazy II. Enzymy katalizujące te reakcje to: transferaza UDP-glukuronylu, sulfotransferazy i acetylotransferazy, transferaza glutationowa. Szczególne znaczenie przypisuje się rodzinie izoenzymów tego ostatniego enzymu, katalizującego reakcję koniugacji glutationu z elektrofilami [30].

Transferaza glutationowa jest enzymem łatwo ulegającym indukcji. Jej aktywność często wykorzystywana jest jako test na obecność czynników blokujących w naturalnych produktach żywnościowych [26]. Właściwości indukcyjne wobec transferazy glutationowej wykazują fenole, indole, aromatyczne izotiocyjaniany (kumaryna), dwuterpeny, niepolarnie flawony i ditiotioniany [2, 5, 26, 29, 32].

Niezwykle istotnym czynnikiem uszkadzającym cząsteczki DNA są rodniki tlenowe naturalnie tworzące się w komórce. W wyniku stopniowej czteroetapowej redukcji cząsteczki tlenu powstają trzy rodzaje mutagenów: ponadtlenki, nadtlenki i wolne rodniki hydroksylowe.

Cała grupa enzymów komórkowych rozkłada aktywne pochodne tlenu. Są to: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, reduktaza NAD (P) H: chinon oraz transferaza glutationowa. Co najmniej jeden z tych enzymów, peroksydaza glutationowa, wykazuje zależność od diety. W skład peroksydazy glutationowej wchodzi selen, czynnik o potwierdzonym epidemiologicznie działaniu antykancerogennym [33]. Wydaje się, że podstawowym mechanizmem takiego działania selenu jest jego udział w likwidacji aktywnych form tlenu.

Obok związków modulujących aktywność enzymów usuwających aktywne formy mutagenów i kancerogenów wiele składników diety spontanicznie usuwa owe aktywne formy. Szereg związków wykazuje właściwości przeciwutleniające, usuwając aktywne formy tlenu. Taką funkcję spełnia tokoferol w błonach lipidowych [34] oraz kwas askorbinowy w cytoplazmie [35, 36]. W tym ostatnim przypadku jest to już kolejna obok zapobiegania tworzenia związków N-nitrozowych (zob. pkt. II-1) funkcja antykancerogenna kwasu askorbinowego.

Spośród naturalnych przeciwutleniaczy obecnych w diecie zwierząt (myszy, szczury) oraz człowieka bardzo istotną rolę odgrywa β -karoten [37, 38]. β -ka-

roten i inne karotenoidy aktywnie uczestniczą w likwidacji związków utleniających zawartych w dymie papierosowym i smółce. W stosunku do rodników nadtlenkowych β -karoten jest bardziej wydajnym przeciwutleniaczem niż α -tokoferol i glutation [39].

Druga, obok przeciwutleniaczy, grupą związków spontanicznie reagujących z aktywnymi kancerogenami są związki wiążące cząsteczki o charakterze elektrofilowym. Klasycznym przykładem jest kwas elagowy, związek o charakterze fenolu, obecny w grejpfrutach, orzechach i kawie. Wiąże on kowalencyjnie aktywne formy benzo(a)pyrenu [40] obniżając ich mutageny efekt *in vitro* [41].

Inne i bardziej złożone jest działanie witaminy A. Z jednej strony przekształca się ona w komórce w kwas 5,6-epoksyretinowy, który konkuruje z mutagennymi epoksydami w ich reakcjach z DNA. Z drugiej strony obecne w diecie retinoidy podwyższają poziom prostaglandyn, które z kolei hamują wiązanie się niektórych mutagenów z cząsteczkami DNA [20].

III-3. Związki wpływające na procesy naprawy i replikacji DNA

Utrwaleniu się uszkodzenia DNA w postaci mutacji przeciwdziała wierna naprawa uszkodzenia. Stąd też stymulacja takiej naprawy ma w efekcie charakter antymutageny i antykancerogeny. Podobny efekt wykazuje stymulacja wierności replikacji DNA i zahamowanie systemu naprawy wprowadzającego błędy [4, 42].

Przykładem związków stymulujących wierną naprawę uszkodzeń DNA jest aldehyd cynamonowy i jego pochodna — kumaryna i umbeliferon oraz wawilina [43]. Wydaje się, że wszystkie te związki indukują system bezbłędnej naprawy DNA [44].

IV. Inhibitory promocyjnej fazy kancerogenezy

Faza promocyjna rozwoju nowotworów trwa bardzo długo, stwarzając tym samym wiele możliwości dla interwencji człowieka. Jest to jednocześnie faza bardzo słabo poznana, przez co obecna wiedza o działających w tej fazie antykancerogenach ma charakter wybitnie empiryczny.

W odróżnieniu od inicjacji faza promocji może być cofnięta lub opóźniona. Wymaga to zwykle ciągłego stosowania związków antypromocyjnych, zaś w przypadku naturalnych składników pożywienia — ich ciągłej obecności w diecie.

Wśród związków o aktywności antypromocyjnej spotyka się wiele takich, które wykazują również działanie antykancerogenne w fazie inicjacji. Są to przede wszystkim przeciwutleniacze, jako że wolne rodniki odgrywają olbrzymią rolę w promocji nowotworów [34, 45]. Stąd wiele naturalnych przeciwut-

leniaczy, jak witamina A i inne retinoidy, tokoferole, sole selenu czy chlorofilina wykazują aktywność antypromocyjną [3, 5].

Spośród retinoidów, prekursorów i pochodnych witaminy A, β -karoten, aldehyd retinowy, kwas retinowy i estry retinolu wykazują działanie ochronne przed eksperymentalnie indukowanymi nowotworami [37], tak w fazie inicjacji (zob. pkt. III-1.1) jak i promocji kancerogenezy. Szczególnie silną aktywność wykazuje β -karoten [46]. W większości przypadków działanie retinoidów wiąże się z przedłużeniem fazy promocyjnej. Jest prawdopodobne, że antykancerogeny efekt retinoidów nie wynika wyłącznie z ich właściwości przeciwutleniających. P e t k o v i c h i n. [47] wykazali, że kwas retinowy wiąże się ze swoistym receptorem, pochodnym receptora tyroidowego, powiązanego z onkogenem erb-A. Stosowanie retinoidów jako skutecznych antykancerogenów jest ograniczone ich toksycznością, występującą przy dużych dawkach.

Innym supresorem fazy promocyjnej, wymienionym wcześniej przy okazji hamowania inicjacji, jest witamina E. Jej przeciwutleniająca aktywność przejawia się szczególnie w przypadku wolnych rodników powstających w błonach biologicznych [48]. Podawana wraz z kwasem askorbinowym hamuje fazę promocyjną nowotworów indukowanych u zwierząt laboratoryjnych przez związki N-nitrozowe i aromatyczne węglowodory policykliczne [10].

Działanie antypromocyjne w stosunku do adenokarcynomy ostatniego odcinka jelita grubego indukowanej dimetylohydrazyną [49] oraz neoplazji żołądka indukowanej u myszy benzo(a)pyrenem [50] wykazują obecne w czosnku i cebuli sulfotlenki diallilu oraz metylosulfotlenek allilu. Podobne działanie w stosunku do kancerogenezy indukowanej u szczurów N-benzylometyloaminą i azotynami wykazuje obecna w gotowanym dorszu tioprolina [51].

Szczególny efekt antypromocyjny wykazuje odpowiedni dobór diety tłuszczowej. Tłuszcze spożywane w nadmiernych ilościach, są czynnikiem ryzyka powstawania nowotworów, szczególnie w jelicie grubym [52]. Wiąże się to z działaniem pośrednim: efekt promocyjny wykazują bowiem kwasy żółciowe wydzielane w zwiększonych ilościach przy diecie bogato-tłuszczowej. Odpowiedni dobór tłuszczu może łagodzić powyższy efekt. Liczba jądrowych aberracji w komórkach epitelialnych jelita grubego myszy karmionej karcinogenem IQ wzrasta przy jednoczesnym stosowaniu oleju kukurydzianego, zaś maleje przy podaniu oliwy z oliwek [53].

V. Inhibitory fazy progresji

Niewiele jest przykładów skutecznej interwencji w fazie progresji kancerogenezy. Jednym z nich jest cofanie się wczesnych zmian patologicznych w tkance epidermalnej pod wpływem retinoidów [21, 54]. Nie jest zupełnie jasne, czy taki efekt ma charakter trwały.

VI. Uwagi końcowe

Obecna wiedza o mechanizmach działania inhibitorów mutagenyzy i kancerogenyzy jest jeszcze bardzo fragmentaryczna. Jednakże korzyści jakich można spodziewać się po praktycznym zastosowaniu antymutagenów i antykancerogenów w profilaktyce, są przyczyną znacznego zainteresowania tymi związkami. Szczegółowe badania nad antymutagenami i antykancerogenami są konieczne; wiele z nich bowiem wykazuje wielostronne działania, nierzadko powodując szkodliwe efekty uboczne. Praktyczne zastosowanie antymutagenów i antykancerogenów musi więc poprzedzić selekcja najbardziej bezpiecznych związków oraz opracowanie optymalnych warunków ich stosowania.

Artykuł otrzymano 15 października 1989 r.
Zaakceptowano do druku 17 września 1990 r.

Piśmiennictwo

- Hayatsu H., Arimoto S., Negishi T., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 429–446.
- Hartman P. E., Shankel D. M., (1990), *Environ. Mol. Mutagen.*, **15**, 145–182.
- Wattenberg L. W., (1985), *Cancer Res.*, **45**, 1–8.
- Kada T., Inoue T., Namiki N., (1982) w: *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, red. Klekowski E. J., str. 137–151, Praeger, New York.
- Ramel C., Alekperov U. K., Ames B. N., Kada T., Wattenberg L. W., (1986), *Mutation Res.*, **168**, 47–65.
- Shankel D. M., Hartman P. E., Kada T., Hollaender A., (1987), *Environ. Mutagen.*, **9**, 87–103.
- De Flora S., Ramel C., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 285–306.
- Bartsch H., Oshima H., Munoz N., Crespi V., Casale V., Ramazzotti V., Lampert R., Minaire Y., Forichon Y., Walters C. L., (1984), w: *N-nitroso compounds: Occurrence, Biological Effects and Relevance to Human Cancer*, IARC Sci. Publ., No 57, International Agency for Research on Cancer, red. O'Neill I. K., von Borstel R. C., Miller C. T., Long J., Bartsch H., str. 995–962, Lyon.
- Mirvish S. S., Wallcave L., Eagen M., Shubik P., (1972), *Science*, **177**, 65–68.
- Mirvish S. S., (1986), *Cancer*, **58**, 1842–1850.
- Bartsch H., Oshima H., Pignatelli B., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 307–324.
- Mirvish S. S., (1986) w: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, red. Shankel D. M., Hartman P. E., Kada T., Hollaender A., str. 83–86, Plenum Press, New York.
- Bertram J. S., Kolonel L. N., Meyskens F. L., (1987), *Cancer Res.*, **47**, 3012–3031.
- Inoue T., Morita K., Kada T., (1981), *Agr. Biol. Chem.*, **45**, 345–353.
- Morita K., Yamada H., Iwamoto S., Sotomura M., Suzuki A., (1982), *J. Food Safety*, **4**, 139–150.
- Kada T., Morita K., Inoue T., (1978), *Mutation Res.*, **53**, 351–353.
- Kada T., Kato M., Aikawa K., Kiriyma S., (1984), *Mutation Res.*, **141**, 149–152.
- Takeuchi M., Hara M., Inoue T., Kada T., (1988), *Mutation Res.*, **204**, 263–267.
- Cummings J. H., (1981), *Vår Föda*, **33**, Suppl. 1, 83–96.
- Welsh C. W., Zile M. H., McCullum M. F., (1986), w: *Diet, Nutrition and Cancer: A critical Evaluation*, Vol. II, Micronutrients, Nonnutritive Dietary Factors and Cancer, red. Reddy B. S., Cohen L. A., str. 1–21; CRC, Boca Raton, Fl.
- Sporn M. B., Roberts A. B., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 3034–3040.
- Miller E. C., Miller J. A., (1966), *Pharmacol. Rev.*, **18**, 805–838.
- Williams R. T., (1971), w: *Handbook of Experimental Pharmacology*, red. Williams R. T., str. 226–249; Springer Verlag, Berlin.
- Wontzman M. S., Bresbis H. J., Cohen A. M., (1981), *Cancer Res.*, **40**, 2670–2676.
- Marshall M. V., Arnott M. S., Jacobs M. M., Griffin A. C., (1979), *Cancer Lett.*, **7**, 331–338.
- Wattenberg L., (1983), *Cancer Res.*, Suppl., **43**, 2448–2453.
- Graham S., Dayal H., Swanson M., Mittelman A., Wilkinson G., (1978), *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 709–714.
- Haenszel W., Locke F. B., Segi M., (1980), *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 17–22.
- Spornis V., Venegas P., Wattenberg L., (1982), *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 493–496.
- Ketter B., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 343–361.
- Lind C., Hochstein P., Enster L., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 178 – 185.
- Buending E., Ansher S., Dolan P., (1986), w: *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms*, red. Shankel D. M., Hartman P. E., Kada T., Hollaender A., str. 483 – 489; Plenum Press, New York.
- Wilett W. C., Polk B. F., Morris J. S., Stampfer M. J., Pressel S., Rosner B., Taylor J. O., Schneider K., Hames C. G., (1983), *Lancet*, ii, **8342**, 130 – 134.
- Simic M. G., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 377 – 386.
- Frei B., England L., Ames B. N., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9748 – 9752.
- DeLange R., Glazer A. N., (1989), *Anal. Biochem.*, **177**, 300 – 306.
- Peto R., Doll R., Buckley J. D., Sporn M. D., (1981), *Nature (Lond.)*, **290**, 201 – 208.
- Rousseau E. J., Davison A. J., Rosin M. P., (1989), *Environ. Mol. Mutagen.* **14** Suppl. 15, 167 – 174.
- Slater T. F., (1987), *Br. J. Cancer* **55** Suppl. 8, 5 – 9.
- Sayer J. M., Yagi H., Wood A. W., Conney A. H., Jerina D. M., (1982), *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5562 – 5564.
- Wood A. W., Huang M.-T., Chang R. L., Newmark H. L., Lehr R. E., Yagi H., Sayer J. M., Jerina D. M., Conney A. H., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5513 – 5517.
- Kada T., Inoue T., Ohta T., Shirasu Y., (1986) w: *Antimutagenic and Anticarcinogenic Mechanisms*, red. Shankel D. M., Hartman P. E., Kada T., Hollaender A., str. 181 – 196; Plenum Press, New York.
- Kada T., Kaneko K., Matsuzaki S., Matsuzaki T., Hara Y., (1985), *Mutation Res.*, **150**, 127 – 132.
- Kuroda Y., Inoue T., (1988), *Mutation Res.*, **202**, 387 – 391.
- Ito N., Hirose M., (1987), *Jpn. J. Cancer Res. (Gann.)*, **78**, 1011 – 1026.
- Suda D., Schwartz J., Shklar G., (1986), *Carcinogenesis*, **7**, 711 – 715.
- Petkovitch M., Brand N. J., Krust A., Chambon P., (1987), *Nature (Lond.)*, **330**, 444 – 450.
- Chen L. H., Boissonneault G. A., Glaubert H. P., (1988), *Anticancer Res.*, **29**, 175 – 274.
- Wargovich M. J., Goldberg M. T., (1985), *Mutation Res.*, **143**, 127 – 129.
- Spornis V. L., Barany G., Wattenberg L. W., (1988), *Carcinogenesis*, **9**, 131 – 134.
- Tahira T., Ohgaki H., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T., (1988), *Food. Chem. Toxicol.*, **26**, 525 – 532.
- National Research Council (1982), *Diet, Nutrition and Cancer*, National Academic Press, Washington, DC.
- Dolara P., Caderni G., Bianchini F., Tanganelli E., (1986), *Mutation Res.*, **175**, 255 – 258.
- Boutwell R. K., (1983) w: *Protective Agents in Cancer*, red. McBrien DCH., Slater T.F., str. 279 – 290; New York, Academic Press.

Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w 1990 roku

Działalność organizacyjna

1. Skład osobowy Zarządu Głównego:
Doc. dr hab. Zofia Poremska — prezes, prof. dr hab. Tadeusz Wilusz — wiceprezes, doc. dr hab. Jacek Kuźnicki — sekretarz, dr Ewa Wiśniewska-Szewczyk — skarbnik. Członkowie Zarządu Głównego doc. Andrzej Buranowski, prof. Maria Gumińska, dr Michał Komoszyński, doc. Henryk Kostyra, doc. Roman Tarnawski, prof. Zofia Walter, dr Teresa Wesołowska, doc. Maria Wojtaś-Wasilewska, doc. dr hab. Marian Wolny, prof. dr hab. Kazimierz Zakrzewski, doc. Krzysztof Zwierz, prof. dr hab. Mariusz Żydowo. Kierownik Biura Zarządu Głównego mgr Irena Kamińska.
2. Zarząd Główny działa również poprzez Oddziały Terenowe w Białymstoku, Gdańsku, Katowicach, Krakowie, Lublinie, Łodzi, Olsztynie, Poznaniu, Szczecinie, Toruniu, Warszawie, Wrocławiu.

Ważniejsze uchwały Organów Statutowych

1. Uchwalenie regulaminu konkursu na najlepszy wykład z biochemii i biologii molekularnej.
2. Powołanie Komisji Statutowej w celu uporządkowania spraw statutowych.
3. Uchwalenie podwyższenia składki członkowskiej z 1000 zł na 30000 zł.

Działalność naukowa

1. Organizacja XXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (13-15.09.1990) w Gdańsku z udziałem 375 uczestników z kraju i 30 zaproszonych gości, w tym 12 z zagranicy. Przedstawiono 17 referatów sympozjalnych i 213 doniesień w 5 sekcjach:
 - Metabolizm i efekty regulacyjne pochodnych purynowych i pirymidynowych
 - Biochemia nerki i transport jonów przez błony
 - Molekularne podstawy ochrony i wykorzystania ekosystemów morskich
 - Hormonalna regulacja metabolizmu
 - Glikokoniugaty
2. Jednodniowa konferencja naukowa (4.09.1990) we Wrocławiu p.t. „Molekularne podstawy mechanizmów odpowiedzi immunologicznej” zorganizowana przez Oddział Wrocławski. Tematy: Odpowiedź komórkowa, odpowiedź humoralna, regulacja odpowiedzi immunologicznej, immunoglobuliny jako przeciwciała i substancje efektorowe, jak wirus HIV wywołuje AIDS, abzymy — przeciwciała monoklonalne z aktywnością enzymatyczną.
3. XII Sesja Europejskich Towarzystw Tkanki Łącznej (9-13.07.1990) w Białymstoku przygotowana przez Oddział Białostocki.
4. W maju miała miejsce Sesja poświęcona pamięci prof. Włodzimierza Mozołowskiego organizo-

wana przez Oddział Gdański i Katedrę Biochemii Akademii Medycznej (Gdańsk, 1990).

5. Sekcja „Metabolizmu wapniowego” zorganizowała sesję p.t. Osteoporoza — problemy kliniczne”, w ramach Wielodyscyplinarnego Forum Osteoporotycznego (8.12.1990).
6. Przyznanie nagród im. prof. J. Parnasa, prof. B. Skarzyńskiego oraz prof. W. Mozołowskiego. Po raz pierwszy w bieżącym roku przyznano nagrodę za najlepiej przygotowany i wygłoszony wykład z biochemii i biologii molekularnej.
7. Przygotowanie XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Lublinie (1991), na którym przewidziano następujące sympozja:
 - Molekularna regulacja procesów wzrostu i różnicowania komórek somatycznych
 - Procesy biotechnologiczne w produkcji żywności i ochronie środowiska
 - Toksyczne oddziaływanie czynników środowiska na organizmy żywe
 - tRNA i syntetazy aminoacylo-tRNA
8. Przygotowywanie polsko-francuskiej sesji poświęconej metabolizmowi wapnia, która odbędzie się w 1991 r.

Działalność wydawnicza

1. „Postępy Biochemii” — kwartalnik Polskiego Towarzystwa Biochemicznego informuje o najnowszych osiągnięciach z dziedziny biochemii i biologii molekularnej. Pełni on również funkcję dydaktyczną: umożliwia młodszym pracownikom naukowym zdobywanie umiejętności przygotowywania artykułów przeglądowych, a wobec braku podręczników oraz dostępu do piśmiennictwa światowego, bywa też źródłem informacji dla studentów. W bieżącym roku Polskie Towarzystwo Biochemiczne podjęło próbę rozszerzenia tematyki pisma m.in. poprzez publikowanie artykułów promujących naukę polską oraz wprowadzenie tematyki dotyczącej nauczania biochemii.
2. Seria „Monografie Biochemiczne” — wydano kolejny tom p.t. „Glikoproteiny ssaków”. Następna monografia p.t. „Błony biologiczne” jest przygotowywana do druku.
3. „Listy” do członków Towarzystwa — wychodzą systematycznie, informują o wydarzeniach naukowych w środowisku biochemicznym.

Działalność w zakresie upowszechniania nauki

- Sesja poświęcona popularyzacji biochemii przez Oddział Warszawski p.t. „Co nowego w biologii molekularnej” (Warszawa 4.12.1990).
- Przygotowywanie pomocy naukowych (przeźroczka, tabele, modele) niezbędnych w nauczaniu biochemii i biologii molekularnej.

Zofia Poremska

Molekularne podłoże fenyloketonurii

Molecular basis of phenylketonuria

JADWIGA JARUZELSKA¹

RYSZARD SŁOMSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Klonowanie i analiza genu hydroksylazy fenyloalaninowej
- III. Lokalizacja genu hydroksylazy fenyloalaninowej
- IV. Struktura i funkcja hydroksylazy fenyloalaninowej
- V. Polimorfizm *loci* hydroksylazy fenyloalaninowej człowieka
- VI. Mutacje w genie hydroksylazy fenyloalaninowej
- VII. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Cloning and analysis of the gene of phenylalanine hydroxylase
- III. Localization of the gene of phenylalanine hydroxylase
- IV. Structure and function of phenylalanine hydroxylase
- V. Polymorphism in *loci* of human phenylalanine hydroxylase
- VI. Mutations in the gene of phenylalanine hydroxylase
- VII. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

PKU—fenyloketonuria, cDNA PAH—komplementarny DNA hydroksylazy fenyloalaninowej, mRNA PAH—messenger RNA hydroksylazy fenyloalaninowej, IR—inverted repeats (odwrotne powtórzenia), cAMP—cykliczny jednofosforan adenozyliny, RFLP—polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)

I. Wstęp

Klasyyczna fenyloketonuria, opisana przez Foelinga w 1934 roku, jest jedną z najczęściej występujących genetycznie uwarunkowanych wad metabolizmu, która przejawia się zaburzeniami w przemianie aromatycznych aminokwasów. U osób obarczonych tą autosomalną, recesywną cechą, zaobserwowano występowanie w moczu metabolitów fenyloalaniny, w wysokim stężeniu, m.in. fenylopirogrobianu, który u zdrowych osobników występuje w ilościach śladowych [1]. Wykazano również, że u chorych na fenyloketonurię nie dochodzi do hydroksylacji fenyloalaniny do tyrozyny z powodu niedoboru enzymu hydroksylazy fenyloalaninowej (PAH) [2, 3]. PAH (4-monooksygenaza fenyloalaninowa EC 1.14.16.1) katalizuje przetwarzanie fenyloalaniny w tyrozinę przy udziale tetrahydrobiopteryny jako kofaktora [4, 5]. Obniżona aktywność lub brak aktywności PAH prowadzi do pod-

niesienia poziomu fenyloalaniny i jej metabolitów w surowicy krwi [5]. Obserwuje się również nieprawidłowości w metabolizmie tyrozyny i tryptofanu [6], obniżenie syntezy katecholamin, melaniny i serotoniny [7]. Leczenie fenyloketonurii (dieta) musi zostać podjęte bezpośrednio po urodzeniu, celem uniknięcia znacznego niedorozwoju umysłowego wywołanego toksycznymi związkami uszkadzającymi tkankę mózgową [4, 5]. Hiperfenyloalaninemia może mieć również inne podłoże niż zaniżoną aktywność PAH, np. może wynikać z niedoboru reduktazy dwuhydropteryny, syntetazy biopteryny lub innych systemów enzymatycznych [7].

Pomimo ustalenia bloku metabolicznego wywołującego PKU, dopiero niedawno opracowano sposoby identyfikacji nosicieli (heterozygot) oraz prenatalnego wykrywania PKU. PAH występuje jedynie w wątrobie i nie ulega ekspresji w fibroblastach, komórkach trofoblastu i płynu owodniowego używanych zwykle w diagnostyce prenatalnej. Konwencjonalne testy enzymatyczne stosowane w prenatalnej diagnostyce defektów metabolicznych nie mogły być zastosowane [8]. Bardzo pomocne w rozwiązaniu tego problemu stały się, rozwijane w ostatnich latach, metody molekularnej analizy genetycznie uwarunkowanych chorób. Zastosowanie technik rekombinacji DNA doprowadziło do izolowania i określenia struktury genów, umożliwiło analizę białkowych produktów genów i pomogło w przygotowaniu molekularnych testów do wykrywania szeregu chorób genetycznych [9]. Podjęto również próbę izolowania i analizy genu PAH oraz jego białkowego produktu u człowieka. W *Postęпах Biochemii* ukazał się artykuł Ziętkiewicza i Słomskiego przedstawiający zastosowanie technik biologii molekularnej w genetyce człowieka [9].

II. Klonowanie i analiza genu PAH

Sklonowanie i analiza ludzkiego genu poprzedzone zostały klonowaniem cDNA PAH szczura. Poprzez immunoprecypitację polisomów komórek wątroby wyizolowano mRNA PAH szczura i przepisano na cDNA drogą odwrotnej transkrypcji. Rekombinanty zawierające fragmenty genu PAH wyselekcjonowano na podstawie różnicowej hybrydyzacji, translacji w układzie bezkomórkowym oraz immunoprecypitacji uzyskanych produktów białkowych [10]. W ten sposób otrzymano dwa klony — prPH191 i prPH198, które

¹Dr, ²Doc. dr hab.

Zakład Genetyki Człowieka PAN, Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

następnie subklonowano w plazmidzie pBR322. Mapowanie restrykcyjne wykazało, że sekwencja uzyskanych klonów była w znacznym stopniu homologiczna i reprezentowała połowę cząsteczki mRNA *PAH* szczura, której wielkość oszacowano na około 2,5 kilobaz. Klony zsekwencjonowano, poddając analizie obie nici DNA aby uniknąć błędów. Ponieważ klony cDNA *PAH* nie zawierały sygnału poliadenylacji, nie było pewności co do ich orientacji 5'-3'. Wyjaśniła to komputerowa analiza sekwencji obu klonów cDNA, znajdując ramkę odczytu 246 aminokwasów, po których następował terminujący kodon UGA, a za nim 423 nukleotydy niekodującej sekwencji 3'. Wewnątrz sekwencji w ramce odczytu występował tylko jeden kodon metioniny, zlokalizowany w pozycji 243 – 245. Stąd oczekiwano, że po fragmentowaniu bromocyjanem białka odpowiadającego powyższej sekwencji powinno się uzyskać peptyd o wielkości 177 aminokwasów, o masie 18.000 daltonów odpowiadający części aminokwasów końca karboksylowego.

Celem upewnienia się, że uzyskane klony cDNA odpowiadają sekwencjom kodującym *PAH* wątroby szczura, należało chociaż częściowo oznaczyć sekwencję aminokwasów enzymu. Przez działanie bromocyjanem na oczyszczony enzym uzyskano dwa peptydy o masie 32.000 i 18.000 daltonów. Powyższy wynik potwierdza wcześniejsze doniesienia o masie cząsteczki enzymu (określonej na 50.000 daltonów) i obecności tylko jednej reszty metioniny [11]. *PAH* jest enzymem cytoplazmatycznym o zablokowanym końcu aminowym dlatego celem oznaczania sekwencji pierwszych 18 aminokwasów końca aminowego stosowano metodę Edmana. Sekwencję tę porównano następnie z sekwencją ramki odczytu klonów cDNA i wykazano pełną zgodność sekwencji aminokwasów z sekwencją nukleotydów. Klony te posłużyły następnie do identyfikacji ludzkich klonów cDNA *PAH* metodą krzyżowej hybrydyzacji. Z kolei klony cDNA *PAH* człowieka zastosowano do celów diagnostycznych [12, 13].

Sklonowany cDNA *PAH* szczura prPH98 (pochodna prPH198) posłużył jako specyficzna sonda hybrydacyjna do przeglądania biblioteki ludzkiego cDNA z mRNA wątroby [14]. W ten sposób oceniono około 40.000 transformantów i uzyskano kilka klonów DNA, zawierających fragmenty sekwencji 0,3 – 1 kb kodujące *PAH* człowieka. Dwa klony z największymi fragmentami ludzkiego cDNA *PAH* — phPH72 i phPH73 posłużyły jako sondy hybrydacyjne do identyfikacji pełnej sekwencji cDNA *PAH* [12]. W tym celu ponownie przygotowano bibliotekę ludzkiego cDNA z mRNA *PAH* (0,1% całkowitego komórkowego mRNA wątroby człowieka). Przy użyciu klonu phPH72 wyselekcjonowano z biblioteki zawierającej 14 mln transformantów 4, z fragmentami cDNA *PAH* o wielkości 2 – 2,5kb i największy fragment odpowiadający wielkości mRNA *PAH* subklonowano w plazmidzie pBR322. Uzyskany w ten sposób rekombinant phPAH247 poddano analizie

restrykcyjnej wykazując unikalne miejsca rozpoznania enzymów restrykcyjnych: XbaI, BglIII, XhoI, BamHI oraz po dwa miejsca restrykcyjne HindIII i NcoI, co pozwoliło na oznaczenie sekwencji obydwu nici insertu za pomocą metody Maxama i Gilberta. cDNA wklonowany w plazmid phPAH247 zawierał 2448 i 19 par zasad stanowiących sygnał dla poliadenylacji końca 3' mRNA. W sekwencji tej stwierdzono ramkę odczytu, która zaczyna się w pozycji 233 kodonem ATG (metionina), a kończy w pozycji 1579 kodonem TAA. Można założyć, że kodon ATG w pozycji 233 jest inicjującym kodonem odpowiadającym metioninie, ponieważ kodony terminujące wykryto we wszystkich trzech ramkach odczytu w nie ulegającym translacji regionie 3'. Region kodujący ma długość 1353 pb i koduje 451 aminokwasów. Region 5' nie ulegający translacji ma długość 200 pb i w pozycji 105 – 114 zawiera sekwencję UCGUUACCGC, w 80% homologiczną z końcem 3' 18S rRNA [15]. Ta sekwencja może służyć jako miejsce wiązania 18S rRNA podczas translacji. Region ten zawiera również dwie sekwencje typu IR o wielkości 13 pb wykazujące 77% homologii w pozycji 44 – 56 i 108 – 120; mogą one brać udział w tworzeniu struktury łodyżki (ang. *stem loop*). Region 3' nie ulegający translacji wynosi 851 pb i zawiera wiele kodonów terminujących we wszystkich ramkach odczytu. Występują ponadto 3 sekwencje AATAAA w pozycjach 2198, 2347 i 2413. Odległość pomiędzy ostatnią sekwencją a sekwencją poliA wynosi 13pb i prawdopodobnie ma ona znaczenie w dojrzewaniu mRNA i w poliadenylacji [16].

Plazmid phPAH247 zastosowano w badaniach struktury prawidłowego genu *PAH* człowieka. Za jego pomocą z genomowej biblioteki ludzkiego DNA w kosmidach wyizolowano klony pokrywające w sposób ciągły fragment o wielkości 120 kb obejmujący cały gen *PAH*. W ten sposób z dużą dokładnością określono wielkość genu *PAH* oraz rozmieszczenie i wielkości eksonów i intronów. Gen *PAH* koduje białko o długości 451 aminokwasów, zawiera 13 eksonów o wielkości 57 – 892pb (średnia wielkość 114 ± 43 pb) i 12 intronów o bardzo zróżnicowanej wielkości (1 – 24 kb).

XIIth European Section Meeting
INTERNATIONAL SOCIETY FOR HEART RESEARCH
September 10-11-12-13, 1991
Leuven, Belgium

Address for correspondence:

ISHR Leuven 1991
Provisorium I, KULeuven,
Minderbroedersstraat 17
B-3000 Leuven, Belgium.

Tel. (016) 21 72 98

Fax (016) 21 74 87

Na pełną sekwencję genu *PAH* składa się 2,3 kZ eksonów oraz 85 kZ intronów (Ryc. 1). Stosunek kodujących do niekodujących części genu jest jednym z najniższych wśród znanych genów eukariotycznych. Podobnie gen ludzkiego czynnika VII [17] oraz tyreoglobuliny [18] mają długość ponad 100 kZ, a długość ich mRNA wynosi zaledwie 7,8 kZ. W przeciwieństwie, gen witellogeniny o wielkości 23 kZ koduje mRNA o wielkości 6,6 kZ i zawiera 25 intronów o średniej wielkości 940 pz. Opisane dla wielu genów korelacje pomiędzy rozmieszczeniem intronów a właściwościami struktury białka nie są zgodne z teorią insercyjnego pochodzenia intronów [20,21]. Plazmid phPH247 uległ ekspresji po wprowadzeniu do komórek co potwierdziło, że zawiera pełną informację dla prawidłowego funkcjonowania enzymu [22]. Ponadto stwierdzono, że *PAH* jest genem pojedynczym i nie występują pseudogeny [21].

III. Lokalizacja genu hydroksylazy fenyloalaniny

Do zlokalizowania genu *PAH* na chromosomie człowieka przyczyniły się badania Woo i współautorów, w których wykorzystano komórki hybrydowe zawierające chromosomy myszy lub chomika i wybrane chromosomy ludzkie oraz sondę hybrydacyj-



Ryc. 1. Struktura genu hydroksylazy fenyloalaninowej człowieka. Kolejne numery oznaczają eksony genu. Strzałki oznaczają polimorficzne miejsca restrykcyjne [47].

ną w postaci cDNA *PAH* człowieka (klon phPH72). W pierwszym etapie badań ustalono, że sonda hybryduje z fragmentem restrykcyjnym BamHI 20,5 kZ ludzkiego DNA. Z kolei w DNA myszy, poddanym analizie w tych samych warunkach, sonda hybryduje z fragmentem restrykcyjnym o wielkości 5,7 kZ, co wskazuje na wysoką homologię genów *PAH* myszy i człowieka. Ponieważ gen *PAH* występuje w ludzkim genomie w pojedynczej kopii i nie występują pseudogeny, obecność ludzkiego genu *PAH* w hybrydach komórek zawierających mysie oraz ludzkie chromosomy może być wykazana na podstawie wielkości fragmentów restrykcyjnych mysiego i ludzkiego genu. W DNA wszystkich komórek hybrydowych wykazano obecność prążków hybrydacyjnych o wielkości 10,4 i 5,7 kZ, natomiast jedynie tam gdzie obecny był ludzki chromosom 12 wykryto również obecność prążka o wielkości 20,5 kZ — typowego dla ludzkiego genu. Na podstawie sprzężeń z innymi genami ustalono, że gen *PAH* znajduje się w długim ramieniu tego chromosomu [23]. W drugim etapie badań przystąpiono do dokładniejszej lokalizacji genu *PAH* w obrębie długich ramion chromosomu 12 przeprowadzając hybrydacje z DNA komórek hybrydowych zawierających, poza chromosami chomika, ludzkie chromosomy 12 z delecjami. Istotne było przeprowadzenie różnicowej hybrydacji między genem *PAH* człowieka i chomika. W tym celu genomowy DNA wyizolowany z prawidłowych ludzkich limfocytów oraz z komórek CHOK1 trawiono restryktazą BamHI i analizowano metodą Southerna, stosując jako sondę hybrydacyjną pełnej długości cDNA *PAH* (phPAH247) [16]. W ten sposób uzyskano w ludzkim DNA 5 fragmentów BamHI o wielkości 20,5 12,0, 9,4, 8,7 i 5,5 kZ i dwa fragmenty 28 i 8 kZ w trawionym DNA komórek ChOK1 chomika. Spośród siedmiu typów komórek hybrydowych wszystkie zawierały 2 fragmenty odpowiadające *PAH* chomika, a tylko w trzech wykazano dodatkowo obecność fragmentów BamHI odpowiadających genowi *PAH* człowieka. W kolejnym etapie przeprowadzono uzupełniającą analizę, polegającą na badaniu sprzężenia genu *PAH* z genami enzymów wcześniej zlokalizowanych na długim ramieniu chromosomu 12 — izomerazy triozofosforanowej 1 (TPI-1), dehydrogenazy gliceroaldehydo-3-fosforanowej (GAPDH), dehydrogenazy mleczanowej B (LDHB), enolazy 2 (ENO2), hydroksymetylotransferazy serynowej (SHMT) i peptydazy B (PEPB) [24,25]. Wykazano, że gen *PAH* występował w sprzężeniu z locus genu *PEPB* w miejscu 12q21 [24]. W czwartym etapie badań nad lokalizacją *PAH* zastosowano hybrydację *in situ* sondy phPAH247 z chromosomami płytek metafazalnych ludzkich komórek limfoidalnych, transformowanych wirusem Epstein-Barr. Przez barwienie chromosomów metodą uwiadczenia prążki G oraz wnikliwą analizę matematyczną autoradiogramów wykazano, że gen *PAH* znajduje się w regionie 12q22 – q24.1 [8].

IV. Struktura i funkcja hydroksylazy fenyloalaniny

Masa *PAH* wynosi około 100.000 daltonów i enzym składa się z dwóch podjednostek o masie 50.000 daltonów. Do niedawna nie było zgodności co do struktury natywnego enzymu *PAH* u ssaków. W badaniach elektroforetycznych w warunkach denaturujących uzyskiwano 2 prążki odpowiadające monomerycznym podjednostkom. Według wielu autorów enzym jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek różniących się właściwościami biochemicznymi i immunologicznymi [26 – 32]. Doniesienia innych autorów wskazują, że enzym zbudowany jest z dwóch identycznych podjednostek reprezentujących fosforylowaną lub defosforylowaną formę peptydu [33,34]. Niezwykle ważne było rozstrzygnięcie, czy obserwowane peptydy stanowią produkty jednego czy dwóch różnych genów. Odpowiedź na to pytanie uzyskano po transfekcji do linii komórek ssaków (nie wykazujących aktywności *PAH*) ekspresyjnego wektora eukariotycznego z pełnej długości cDNA człowieka. Transformowane komórki wykazywały obecność mRNA *PAH* oraz aktywność *PAH* [22]. Podobny wynik uzyskano, po wprowadzeniu do bakterii cDNA *PAH* z wektorem ulegającym ekspresji w bakteriach. Powyższe wyniki ostatecznie dowiodły, że ludzki enzym *PAH* jest homodimerem kodowanym w locus 12q22.22–24.1 [8]. Dotychczas wyizolowano *PAH* z wątroby szczura, małpy i człowieka [26,31,35,36], a wielkość monomerów wynosiła 50.000 daltonów. *PAH* szczura jest substratem kinazy białkowej zależnej od cAMP i można wyizolować zarówno fosforylowane jak i niefosforylowane formy białka [37]. Holoenzym jest metaloproteiną zawierającym jeden mol żelaza na mol podjednostki i jego kofaktora tetrahydrobiopteryny [16]. Oznaczenie sekwencji kodującej gen *PAH* szczura (cDNA) umożliwiło poznanie pierwszorzędowej struktury białka, określenie jego wielkości na 51.672 daltonów [28,31,36].

Z porównania sekwencji cDNA *PAH* człowieka i szczura wynika, że sekwencje do końca 3' są w znacznym stopniu homologiczne, szczególnie w regionach kodujących [38]. Homologia sekwencji nukleotydów w eksonach genu *PAH* szczura i człowieka wynosi 89%, natomiast homologia aminokwasów wynosi 96%. Wynika to z tzw. utajonych mutacji (ang. *silent mutations*) nie zmieniających sekwencji aminokwasów. Różnice sekwencji dotyczą zaledwie 10 spośród 245 aminokwasów i są one substytucjami nie wpływającymi na sekwencję aminokwasów [16]. Szczególnie interesująca jest konserwatywność sekwencji miejsca fosforylacji *PAH*. U szczura leży ona w obrębie sekwencji aminokwasowej: Ser-Arg-Lys-eu-SerP-Asx-Phe-Gly-Glx-Glx [39]. Podobna sekwencja występująca pomiędzy 11 a 20 aminokwasem aminowego końca wynika z wydedukowanej sekwencji ludzkiego genu. Pierwsza seryna we fragmencie enzymu szczura

jest u człowieka zastąpiona resztą glicyny. Homologia pomiędzy sekwencją *PAH* człowieka i szczura jest zgodna z odległością ewolucyjną obydwu gatunków. Natomiast w regionie 3' nie ulegającym translacji homologia ta wynosi zaledwie 30%. Potwierdza to doniesienie o eukariotycznych genach różnych gatunków, których nie ulegające translacji regiony 3' i 5' wykazywały większe różnice, niż w sekwencjach kodujących [16]. Aktywność *PAH* szczura, wzrasta po fosforylacji w obecności naturalnego kofaktora tetrahydrobiopteryny, katalizowanej przez kinazę białkową zależną od cAMP [34]. Podobny wzrost aktywności enzymatycznej był również obserwowany *in vivo* w wątrobie szczura po zastosowaniu glukagonu, co sugeruje, że aktywność enzymu jest regulowana przez fosforylację i defosforylację [13,40].

Hydroksylaza fenyloalaniny występuje u kręgowców [41] i bakterii [42,43]. Enzym bakteryjny wykazuje wiele cech eukariotycznego odpowiednika, chociaż jego ciężar cząsteczkowy wynosi zaledwie 25.000 – 30.000 [42,43]. U *Chromobacterium violaceum* występują dwie hydroksylazy zależne od pteryny, z których jedna jest specyficzna dla fenyloalaniny a druga dla tryptofanu [42]. Nie wiadomo, czy istnieje homologia pomiędzy tymi hydroksylazami i zróżnicowanymi hydroksylazami wyższych Eukaryota [44].

V. Polimorfizm loci hydroksylazy fenyloalaninowej człowieka

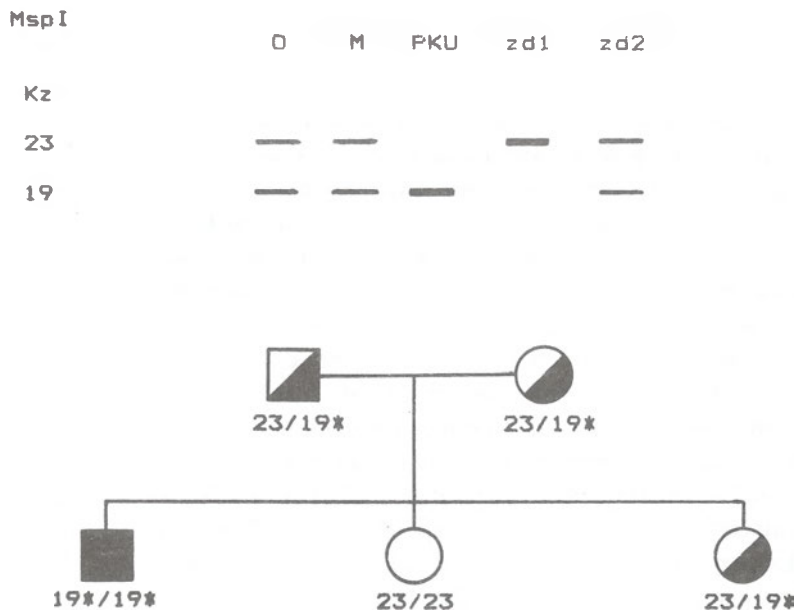
Na podstawie nowszych badań sekwencji DNA człowieka stwierdzono, że w liczącym 3 mld nukleotydów genomie występuje jedna substytucja na 100 – 300 nukleotydów. W toku ewolucji zmutowane geny szeroko rozprzestrzeniły się w populacji ludzkiej. Większość substytucji nukleotydów nie ulega fenotypowej ekspresji, lecz może być wykryta, ponieważ ulega zmianie struktura miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych DNA (ang. *restriction fragment length polymorphism* — *RFLP*) dziedziczony jest zgodnie z prawami Mendla i może być łatwo wykryty metodą Southerna przy użyciu specyficznych sond hybrydacyjnych. Polimorficzne fragmenty DNA mogą służyć jako genetyczne markery w wykrywaniu zmutowanych genów pod warunkiem, że można wykazać sprzężenie zmutowanego genu z fragmentem restrykcyjnym genu. W krótkim czasie analiza polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych (*RFLP*) stała się jedną z najważniejszych metod w genetyce molekularnej człowieka. Została również zastosowana przez Woo i współautorów w diagnostyce PKU i wykrywaniu nosicieli zmutowanego genu *PAH* [12]. Na podstawie analizy restrykcyjnej DNA w duńskich rodzinach wyróżniono osiem enzymów restrykcyjnych użytecznych w analizie *RFLP* w fenyloketonurii: *MspI*, *SphI*, *HindIII*, *EcoRV*, *EcoRI*, *XmnI*, *BglII*, *PvuII* pozwalających na diagnozowanie ponad 98.5% ro-

Ryc. 2. Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych genu hydroksylazy fenyloalaninowej w rodzinie, w której wystąpiła fenyloketonuria.

Genomowy DNA ojca (O), matki (M), dziecka z fenyloketonurią (PKU) i zdrowych dzieci (zd1 i zd2) trawiono enzymem restrykcyjnym MspI i hybrydyzowano metodą Southerna z sondą molekularną zawierającą pełnej długości cDNA hydroksylazy fenyloalaninowej człowieka (phPAH247).

W górnej części ryciny schematycznie przedstawiono układ prążków hybrydyzacyjnych u członków rodziny.

W dolnej części ryciny przedstawiono rodowód tej rodziny. Symbole biało-czarne oznaczają nosicieli fenyloketonurii, występują u nich allele prawidłowe o wielkości 23 kZ i zmutowane o wielkości 19 kZ. Symbol czarny — dziecko płci męskiej z fenyloketonurią posiada obydwa zmutowane allele (*) o wielkości 19 kZ. Dziecko zdrowe nie będące również nosicielem posiada dwa prawidłowe allele o wielkości 23 kZ.



rodzin, u których wystąpiła już uprzednio PKU [45]. Polimorfizm w locus *PAH* jest na tyle częsty, że dla większości rodzin, u których wystąpiła PKU, można wykonać diagnostykę prenatalną oraz ustalenie nosicielstwa. W analizie zmutowanego genu w rodzinach z PKU, porównuje się z RFLP DNA rodziców oraz chorego dziecka. Przykład analizy restrykcyjnej DNA członków rodziny, u której wystąpiła fenyloketonuria przedstawiono na rycinie 2. DNA członków tej rodziny trawiono restryktazą MspI. Gemy w homologicznych chromosomach obojga rodziców mogą być rozróżnione, ponieważ w jednym z nich brak sekwencji rozpoznawanej przez restryktazę MspI, co prowadzi do powstania fragmentu MspI o wielkości 23,0 zamiast 19,0 kZ. Chore dziecko odziedziczyło od ojca i matki obydwa chromosomy zawierające miejsca rozpoznawane przez enzym MspI. Zmutowane geny są sprzężone w tej rodzinie z fragmentem 19,0 a prawidłowe z fragmentem 23,0 kZ. Obydwa prawidłowe chromosomy zostały przekazane dziecku, które jest zdrową homozygotą. W rodzinach z dwojgiem chorych dzieci segregacja zmutowanych alleli oraz stan choroby były całkowicie zgodne [46,47].

Układy alleli wykrywane przez enzymy restrykcyjne oraz sondę hybrydyzacyjną cDNA *PAH* umożliwiają tzw. analizę haplotypów alleli genu *PAH*. Osobnicy danej populacji są albo homozygotami albo heterozygotami pod względem długości fragmentów DNA (RFLP), co można uwidocznić metodą Southerna. Układ fragmentów DNA różnej długości uzyskanych po trawieniu genomowego DNA danego osobnika każdym z 8 enzymów restrykcyjnych, wyznacza tzw. haplotyp RFLP alleli *PAH*. Porównując haplotypy RFLP osób chorych na PKU, z haplotypami RFLP rodziców (z których każdy posiada prawidłowy i zmutowany allel), można określić u rodziców zmutowany i prawidłowy allel *PAH* związany z danym haplotypem. Haplotypy RFLP 74 prawidłowych

i zmutowanych alleli genu *PAH* określono dla 37 duńskich rodzin. Opisano 12 haplotypów RFLP związanych z prawidłowymi i zmutowanymi allelami *PAH*. Spośród 74 zmutowanych alleli, 67 (91%) było zasocjowanych z haplotypami 1, 2, 3 i 4, przy czym haplotypy 2 i 3 zawierały 53% zmutowanych alleli, natomiast rzadko występowały wśród prawidłowych alleli. Z kolei haplotypy 1 i 4 przeważały w populacji prawidłowych genów i było z nimi związane tylko 38% zmutowanych alleli [45,47]. Stwierdzono ponadto, że w locus *PAH* występują RFLP: BglIII-PvuIIa-PvuIIb w części 5' genu, natomiast w części 3' genu występuje RFLP EcoRI-MspI-XmnI-EcoRV-HindIII [21].

Polimorfizm fragmentów restrykcyjnych DNA genu hydroksylazy fenyloalaniny można sklasyfikować w grupy obejmujące substytucje lub insercje i delecje. W pierwszej grupie w wyniku pojedynczej substytucji zasady — występuje lub zanika miejsce rozpoznania dla restryktaz: BglIII, PvuII, XmnI, EcoRI, EcoRV i MspI. Natomiast drugi typ RFLP wykrywany jako różnica długości fragmentu przy trawieniu restryktazą HindIII reprezentowany jest w postaci 3 alleli (4,4, 4,2, 4,0 kZ) różniąc się o fragment 200 pz ulegający delecji lub insercji [21].

VI. Mutacje w genie hydroksylazy fenyloalaninowej

Obraz kliniczny fenyloketonurii jest zróżnicowany, co wynika z różnorodności mutacji mających niejednakowy wpływ na aktywność hydroksylazy fenyloalaninowej [48]. Dzięki ustaleniu struktury prawidłowego genu *PAH* mutacje wywołujące PKU mogą być zidentyfikowane. Ze względu na to, że aż 38% zmutowanych alleli w PKU odpowiada haplotypowi 3, poszukiwania mutacji w genie *PAH* rozpoczęto od przygotowania biblioteki genomowej w kosmidach DNA z leukocytów chorego homozygoty o haploty-

Leksykon nowych terminów biochemicznych

opracowała Janina Kwiatkowska-Korczak

W piśmiennictwie pojawia się stale wiele nowych nazw i pojęć. Skłoniło to Komisję Słownictwa Biochemicznego do zamieszczania w „Postępach Biochemii” leksykonu tych nazw, zawierającego, obok definicji także odnośnik piśmiennictwa. Taki leksykon ukazuje się systematycznie w „Biochemical Education” i jest bardzo pomocny w opracowaniu polskiego słownika. Definicje haseł noszą niejednokrotnie charakter roboczy, wydaje się jednak pożyteczne podanie ich w takiej formie z możliwością powtórnego ogłoszenia hasła po uzyskaniu pełniejszej informacji. Zachęcamy czytelników do uzupełniania naszego leksykonu hasłami z własnej dziedziny badań.

A

abzym (*abzyme*), katalityczne przeciwciało. Monoklonalne przeciwciało skierowane przeciw analogowi stanu przejściowego substratu (Tramontano A. et al., *Science* 1986, 234, 1568 – 1570).

adypsyna (*adipsin*), białko występujące w dużych ilościach w adipocytach i w nerwie kulszowym. Wykazuje homologię strukturalną z rodziną proteaz serynowych (włącznie z pozycjami reszt His, Asp i Ser). Adipocyty wydzielają ją do krwi. Powstają dwie formy: 44 kDa i 37 kDa, które następnie ulegają przekształceniu, po enzymatycznej deglikozylacji, do formy 25,5 kDa (Cook K.S. et al., *Science* 1987, 237, 402 – 405 i Flier J.S. et al., *ibid* 405 – 408).

AGE, akronim „końcowych produktów późnej glikozylacji” (*advanced glycosylation end-products*). Grupa barwników wyróżniających się żółto-brązową fluorycencją, które usieciwiają białka w ostatnich stadiach ich nieenzymatycznej glikozylacji (Cerami A., *Trends. Biochem. Sci.* 1986, 11, 311 – 314).

akarboza (*acarbose*), inhibitor α -1-4-glukozydazy. Wprowadzony dootrzewnowo zaburza metabolizm lizosomów wątroby, powodując znaczne i trwałe hamowanie enzymu i ostre zaburzenia lizosomalnego metabolizmu glikogenu (Taylor J.A., *Biochem. J.*, 1985, 228, 319 – 324).

akrozyna (*acrosin*), proteinaza nasienia, uczestnicząca w procesie zapłodnienia u ssaków. Powstaje w postaci proakrozyny, a jej przekształcenie w akrozynę wiąże się z nabieraniem przez spermę zdolności penetrowania przez zewnętrzną osłonkę komórki jajowej (Parrish R.F., Polaski K.L., *Int. J. Biochem.*, 1979, 10, 391 – 395).

aksokinina (*axokinin*), ciepłotrwała fosfoproteina o $M = 56$ kDa, występuje w rzęskach bezkręgowców

i kręgowców. Jej fosforylacja, zależna od cAMP, jest niezbędna dla zainicjowania ruchliwości rząsek (Tash J.S. et al., *Cell* 1984, 301, 551 – 559).

aktynożelina (*actinogelin*), białko indukujące żelowanie aktyny F przy niskich stężeniach jonów wapnia. Składa się z dwu identycznych podjednostek $M_r = 112\,000 - 115\,000$ każda (Mimura N., Asano A.J., *J. Cell Biol.*, 1982, 93, 899 – 909).

aktywina (*activin*) (synonimy: białko uwalniające FSH, FRP), przysadkowo-tropowe białko, występujące w gonadach ssaków w dwu formach, jako homodimery łańcuchów inhibiny B_A lub B_B , połączonych wiązaniami dwusiarczkowymi. Silny, wybiórczy stymulator sekrecji FSH w przednim płacie przysadki, działa bez pośrednictwa receptorów GnRH. Moduluje proliferację komórek erytroidalnych w hodowlach ludzkiego szpiku kostnego oraz indukcję nagromadzenia w nich hemoglobiny. (Yu J. et al., *Nature (Lond.)* 1987, 330, 765 – 767).

alozymy (*allozymes*), alleliczne warianty enzymów (Zamer W.E., Hoffman R.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 2737 – 2741).

amelogenina (*amelogenin*), główne białko szkliwa zębów we wczesnych okresach rozwoju. Opisano sekwencję 170 reszt aminokwasowych tego białka (Takaji T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 121, 592 – 597).

amfiregulina (*amphiregulin*), AR, glikoproteina, hamująca wzrost komórek nowotworowych niektórych linii, i stymulująca proliferację ludzkich fibroblastów oraz innych prawidłowych i nowotworowych komórek. Ustalono sekwencję aminokwasów formy AR zawierającej 78 reszt, a także formy posiadającej 6 dodatkowych reszt na N-końcu. C-terminalna część cząsteczki wykazuje wyraźną homologię z rodziną nabłonkowych czynników wzrostowych (EGF). AR są

wiązane przez receptory EGF i w pełni zaspakajają zapotrzebowanie na EGF w niektórych układach komórkowych. (Shoyab M. et al., *Science* 1989, 243, 1074 – 1076).

amidorfina (*amidorphin*), peptyd opiatowy, odpowiadający resztom 104 – 129 proenkefaliny A wołu, posiada grupę amidową na C-końcu. (Seizinger B.R., *Nature* (Lond.) 1985, 313, 57 – 59).

aminomalonowy kwas (*aminomalonic acid*) (synonim: Ama; 2-karboksy-glicyna), stosunkowo nietrwały aminokwas, występujący w małych ilościach u bakterii i w płytkach aterosklerotycznych. Pokrewny kwasom: 2-karboksyasparaginowemu i 4-karboksyglutaminowemu, które również wykryto w płytkach aterosklerotycznych (van Buskirk J.J. et al., *Proc. Soc. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 722 – 725).

amunina (*amunin*) (synonim: czynnik uwalniający kortykotropinę), amid polipeptydu zbudowanego z 44 reszt aminokwasowych. Wydzielona z podwzgórza (Vale W., *Science* 1981, 213, 1394 – 1397).

amylina (*amylin*), peptyd złożony z 32 reszt aminokwasowych, główny składnik amyloidu wysepek trzustki. Wykazuje strukturalne podobieństwo do ludzkiego peptydu-2. Oba peptydy są silnymi inhibitorami syntezy glikogenu w mięśniach *in vitro*, zarówno podstawowej jak i stymulowanej przez insulinę (Leighton B., Cooper G.J.S., *Nature* (Lond.) 1988, 335, 632 – 635).

aneksyna (*annexin*), nazwa nadana przez Geisgowa (*FEBS Lett.* 1986, 203, 99–103) rodzinie białek wiążących Ca^{2+} i fosfolipidy, M_r 35 000. Zalicza się do niej następujące białka o znanej homologii sekwencyjnej: endotoksynę I, kalpaktynę I, kalelektrynę I i białko II (Schlaepfer D.D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6078 – 6082).

anchoryna cII (*anchorin cII*), hydrofobowa glikoproteina, M_r 31 000 wydzielona z błon chondriocytów kurczęcia. Wiąże kolagen typu II (Mollenhauer J. et al., *J. Cell. Biol.* 1984, 98, 1572 – 1578).

antyhormon (*antihormone*), izoforma hormonu, wiąże się z odpowiednim receptorem, ale nie wykazuje aktywności biologicznej. Pierwszym zidentyfikowanym antyhormonem, występującym w organizmie jest antagonistą FSH (Dahl K. et al., *Science* 1987, 239, 72 – 74).

anty-mRNA, (*anti-mRNA*)jednoniciowy RNA, komplementarny do mRNA (Pestka S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984, 81, 7525 – 7528).

antystatyna (*antistatin*), białko o M_r 17 000, występuje

w gruczołach ślinowych pijawki meksykańskiej (*Haementaria officinalis*). Wykazuje aktywność przeciwkrzepleniową i antymetastatyczną (Tyszyński G.P et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 9718 – 9723).

apamina (*apamin*), oktadekapeptyd, neurotoksyna jadu pszczoł (Wemmer D., Kallenbach N.R., *Biochemistry* 1983, 22, 1901 – 1906).

β -ARK, akronim kinazy receptora β -adrenergicznego (β — *adrenergic receptor kinase*). Kinaza niezależna od cAMP, swoście fosforyluje receptor β -adrenergiczny w jego postaci związanej z agonistą (Benovic J.L. et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 9026 – 9032).

atrioaktywaza (*atrioactivase*), swoista proteaza serynowa, występująca w przedsionku serca wołu, katalizuje aktywację prekursora przedsionkowego czynnika natriuretycznego drogą selektywnej hydrolizy wiązania peptydowego przy Arg⁸⁹ (Imeda T. et al., *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 9515 – 9519).

atriopeptygen, prekursor atriopeptyny. Występuje w miocytach przedsionka serca (Saper C.B. et al., *Science* 1985, 227, 1047 – 1048).

atriopeptyny (*atriopeptins*), biologicznie czynne peptydy, wydzielone z przedsionka serca ssaków. Atriopeptyna I składa się z 21 reszt aminokwasowych, atriopeptyna II - z 23, tzn. ma sekwencję identyczną z atriopeptyną I z dodatkowym dipeptydem Phe - Arg na C-końcu (Currie M.G. et al, *Science* 1984, 223, 67 – 69).

B

batroksobina (*batroxobin*), trombino-podobna proteaza serynowa wydzielona z jadu *Bothrops atrox*, lub ich podgatunków. W odróżnieniu od trombiny, która przekształca fibrynogen w fibrynę drogą odszczepienia peptydów A i B, batroksobina odszczepia jedynie peptyd A. Podobnie jak trombina wykazuje aktywność esterazową i amidazową, a także hydrolizuje substraty peptydowe (Stürzbecher J., *Toxicon* 1986, 24, 585 – 595).

białka inaktywujące rybosomy (*ribosome-inactivating proteins*) (synonim: RIP). Białka typu I składają się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Zalicza się tu agrostynę, diantrynę, dodekandrynę, geloninę, lufinę, momordynę i trytynę (*agrostin, dianthrin, dodecandrin, gelonin, luffin, momordin, tritin*). Białka typu II składają się z łańcucha o właściwościach RIP, kowalencyjnie związanego z łańcuchem wiążącym o właściwościach lektyny. Do tej klasy zaliczamy: abrynę, modekcyne, rycynę, wiskuminę i wolkenzynę (*abrin,*

modeccin, ricin, viscumin, volkensin) (Stripe F., Barbieri L., *FEBS Lett* 1986, 195, 1 – 8).

białko „Alz 50” („Alz 50” protein), białko o M_r 68 000, występuje swoiście w mózgu pacjentów z chorobą Alzheimera, w neuronach zawierających płytki neurytowe i struktury włókniste, charakterystyczne dla tej choroby. Występuje w podwzgórzu, korze skroniowej i *cleus basalis* – regionach, atakowanych przez chorobę (Barnes D.M., *Science* 1985, 230, 1260).

białko glejowe macierzy (matrix glia protein), białko macierzy organicznej kości, o M_r 15 000, zawiera 5-6 reszt kwasu γ -karboksylglutaminowego (Price P.A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 117, 765 – 771).

białko kamieni trzustkowych (pancreatic stone protein), główne rozpuszczalne białko kamieni trzustkowych. Fosfoproteina wiążąca wapń, występuje w ziarnistościach zymogennych komórek trzustki. Wydziela się z sokiem trzustkowym zarówno osób zdrowych jak i tych, u których tworzą się kamienie trzustkowe. Hamuje wytrącanie węglanu wapnia w soku trzustkowym. M_r 13 000 (Multinger L. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 110, 69 – 74).

białko pasma ciążowego (pregnancy zone protein) (synonimy: α_2 -glikoproteina ciążowa, α_2 -pregnoglobulina, PZP), jedno z głównych białek osocza pojawiających się podczas ciąży. Może osiągać poziom 1,0 – 1,4 g/l tuż przed porodem. Wykazuje wysoką homologię sekwencyjną z ludzką α_2 -makroglobuliną (Sottrup-Jensen L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 7353 – 7357).

białko STOP (STOP protein) (synonim: stable tubule only polypeptide, trwały peptyd, właściwy jedynie dla tubul), białko o M_r 145 000, blokuje dysocjację końcowych podjednostek mikrotubul (polimerów tubuliny). Wiąże się nieodwracalnie z mikrotubulami, ale zachodzi jego translokacja i przesuwanie wzdłuż mikrotubul (Pabion M. et al., *Biochemistry* 1984, 23, 6642 – 6648).

białko Z (protein Z), białko zależne od witaminy K., występuje w osoczu człowieka i wołu. M_r 62 000. Białka Z obu gatunków są podobne do siebie pod względem wielkości, składu aminokwasowego, charakterystyki chromatograficznej i N-końcowej sekwencji. Funkcja niejasna (Broze Jr. G.J., Milevich J.P., *J. Clin. Invest.* 1984, 73, 933 – 938).

bindyna (bindin), białko otrzymane z nasienia jeżowca, M_r 35 000, składa się z 258 reszt aminokwasowych. Pośredniczy w swoistym rozpoznawaniu i adhezji nasienia do powierzchni jaja (Bellet N.F et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1977, 79, 159 – 165).

bombolityna (bombolitin), jeden z pięciu heptapeptydów, spokrewnionych strukturalnie ze sobą, bogatych w hydrofobowe reszty aminokwasowe, występujących w jadzie trzmieła *Megabombus pensylvanicus*. Wszystkie one lizują erythrocyty i liposomy, uwalniające histaminę z komórek tucznych i stymulują fosfolipazę A_2 . Właściwości bombolityny są zbliżone do właściwości melityny (Argiolas A., Pisano J.J., *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 1437 – 1444).

bombyksyny (bombyxins), rodzina peptydów o M_r = 5 kDa, wydzielonych z mózgu jedwabnika. Składają się z łańcuchów A i B, połączonych wiązaniem dwusiarczkowym, wykazują homologię z insulinami kręgowców (Kawakami A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6843 – 6847).

bouwardyna (bouvardin), cykliczny heksapeptyd wydzielony z rośliny *Bouvardia ternifolia*, używanej w Meksyku jako lek przeciw dyzenterii i innym chorobom. Wykazuje aktywność przeciwnowotworową w kilku układach, hamuje syntezę białka w nienaruszonych komórkach eukariotycznych i układach bezkomórkowych (Zalacain M. et al., *FEBS Lett.*, 1982, 148, 95 – 97).

brewetoksyna (brevetoxin), związek wydzielony z mikroorganizmów „czerwonego przyplwywu” (*Ptychodiscus brevis*) na Florydzie. Wywołuje masową śmierć ryb i neurotoksyczne zatrucia u ludzi występujące po zjedzeniu skorupiaków (Baden D.G et al., *Toxicon*, 1984, 22, 75 – 81).

brewina (brewin), białko surowicy o M_r 90 000. Wykazuje aktywność depolimeryzowania aktyny, choć jej głównym zadaniem jest skracanie filamentów aktyny (Lees A. et al., *Biochemistry* 1984, 23, 3038 – 3047).

briostatyna (briostatine), aktywator kinazy białkowej zależnej od wapnia i fosfolipidów. Blokuje różnicowanie promielocytów białaczkowych HL - 60 indukowane przez estry forbolowe (Kraft A.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 1334 – 1338).

bursyna (bursin), tripeptyd, lizylo-histydylo-glicyloamid. Hormon, różnicuje wybiórcze komórki β , występuje w torbie *Fabriciusa* u kurcząt. (Audhya T. et al., *Science* 1986, 231, 997 – 999).

butyrofilina (butyrophilin), kwaśna glikoproteina o M_r 67 000, wydzielona z wewnętrznej otoczki krolek tłuszczu mleka, zawierającej białka (Fraudenstein C. et al., *Exp. Cell. Res.*, 1979, 118, 277 – 294).

bZIP, grupa białek, zawierających sekwencje bogate w zasadowe reszty aminokwasowe, przylegające do sekwencji charakterystycznych dla „leucynowych su-

waków” (*leucine zipper*) (Vinson C.R. et al., *Science* 1989, 246, 911 – 916).

C

CAD, akronim na oznaczenie wielofunkcyjnego białka tkanek ssaków, które wykazuje aktywność syntazy karbamoilofosforanowej zależnej od glutaminy, transkarbamoilazy asparaginianowej i dihydroorotazy (Crayson D.R., Evans D.R., *J. Biol. Chem.*, 1983, 258, 4123 – 4129).

cerebelina (*cerebellin*), heksadekapeptyd o znanej sekwencji, swoisty dla mózdku. Zlokalizowano ją w perykarionie mózdkowych komórek *Purkiniego* i w dendrytach. U szczurów pojawia się w 5 dni po urodzeniu, osiąga maksymalny poziom w 25 dniu, a następnie obniża się do stałego poziomu. Głównym metabolitem cerebeliny jest des-ser¹-cerebelina (Slemmon J.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1985, 82, 7145 – 7148).

cerebrocystatyna (*cerebrocystatin*), polipeptyd o M_r 12 000, wydzielony z mózgu szczura. Hamuje oczyszczoną proteinazę cysteinową mózgu (katepsyna B, EC 3.4.22.1) i papainę (EC 3.4.22.2) Podobne inhibitory peptydowe wydzielono z wątroby szczura, leukocytów świni i śledziony wołu (Kopitar A. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 112, 1000 – 1006).

cerulenina (*cerulenin*), antybiotyk przeciwrzybiczy, silny inhibitor syntetazy kwasów tłuszczowych, pochodzącej z mikroorganizmów i tkanek zwierzęcych (Tomoda H. et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, 1984, 95, 1705 – 1712).

chinoproteiny (*quinoproteins*), dehydrogenazy występujące w niektórych bakteriach. Ich koenzymem jest pirolochinolinochinon (PQQ) (Dekker R.H., et al., *Eur. J. Biochem.*, 1982, 125, 69 – 73).

cholekalcyyna (*cholecalciferol*) (synonim: białko wiążące wapń), grupa wewnątrzkomórkowych białek o silnym powinowactwie do wapnia. Ich stężenie zależy od kalcytriolu (1,25-dihydroksycholekalcyferolu) (Perret C. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1985, 148, 61 – 66).

chondrokalcyyna (*chondrocalciferol*), białko wydzielone z chrząstek przelyku płodów bydłych, wiąże się silnie z hydroksyapatytem. Jest to białko pozakomórkowe, nie spokrewnione z żadnym znanym białkiem kości i chrząstek (Poole A.R. et al., *J. Cell Biol.*, 1984, 98, 54 – 65).

chromogranina A, (*chromogranin*), CgA, białko, występujące w większości tkanek produkujących hormony, łącznie z trzustką, przysadką, przytarczycami,

komórkami C tarczycy i endokrynnymi komórkami jelit i płuc. Zlokalizowana i wydzielana razem z hormonami, występuje w zwiększonej ilości w surowicy krwi osobników z nowotworami endokrynnymi (np. rakiem rdzenia tarczycy, małokomórkowym rakiem płuc, itp.) (Murray S.S. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 141 – 146).

chymodenina (*chymodenin*), peptydopodobny hormon dwunastnicy, gwałtownie zmienia wzajemne proporcje enzymów wydzielanych przez trzustkę. Pod jej wpływem powstaje mieszanina stosunkowo bogata w chymotrypsynogen (Adelso J. et al., *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 10569 – 10575).

cyjanoginozyna (*cyanoginosin*) toksyczny czynnik, odpowiedzialny za liczne przypadki zatrucia wśród zwierząt w Afryce, pijących wodę obfitującą w cyjanobakterie. Jest to cykliczny heksapeptyd o M_r 900–1100. LD₅₀ w zakresie 0,05 – 020 µg/g wagi ciała myszy. Poznano 7 odmian tego peptydu (Kfir R. et al., *Toxicon*, 1986, 24, 543 – 552).

cyklina (*cyclin*), kwaśne białko jądra komórkowego o M_r 36 000. Identyfikuje się ją na podstawie określonej pozycji, jaką zajmuje w dwukierunkowym rozdziale białek komórkowych. Wrażliwa na transformację, syntetyzowana głównie w fazie S cyklu komórkowego. Identyczna z „jądrowym antygenem proliferujących komórek” (*proliferating cell nuclear antigen*) (Mathews M.B. et al., *Nature* 1984, 309, 374 – 376).

cyklofilina (*cyclophilin*), swoiste białko cytozolowe o M_r 15 000, odpowiedzialne za wiązanie cyklosporyny A - immunosupresyjnego undekapeptydu grzybów. Występuje w komórkach mysiej, wołowej i ludzkiej grasicy, w dojrzałych limfocytach T, mózgu i nerkach (Handschumacher R.E. et al., *Science* 1984, 226, 544 – 547).

cyno-protoporfiryna (*tin-protoporphyrin*), syntetyczna metaloporfiryna, analog hemu, w którym atom żelaza zastąpiono przez cynę. Nie wiąże tlenu cząsteczkowego, nie jest rozkładana przez oksygenazę hemową. Jest kompetycyjnym inhibitorem tego enzymu (Drummond G.S., Kappas A., *Science* 1982, 217, 1250 – 1252).

cystatyna (*cystatin*), białko odporne na zasady, o M_r 12 000, inhibitor proteinaz cysteinowych, wydzielony z białka jaja. Występuje w dwu formach o różnych punktach izoelektrycznych. Żadna z nich nie zawiera grup SH (Anastazi A. et al., *Biochem. J.*, 1983, 211, 129 – 138).

cytosynalina (*cytosynalin*), białko oczyszczone z błon synaptycznych wołu, wiąże kalmodulinę i oddziałuje z szeregiem elementów cytoszkieletu M_r 35 000

(Sobue K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, 82, 8075 – 8079).

cząstka rozpoznająca sygnał, cząstka rozpoznawania sygnału (*signal recognition particle*), kompleks 6 polipeptydów i cząsteczki 7S RNA, działa jako przejściowa trzecia podjednostka rybosomu, łączy proces translacji z wydzielaniem sekrecyjnego białka poza komórkę (Levin R., *Science* 1982, 218, 777 – 778).

D

defensyny (*defensins*), kationowe polipeptydy o niskiej masie cząsteczkowej, wydzielone z obojętochłonnych leukocytów i makrofagów płuc, strukturalnie spokrewnione z kortykostatynami. Wszystkie defensyny i kortykostatyny zawierają 31 – 33 reszt aminokwasowych, w tym sekwencję 11–12 reszt, w której Cys i Arg występują w sposób wysoce konserwatywny (Quelette A.J. et al., *J. Cell Biol.*, 1989, 108, 1687 – 1695).

depaktyna (*depactin*), białko o M_r 17 000, wydzielone z komórek jajowych rozgwiazdy. Depolimeryzuje aktynę F i hamuje polimeryzację aktyny G. (Mabuchi I., *J. Biochem. (Tokyo)* 1981, 89, 1341 – 1344).

1-deoksynojirymycyna (*1-deoxynojirimycin*), antybiotyk wytwarzany przez określony gatunek *Bacillus*. Zredukowana forma nojirymycyny, antybiotyku produkowanego przez kilka szczepów *Streptomyces*. Analogi glukozy, zawierają grupy NH zamiast tlenu w pierścieniu piranozowym. *In vitro* i *in vivo* hamują jelitowe α - glukozydazy i trzustkową α - amylazę, a także syntezę złożonych oligosacharydów o wiązaniu N-glikozydowym, w hodowli komórkowej (Saunier B., et al., *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 14155 – 14161).

desmina (*desmin*) (synonim: szkieletyna (*sceletin*)), białko występujące w tarczках z mięśnia szkieletowego i sercowego. M_r 50 000 – 55 000. Występuje także w filamentach mięśni gładkich i komórek niemięśniowych (Lazarides A., *Ann. Rev. Biochem.* 1982, 51, 219 – 250).

diwidyna (*dividin*), ludzka zasadowa fosfoproteina jądra komórkowego o M_r 54 000, swoista dla cyklu komórkowego, związana z procesem proliferacji (Celis J.E., Nielsen J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 8187 – 8190).

dystrofina (*dystrophin*), białko o M_r 40 000, występuje w mięśni szkieletowym przy potrójnym złączu. Jak się wydaje, brak go w dystrofii mięśniowej typu Duchenne (Hoffman E.P. et al., *Nature* 1987, 330, 754 – 758).

E

EDF, synonim: erytroidalny czynnik różnicujący

(*erythroid differentiating factor*), białko wydzielone z ludzkich komórek białaczkowych linii THP-1. Indukuje różnicowanie białaczkowych komórek Frienda. Białko to znaleziono w 4-dniowej kulturze komórek THP-1 hodowanych w obecności 4 – β -forbulo-12-mirystyniano-12-octanu. Jest ono dimerem, M_r 25 000, N-terminalna sekwencja jest identyczna z sekwencją łańcucha β inhibiny A świni (Eto Y., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 142, 1095 – 1103).

egazyina (*egasin*) glikoproteina o M_r 64 000, wykazuje aktywność esterazową. Determinuje wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie β -glukuronidazy o różnych narządach myszy (Medda S., Swank T.R., *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 15802 – 15808).

egzoenzym (*exoenzyme*), enzym wydzielany przez komórkę, np. enzymy trawienne żołądka i trzustki (Stanley K.K. et al., *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 145 – 147).

ejkozanoidy (*ejcosanoids*), pochodne kwasu arachidonowego. Ogólna nazwa związków C_{20} : prostaglandyn, tromboksanów, prostacyklin, leukotrienów (Wissman G., *New Eng. J. Med.*, 1983, 308, 454 – 455).

ektoenzym (*ectoenzyme*), enzym stanowiący integralne białko błony cytoplazmatycznej, o centrum aktywnym zwróconym na zewnątrz komórki. Może działać w pozakomórkowym metabolizmie swego substratu, albo jego receptor i stanowić integralną część procesu transportu substratu do komórki (Stanley K.K. et al., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 145 – 147).

ekworyna (*aequorin*), fosfoproteina z meduzy *Aequorea*, emituje światło po dodaniu śladowych ilości Ca^{2+} , zarówno w obecności jak i nieobecności tlenu. Dzięki wysokiej czułości białko to ma duże zastosowanie jako wskaźnik jonów wapnia w układach biologicznych (Shimomura O., *Biochem. J.* 1986, 234, 271 – 277).

elastonektyna (*elastonectin*), białko o M_r 120 kDa, występuje w fibroblastach skóry, przypuszczalnie odpowiada za indukowaną adhezję komórek mezenchymalnych do elastycznych włókien (Hornbeck W., Tixier J.M., Robert L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83, 5517 – 5520).

embrionina (*embryonin*), glikoproteina o M_r 270 000, po redukcji tworzy 3 polipeptydy: M_r 185 000, 12 000 i 68 000. Wydzielana z niektórych preparatów fetuiny otrzymanych z surowicy krwi płodów cielęcych. Wykazuje aktywność czynnika wzrostu. Identyczna z bydłą α -makroglobuliną (Feldman S. et al., *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 4458 – 4462).

endopeptydaza tworząca γ -endorfinę (*γ -endorfin-generating endopeptidase*), enzym rozszczepiający wiązanie

...Leu¹⁷ -Phe¹⁸ ... w β -endorfinie z utworzeniem γ -endorfiny i β -endorfiny (18–31) (Labouille J.L.M. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 133, 897–903).

endotelina (*endothelin*), peptyd zwężający naczynia, wydzielony ze śródbłonka. Składa się z 21 reszt aminokwasowych, zawiera dwa wiązania dwusiarczkowe, z których jedno tworzone jest przez N-końcową cysteinę. Wydzielona z supernatantu hodowli komórek śródbłonka aorty świni. Powstaje z proendoteliny, zbudowanej z 203 reszt aminokwasowych (Yanasigawa M. et al., *Nature* 1988, 332, 411–415).

entaktyna (*entactin*), glikoproteina zawierająca reszty siarczanowe o M_r 185 000, wydzielona z pozakomórkowej macierzy błon podstawnych, oporna na chondroitynazę ABC. Ponad 1/3 budujących ją aminokwasów stanowi glicyna, asparaginian i glutaminian (Carlin B. et al., *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 5209–5214).

enterochelina (*enterochelin*), siderofor, związek chelatujący żelazo, syntetyzowany w wielu organizmach, m.in. *E. coli*. Jest to cykliczny trimer 2,3-dihydroksy-N-benzoilo-L-seryny, jego syntezę reguluje wenątrzkomórkowa podaż żelaza (Lundigran M.B., Kadner R.J., *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 10797–10801).

enzym odgałęziający „lariat” mRNA (pętlę lassa mRNA) (*lariat debranching enzyme*), enzym rozszczepiający wiązanie 2'-5'-fosfodiesterowe, utworzone podczas składania (*splicing*) mRNA pomiędzy 5'-terminalną resztą guanylową intronu a resztą adenylową leżącą blisko miejsca przecięcia (Kramer A., Keller W., *EMBO J* 1985, 4, 3571–3581).

enzymy zawiasowo zgięte (*hinge-bending enzyme*), enzymy złożone z co najmniej dwu globularnych domen, których wzajemną orientację modyfikuje obecność liganda, np. heksokinaza, kinaza fosfoglicerynianowa i inne enzymy wiążące nukleotydy (Betton J.M. et al., *Biochemistry* 1984, 23, 6654–6661).

F

fascyna (*fascin*), białko o $M = 58$ kDa, wydzielone z jaj jeżowca morskiego, tworzy usieciowanie z aktyną (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 88–92).

fermodulina (*fermodulin*), białko wiążące żelazo, występuje w mikrosomach wątroby szczura i frakcjach cytozolowych serca, wątroby i mózgu. Hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA. M_r 58 000 (Menon A.S. et al., *Indian J. Biochem. Biophys.* 1984, 21, 27–38).

feralteryna (*ferralterin*), rozpuszczalne białko chloroplastów, zawiera nie-hemowe centra żelazo-siarkowe, M_r 30 000. Składa się z trzech podjednostek, dwu o $M_r = 7 000$ i jednej — 12 000. Pośredniczy w świetlnej aktywacji fruktozo-1,6-bisfosfatazy w chloroplastach (de la Toore et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 1982, 213, 545–550).

fibronektyna (*fibronectin*), glikoproteina występująca w dwu formach: pozakomórkowej i komórkowej błonowej, łączy się z fibrynogenem, kolagenem, aktyną, glikozaminoglikanami i powierzchnią komórek. Występuje w krwi i innych płynach ustrojowych oraz na powierzchni komórek w tkance łącznej. Uważa się, że uczestniczy w zakotwiczeniu komórek w macierzy pozakomórkowej. Jest dimerem prawdopodobnie identycznych polipeptydów, połączonych wiązaniem dwusiarczkowym (Ruoslahti E. et al., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 188–190).

fibrosom (*fibrosome*), sztuczny pęcherzyk „liposomopodobny”, tworzony drogą nakładania cząsteczek oczyszczonej ludzkiej fibronektyny na substrat, oplańczony agarem; sztuczny kompleks makromolekularny (Kuehn G.D., *Trends Biochem. Sci.*, 1985, 10, 227–230).

filagryna (*filaggrin*), strukturalne białko zasadowe, wydzielone ze zrogowaciałej warstwy nabłonka, wiąże się swoiście z pośrednimi włókienkami. M_r filagryny myszy $\sim 30 000$, szczura - $\sim 48 000$ (Steinert P.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, 78, 4097–4101).

filamina (*filamin*), białko o $M = 25$ kDa, występuje w komórkach mięśni gładkich, a także tarczach Z w mięśniach szkieletowych i komórkach niemięśniowych (Gomer R.H., Lazarides E., *Cell*, 1981, 23, 524–532).

fimbryna (*fimbrin*), białko o $M = 68$ kDa, wydzielone z nabłonka jelit, tworzy usieciowanie z aktyną (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 88–92).

fitochelatyny (*phytochelatins*), rodzina małych peptydów, bogatych w cysteinę, wiążą koordynacyjnie, przez grupę tiolową, metale ciężkie (Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}). Występują w roślinach. Ich wzór ogólny to $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2$ do 11) (Grill E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 439–443).

folistatyna (*follistatin*), białko hamujące wydzielanie FSH, $M_r \sim 35 000$. Wydzielono go z płynu pęcherzykowego jajników świni. Nie wykazuje homologii sekwencyjnej z inhibinami (Veno N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 439–443).

fosfolamban (*phospholamban*), białko siateczki śród-

błonkowej serca, M_r 20 000 – 24 000. Ufosforylowany, zwiększa powinowactwo ATPazy zależnej od wapnia do Ca^{2+} (Lidemann J.P. et al., *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 464 – 471).

fosforamindon (*phosphoramindon*), N- α -L-ramnopiranozylo-oksyfosfo(L-leucyto-L-tryptofan). Swoisty inhibitor termolizyny (Kitagisaki K., Hiromi K., *J. Biochem. (Tokyo)* 1984, 95, 529 – 534).

fosforyny (*phosphorins*), grupa białek nie-kolagenowych, bogatych w fosforan, wydzielonych z siekaczy. Uczestniczą w mineralizacji kości. Z siekaczy szczurów wydzielono dwa główne składniki o M_r 71 000 i 65 000. Zawierają one ponad 70% reszt serynowych i asparaginianowych (Dimuzio M.T., Veis A., *Calcif. Tiss. Res.*, 1980, 25, 169 – 178).

fragmina (*fragmin*), białko wrażliwe na Ca^{2+} , $M_r \sim 43 000$, wydzielone z *Physarium polycephalum*. Reguluje długość filamentów aktyny tworzonych *in vitro* (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.*, 1982, 7, 88 – 92).

frederykamycyna A (*frederikamycin A*), nowa klasa antybiotyków, produkowanych przez szczep *Streptomyces griseus*. Wykazuje aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich oraz grzybów. Działa cytotoksycznie na przeszczepialne nowotwory myszy *in vitro* i *in vivo*. Zawiera spiranowy układ pierścieniowy (Byrne K.M. et al., *Biochemistry* 1985, 24, 47[8 – 486]).

G

Gaba-modulina (*Gaba-modulin*) (synonim: modulina kwasu γ -aminomasłowego). Neuroproteina mózgu, przypuszczalnie moduluje swoiste miejsce rozpoznania Gaba o wysokim powinowactwie. Składa się z około 126 reszt aminokwasowych, ma zablokowany N-koniec i resztę histydyny na C-końcu. M_r 16 500 (Guidotti A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, 79, 6084 – 6088).

galanina (*galanin*), peptyd złożony z 29 reszt aminokwasowych, wydzielony po raz pierwszy z jelit wieprzowych, ale występujący także w centralnym układzie nerwowym ssaków (w największym stężeniu w podwzgórzu). Po wprowadzeniu zdrowym osobnikom wywołuje gwałtowny wzrost poziomu hormonu wzrostu we krwi (Bauer F.E., *Lancet* 1986, 2, 192 – 194).

GAP, peptyd towarzyszący hormonowi uwalniającemu gonadotropinę (*GnRH*), składa się z 56 reszt aminokwasowych. Wchodzi w skład prekursora GnRH. Prekursor ten ma 92 reszty u człowieka i szczura, 90 – u myszy, zawiera sekwencję GnRH (10 reszt) i GAP. (Mason A.J. et al., *Science* 1986, 234, 1366 – 1371).

gelaktyna (*gelactin*), białko o M_r 23 000, wydzielone z *Acanthamoeba*, tworzy usieciowanie z aktyną (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 88 – 92).

gelonina (*gelonin*), zasadowa glikoproteina, M_r 30 000, inaktywująca rybosomy. Wydzielono ją z nasion roślin. Hamuje syntezę białka w układach bezkomórkowych (Falasca et al., *Biochem J.*, 1982, 207, 505 – 509).

gelsolina (*gelsolin*), białko o M_r 91 000, wydzielone z makrofagów, reguluje długość filamentów aktyny, tworzonych *in vitro* (Craig S.W., Pollard T.D., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 88 – 92).

gen sor (*sor gene*), krótki gen ramki odczytu, umiejscowiony w DNA między *pol*, i *env* (Lee T.H. et al., *Science* 1986, 231, 1546 – 1549).

genisteina (*genistein*), związek izoflawonowy, wydzielony z pożywki fermentacyjnej *Pseudomonas sp.* Swoicie hamuje terozynowe kinazy białkowe (Akiyama T. et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 5592 – 5596).

GIP, akronim żołądkowego polipeptydu hamującego (*Gastric Inhibitory Polypeptide*), insulinotropowego polipeptydu zależnego od glukozy (*Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide*), polipeptyd złożony z 42 reszt aminokwasowych, wydzielany przez specyficzne komórki endokryne śluzówki górnej części jelita cienkiego. Jego wydzielanie stymuluje wchłonięte z jelita węglowodany i tłuszcze. GIP hamuje wydzielanie kwasu w żołądku i wzmacnia wydzielanie insuliny podczas hiperglikemii (Sarson D.L., *J. Clin. Invest.* 1982, 12, 457 – 461).

glicynina (*glycinin*), główne białko zapasowe nasion soi. M_r 350 000, składa się z 6 podjednostek, a każda z nich – z kwaśnego i zasadowego polipeptydu, połączonych wiązaniem dwusiarczkowym (Kella N.D. et al., *Int. J. Pept. Protein Res.* 1986, 27, 421 – 432).

glikacja (*glycation*), nazwa zalecana na określenie każdej reakcji wiązania cukru z białkiem, niezależnie od tego czy jest ona katalizowana przez enzym, czy nie. Glikozylacja będzie więc jednym z rodzajów glikacji. Produktem glikacji jest glikowane białko, np. glikowana hemoglobina. (Nomenclature Announcement. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, 229, 339 – 401).

glikoforyna (*glycophorin*), glikoproteina błony erytrocytów ludzkich. Składa się z 130 reszt aminokwasowych, M_r 30 000. Wyróżniamy 3 domeny glikoforyny: aminoterminalna, bogata w gałązki oligosacharydowe wystaje po zewnętrznej stronie błony, zawiera antygeny grupowe A, B i O; C-terminalna jest po wewnętrznej stronie błony; środkowa składa się z 23

reszt aminokwasowych, jest zanurzona w warstwę lipidową (Capoldi R.A., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 292 – 295).

glikogenina (*glycogenin*) białko o M_r około 37 000, związane kowalencyjnie z glikogenem przez resztę tyrozynową. Prekursor glikogenu, primer konieczny dla inicjowania syntezy glikogenu (Whelan W.J., *Bio-Essays*, 1986, 5, 136 – 140).

glikokalicyna (*glycocalicin*), hydrofilny fragment o M_r około 130 000, bogaty w węglowodany, odszczepiany przez proteazy z zewnętrznej części łańcucha α glikoproteiny Ib, integralnego białka błony płytek krwi. Glikoproteina Ib jest płytkowym receptorem czynnika Willebranda (Steiberg M.H. et al., *New England J. Med.* 1987, 317, 1037 – 1042).

glikosomy (*glycosomes*), organelle podobne do mikrociałek, występujące u *Trypanosoma brucei*. Zawierają 9 enzymów glikolitycznych, kinazę adenylanową, karboksykinazę pirogronianową i dwa enzymy szlaku biosyntezy pirymidyn (Oppendoes F.R. et al., *J. Cell Biol.* 1984, 98, 1178 – 1184).

glipacja (*glypation*), dołączenie glikozylofosfatydyloinozytolu (PIG) do białek zakotwiczących się za jego pomocą w błonach komórkowych (Cross G.A.M. *Cell* 1987, 48, 179 – 181).

glukokortyna (*glucocortin*), białko indukowane przez glukokortykoidy w adipocytach, hepatocytach, fibroblastach i grasicy, M_r około 17 000. Jedyny wczesny produkt indukcji, wspólny wszystkim komórkom wrażliwym na glukokortykoidy (Colbert R.A., Young D.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83, 72 – 76).

goblina (*goblin*), białko występujące w błonach plazmatycznych erytrocytów ptaków, M_r około 26 000. Pod wpływem hormonów ulega fosforylacji. Goblinę uważa się za odpowiednik ankiry, białka łączącego spektrynę z błoną. Goblina i ankiry są homologiczne strukturalnie. Podobne białko, pokrewne serologicznie, występuje w skupiskach przyległych do linii Z w mięśni szkieletowym i sercowym (Nelson W.J., Lazarides E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 3292 – 3296).

gostatyna (*gostatin*), aminokwas wydzielony z przesączu hodowli *Streptomyces sumanensis* NK - 23, kwas 5-amino-2-karboksy-4-okso-1,4,5,6,-tetrahydropirydyno-3-octowy. Inhibitor mitochondrialnej transaminazy asparaginianowej (EC 2.6.1.11) (Nishino T. et al., *J. Biochem. (Tokyo)* 1984, 95, 1283 – 1288).

granzym A (*granzyme A*), esteraza serynowa, ulegająca ekspresji swoście w cytolitycznych limfocytach. Wykazuje swoistość podobną do trypsyny. Dimer łań-

cuchów polipeptydowych połączonych wiązaniem dwusiarczkowym (Masson D. et al., *FEBS Lett.* 1986, 208, 84 – 88).

H

hekson (*hexon*), główne białko otoczkowe ludzkiego adenowirusa. Trimer składający się z identycznych, ściśle ze sobą splecionych łańcuchów polipeptydowych o M_r 120 000 każdy. Utworzenie trimery wymaga obecności niewirionowego białka, tzw 100 K, kodowanego przez wirus i wiążącego się ściśle z powstającymi łańcuchami heksonu syntezowanymi na rybosomach (Cepko C.L., Sharp P.A., *Cell* 1982, 31, 407 – 415).

hepanoidy (*hepanoids*), pentacykliczne, sterolo-podobne cząsteczki występujące w bakteriach i niektórych roślinach. Ich macierzystym związkem jest hepan (C_{30}), syntezowany z kwasu mewalonowego (Prince R.C., *Trends Biochem. Sci.* 1987, 12, 455 – 456).

hepatopoetyna (*hepatopoinetin*), wątrobowy czynnik proliferacji komórek Termostabilna glikoproteina o M_r około 38 000, po dootrzewnowej iniekcji stymuluje syntezę DNA i mitozę prawidłowych komórek wątroby szczura (Goldberg M.J., *Cell Biochem.* 1985, 27, 291 – 302).

heptokoryna (*heptocorrin*), glikoproteina wiążąca kobalaminę. *In vitro* ulega degradacji pod wpływem proteinaz i płynu jelitowego wołu, podczas gdy czynnik wewnątrzpochodny jest odporny na trawienie (Guéant L.J. et al., *The Lancet* 1986, 2, 709 – 712).

hormonotoksyny (*hormonotoxins*), konjugat hormonów peptydowych z toksynami peptydowymi, np. owczy hormon luteinizujący-gelonina (Ding V. et al., *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 3089 – 3095).

hpGRF, akronim Ludzkiego Trzustkowego Czynnika Uwalniającego Hormon Wzrostu (*Human Pancreatic Growth Hormone-Releasing Factor*), peptyd złożony z 44 reszt aminokwasowych, wykazuje zdolność uwalniania hormonu wzrostu. Został wydzielony z nowotworu trzustki, powodującego akromegalię. Oznaczono strukturę pierwszorzędową hpGRF. Jego syntetyczny odpowiednik ma pełną aktywność biologiczną i stymuluje sekrecję. Jest identyczny z peptydem wydzielanym przez podwzgórze (Guillemin R. et al., *Science* 1982, 218, 585 – 587).

HSP, akronim białek szoku cieplnego (*heat-shock-proteins*), białka syntezowane w odpowiedzi na gwałtowną zmianę temperatury o kilka stopni oraz inne bodźce. Powstają u bakterii, drożdży, grzybów, pierwotniaków, roślin, owadów, ptaków i ssaków (Schlesinger M.J. et al., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 7, 222 – 225).

humulina (*humulin*), ludzka insulina otrzymywana drogą inżynierii genetycznej (Shapley D., *Nature* 1982, 300, 100 – 101).

hypuzyna (*hypusine*), N-(4-amino-2-hydroksybutylo) lizyna, aminokwas utworzony przez addycję grupy butyloaminowej (pochodzącej ze spermidyny), do δ -aminowej grupy reszty lizynowej łańcucha polipeptydowego i hydroksylację węgla 2 dodanej grupy. Obecność hypuzyny wykazano dotychczas jedynie w białku Hy⁺, znajdujących się we wszystkich komórkach zwierzęcych. Hypuzyna aktywuje czynnik inicjacji translacji (Cooper H.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 80, 1854 – 1857).

ikozapeptyd ludzki trzustkowy (*human pancreatic icosa-peptide*), peptyd złożony z 20 reszt aminokwasowych, stanowi C-końcowy odcinek prekursora polipeptydu trzustkowego. Jest on drugim znanym trwałym produktem, powstającym z tego prekursora (Schwarz T.W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 408 – 412).

immunotoksyna (*immunotoxins*), klasa leków, koniugaty toksyn (np rycyny, toksyny dyfteryjnej i i.) z monoklonalnymi przeciwciałami, które mają zdolność wybiórczego kierowania tych toksyn do komórek docelowych (Grienfield L. et al., *Science* 1987, 238, 536 – 539).

ingenzyzna (*ingensin*), cytozolowa proteaza, wrażliwa na kwas linolowy, wydzielona w homogennej postaci z łożyska ludzkiego (Ishiura S. et al., *Int. J. Biochem.* 1986, 18, 765 – 769).

inhibitor-1- fosfatazy białkowej (*protein phosphatase inhibitor-1*), białko wydzielone z mięśni szkieletowych królika, hamuje fosfatazę białkową-1, enzym o szerokiej swoistości. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy, złożony z 165 reszt aminokwasowych, zawiera N-acetylowaną metioninę na N-końcu. Oznaczono jego całkowitą strukturę pierwszorzędową. Jest aktywny wyłącznie wtedy, gdy reszta treoninowa w pozycji 35 jest ufosforylowana. Zwiększa odpowiedź mięśni szkieletowych na adrenalinę i obniża odpowiedź na insulinę (Aitiken A. et al., *Eur. J. Biochem.* 1982, 126, 235 – 246).

insulinotropina (*insulinotropin*), peptyd zawierający reszty aminokwasowe 7 – 37 glukagono-podobnego peptydu I. Kodowana wspólnie z glukagonem w preproglukagonie. Silny stymulator wydzielania insuliny w izolowanej trzustce szczura (Mojsov S. et al., *J. Clin. Invest.*, 1987, 79, 616 – 619).

integryna (*integrin*), integralny błonowy kompleks glikoproteinowy, uczestniczący w transmembranowym połączeniu fibrynektyny macierzy pozakomórkowej z aktywną cytoszkieletem (Tamkun J.W., et al., *Cell* 1986, 46, 271 – 282).

IPG, akronim: fosforanu inozytologlikanu (*inositolphosphate glycan*), wtórny przekaźnik działania insuliny, produkt hydrolizy fosfatydyloinozytologlikanu (PIG), powstaje pod wpływem swoistej fosfolipazy C po związaniu insuliny przez jej receptor (Saltiel A.R., et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 1116 – 1121).

izoaktyny (*isoactins*), różne formy molekularne aktyny, występujące w tkankach kręgowców. Tkankowo-swoiste formy aktyn rozróżnia się na podstawie ruchliwości elektroforetycznej, determinant antygenowych i sekwencji aminokwasowej (Pardo J. et al., *Cell* 1983, 82, 1093 – 1103).

inzomaltuloza (*insomaltulose*) (synonim: palatynoza (*palatinose*)), disacharyd (6-0- α -glukopiranozylo-D-fruktofuranosa) (Cheetham P.S.J. et al., *Nature (Lond.)* 1982, 299, 628 – 632).

izoschizomery (*isoschizomers*), endonukleazy restrykcyjne rozpoznające jednakowe sekwencje deoksyrybonukleotydów w DNA i rozszczepiające identyczne wiązania fosfodiesterowe. Np. Msp I i Hpa II – oba enzymy rozszczepiają niemetylowane sekwencje CCGG (Wiks A.F. et al., *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* 1982, 79, 4252 – 4255).

izotretynoina (*isotretinoin*), kwas 13-cis-retinowy, syntetyczny retinoid, okazuje wysoką aktywność jako lek przeciw trądzikowi. Podwyższa stężenie triglicerydów i całkowitego cholesterolu w osoczu, obniża poziom HDL (*Nut. Rev.* 1986, 44, 196 – 198).

K

kachektyna (*cachectin*), czynnik (lub czynniki), produkowany przez makrofagi po stymulacji przez endotoksyny *in vitro*. Obniża syntezę i aktywność kluczowych enzymów lipogenezy w hodowlach adipocytów, swoicie hamuje ekspresję genów tych enzymów. Białko o wysokim stopniu homologii z TNF (Czynnik Nekrozy Nowotworów), okazuje też podobne działanie (Torti F.M. et al., *Science* 1985, 229, 867 – 869; Sherry and Ceram, *J. Cell Biol.* 1988, 107, 1269 – 1272).

kadheryny (*cadherins*), białka adhezji komórkowej, zależne od Ca²⁺. Klasyfikuje się je zależnie od występowania w tkankach. Kadheryna-E (synonim: uwomorulina), M_r około 124 000, występuje w tkankach nabłonkowych, kadheryna-N, M_r około 127 000 – w tkance nerwowej. Obie mają jednakowy wzorzec

trawienia przez trypsynę i identyczne heksapeptydy na N-końcach (Shirayoshi Y. et al., *The EMBO J.* 1986, 5, 2485 – 2488).

kalajosom (*calciosome*), oddzielna struktura subkomórkowa, występująca w komórkach mięśniowych. Zawiera zapasy Ca^{2+} wrażliwe na inozytolo-1,4,5-trisfosforan. Charakteryzuje go obecność białka podobnego do kalsekwestryny (Volpe R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 1091 – 1095).

kalcyforyna (*calciophorin*), białkowy jonofor wapnia o znanej sekwencji aminokwasowej, M_r 3 000. Wydzielona z wewnętrznej błony mitochondrialnej komórki serca cielęcia (Jeng A.E., Shamoo E.S., *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 6897 – 6903).

kalcyklina (*calcyclin*) cytoplazmatyczne białko wiążące wapń i cynk, które wyizolowano z komórek raka wysiękowego Ehrlicha. Występuje m.in. w fibroblastach. Ekspresja genu kalcykliny zachodzi pod wpływem czynników wzrostowych. Gen kalcykliny jest rozregulowany w ostrych białaczkach szpikowych. (Calabretta i wsp. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 12628 – 12632, Filipek i Kuźnicki *Acta Bioch. Pol.* 1990, 37, 99 – 101).

kalcymedyny (*calcimedins*), zestaw czterech białek, wydzielonych z mięśnia szkieletowego, sercowego i gładkiego za pomocą chromatografii powinowactwa na flufenazyno-Sepharose. M_r tych białek: 67 000, 35 000, 33 000 i 30 000. Białko 67 kDa oczyszczono do homogenności (Moore P.B., *Biochem. J.*, 1986, 238, 49 – 54).

kalelektryna (*calelectrin*), białko regulowane przez Ca^{2+} , M_r 34 000, wydzielone z zakończeń nerwowych organu elektrycznego *Torpedo mammosata*. Wiąże się z błonami, ulega auto-asocjacji, pobudza agregację błon w sposób zależny od Ca^{2+} . W wątrobie, mózgu i rdzeniu nadnerczy ssaków znaleziono dwie kalelektryny (M_r 67 000 i 32 000), biorące udział w regulacji transportu błonowego, zależnego od wapnia (Sudhof T.S. et al., *Biochemistry* 1984, 23, 1103 – 1109).

kalpastyna (*calpastin*), wspólna nazwa grupy wszechobecnych, wewnątrzkomórkowych inhibitorów białkowych, działających swoiście na kolpainę (E.C. 3.4.22.17), proteazę cysteinową zależną od Ca^{2+} (Takano E., Murachi T., *J. Biochem. (Tokyo)* 1982, 92, 2021 – 2028).

kalregulina (*calregulin*), białko odpowiedzialne za wiązanie Ca^{2+} , M_r około 63 000. W supernatancie (100 000x G) homogenatu wątroby wołu stanowi jeden z głównych szczytów aktywności wiązania jonów wapnia. Występuje we wszystkich tkankach oprócz erytrocytów. Ma oddzielne domeny wiązania Ca^{2+}

i Zn^{2+} . Brak jej w siateczce śródbłonkowej. Funkcja fizjologiczna nie została wyjaśniona (Khanna N.C. et al., *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 8883 – 8887).

kariofilne białka (*karyophylic proteins*), rozpuszczalne białka, gromadzące się w jądrze po wprowadzeniu do cytoplazmy oocytów gadów. Nie wiążą się z chromatyną ani innymi strukturami jądra. Zalicza się do nich nukleoplazminę i kwaśne białka jądrowe N-1, N-2, N-3 i N-4 oocytów *Xenopus* (Dabanville M.C., Franke W.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 5302 – 5306).

kastanospermina (*castanospermin*), alkaloid roślinny (1,6,7,8-tetrahydrokso-oktahydroindolizydyna) hamuje glikozydazę I i wydzielanie glikoprotein w komórkach wątroby ludzkiej (Sask V. et al., *Biochem. J.*, 1985, 232, 769 – 766).

katakalcyna (*katacalcine*) (akronim:KC), peptyd złożony z 21 reszt aminokwasowych, otrzymywany z białkowego prekursora kalcytoniny, przylega do niej po stronie C-końcowej. Silnie obniża poziom wapnia w osoczu. W prawidłowym osoczu występuje w równomolarnych stężeniach z kalcytoniną. Uwalnia się natychmiast po infuzji wapnia do organizmu (Hillyard C.T. et al., *The Lancet* 1983, 1, 846 – 848).

kazamorfina (*casomorphin*), peptyd opiatowy, wydzielony z produktów enzymatycznego trawienia kazeiny. Odpowiada sekwencji 60 – 66 β - kazeiny wołu (Petrilli P. et al., *FEBS Lett.* 1984, 169, 53 – 56).

keratolinina (*keratolinin*), rozpuszczalny białkowy substrat transglutaminazy (EC 2.3.2.12) tkanek człowieka i wołu (Zettergren J.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 238 – 242).

kinetensyna (*kinetensin*), nonapeptyd o immunoreaktywności podobnej do neurotensyny, wydzielony z ludzkiego osocza potraktowanego pepsyną. Wykazuje homologię sekwencyjną z dwoma regionami ludzkiej albuminy surowiczej (Mogard M.H. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 136, 983 – 988).

kinezyna (*kinesin*), ATPaza zależna od mikrotubuli, dzięki której aksoplazmatyczne organelle przesuwają się wzdłuż mikrotubuli. Wywołuje ruch tych organeli na szkle i paciorkach lateksowych i mikrotubularnych. Oczyszczono ją z aksoplazmy kałamarnicy, mózgu ssaków i jaj jeżowca morskiego. Kinezyna mózgu jest tetramerem, złożonym z dwu łańcuchów o M równym 120 kDa i dwu – 62 kDa. (Kuznetsov A.S. et al., *The EMBO J.* 1988, 7, 353 – 356).

kiotrofina (*kyotrophin*), dipeptyd Tyr-Arg wydzielony z mózgu wołu, wykazuje działanie analgetyczne (Kiso Y. et al., *FEBS Lett.* 1983, 155, 281 – 284).

kofilina (*cofilin*), białko z mózgu świni, wiąże filamenty aktyny i hamuje ich interakcję z miozyna i tropomiozyna. M_r około 21 000. (Nishida E. et al., *Biochemistry* 1984, 23, 5307 – 5313).

kompaktyna (*compactin*), podstawiony lakton heksahydronaftalenu, zmniejsza zawartość cholesterolu w osoczu. Kompetycyjnie hamuje aktywność reduktazy HMG-CoA, kluczowego enzymu biosyntezy cholesterolu (*Nut. Rev.* 1985, 43, 266 – 268).

konwertaza proferomonowa Y (*propheromone-converterase Y*), proteaza występująca w drożdżach, swoista względem pary reszt aminokwasów zasadowych (-Lys-Arg-; -Arg-Arg-; -Arg-Lys-), nieaktywna wobec pojedynczych reszt zasadowych. M_r około 43 000 (Mizuno K., Matsuo H., *Nature* 1984, 309, 558 – 590).

kotwice błonowe (*membrane anchors*), sekwencje hydrofobowych reszt aminokwasowych, za pomocą których białka łączą się z hydrofobową frakcją błon. Mogą mieścić się na N-końcu białka, jak w izomaltazie sacharozowej, cytochromie P_{450} i LM_2 , lub też na C-końcu, jak w glikoproteinie wibrionu *sinbis* SVREI, łańcuchu IgM itp. (Inana G. et al., *Nature* 1983, 302, 310 – 315).

kranina (*cranin*), glikoproteina o $M = 120$ kDa, wykryta wewnątrz błon cytoplazmatycznych, główny składnik laminy (Smalheiser N.R., Schwartz M.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6457 – 6461).

krotalocytyna (*crotalocytin*), białko agregujące płytki krwi, o M_r 55 000 i znanym składzie aminokwasowym, wydzielone z jadu grzechotnika (Schmaier A. H. et al., *Blood* 1980, 56, 1013 – 1019).

L

laminy (*lamins*), grupa białek występujących w blaszce zewnętrznej jądra komórek wątroby. Laminy A i C wykazują znaczną homologię sekwencyjną. Lamina B jest polipeptydem o odmiennej budowie, występuje w blaszce wewnętrznej jądra komórkowego wątroby szczura (Label S., Raymond A., *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 2693 – 2696).

lentropina (*lentropin*), białko występujące w płynie szklistym oka, stymuluje różnicowanie włókien soczewki. Funkcjonalnie i immunologicznie pokrewna insulino-podobnym czynnikiem wzrostu (Beebe D.C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 2327 – 2330).

„leucynowy suwak” („*leucine zipper*”), hipotetyczna struktura, wspólna dla wielu białek wiążących DNA. Składa się z niezwykle długich α -helis, w których periodycznie pojawiają się reszty leucynowe. Przypu-

szczalnie boczne łańcuchy leucyn jednej helisy oddziałują z odpowiednią helisą drugiego łańcucha polipeptydowego, tworząc trwale niekowalencyjne wiązania (Landeschulz W.H. et al., *Science* 1988, 240, 1759 – 1764).

leukosulfakinina (*leucosulfakinin*), sulfonowany undekapeptyd miotropowy, wydzielony z wyciągów głowy karalucha. Wykazuje homologię sekwencyjną z ludzką gastryną II i cholecystakininą (Nachman R.J. et al., *Science* 1986, 234, 71 – 73).

leumorfina (*leumorphin*), endogenne peptyd opiatowy (29 reszt aminokwasowych), odpowiadający resztom 228 – 256 preproenkefaliny. 13 N-terminalnych reszt odpowiada rymorfynie (dynomorfynie B), a 5 N-terminalnych reszt - leucynoencefalynie (Nakao K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, 117, 695 – 701).

leuprolid (*leuprolide*), analog hormonu uwalniającego gonadotropinę (gonadoliberyny, GnRH), w którym reszty 5 i 10 (w hormonie glicyna i glicynamid) zastąpiono odpowiednio D-leucyną i etanolo-aminą (The Leu-prolide Study Group, *New England J. Med.* 1984, 31, 1281 – 1286).

lipofekcja (*lipofection*), wysoce wydajna procedura transfekcji DNA za pośrednictwem liposomów. Wykorzystuje się jednowarstwowe, blaszkowe liposomy, zbudowane z kationowych lipidów, spontanicznie oddziałujące z DNA (Falgner P.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 7413 – 7417).

lipofilina (*lipophilin*), hydrofobowa apoproteina proteolipidu, jeden z głównych składników błony mielinowej. M_r 28 000, zawiera 263 reszty aminokwasowe (Stoffel W. et al., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 1982, 263, 1397 – 1407).

lipoforyny (*lipophorins*), klasa lipoprotein o niskiej i wysokiej gęstości, występują w hemolimfie owadów. Uczestniczą w transporcie lipidów (Shapiro J.P. et al., *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 3680 – 3685).

lipoksen (*lipoxene*), jedna z pochodnych kwasu 15-hydroperoksy-ejkozapentaenowego, produkowana przez leukocyty świni (Wong P.Y. K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 126, 763 – 772).

lipoksyna (*lipoxin*), jeden z trihydroksytetranowych metabolitów kwasu 15-hydroperoksyarachidonowego. Powstaje w ludzkich leukocytach. Lipoksyna A wywołuje skurcz skrawków płuc świnki morskiej, uwalnia anion ponadtlenkowy z polimorfojadrzastych leukocytów i hamuje naturalną aktywność komórek cytotoksycznych (Wong P.Y.K. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985, 126, 763 – 772).

lipomodulina (*lipomodulin*), białko hamujące aktywność fosfolipazy. Pod wpływem kinaz białkowych zależnych od cAMP i Ca^{2+} zachodzi fosforylacja reszt tyrozynowych lipomoduliny (Hirata F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 4717 – 4721).

lizostafina (*lysostaphin*), enzym degradujący ściany komórkowe, wydzielany przez *Staphylococcus simulans*. Gen odpowiedzialny za syntezę enzymu koduje białko złożone z 389 reszt aminokwasowych. Ulega ono aktywacji przez odszczepienie 143 reszt N-terminalnych, co dzieje się poza komórką (Recsei P.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 1127 – 1131).

lofotoksyna (*lophotoxin*), cykliczny diterpenoid, wydzielony z koralii. Nieodwracalnie inaktywuje receptor nikotynowy acetylocholinowy w nienaruszonych komórkach BC3H-1 (Culver P. et al., *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 3763 – 3770).

LTR (akronim *long terminal repeats*), długie powtarzające się końcowe sekwencje, DNA flankujące prowirusowe geny retrowirusów, powstające podczas odwrotnej transkrypcji z wirusowego RNA. Zawierają informacyjne sekwencje z obu stron wirusowego RNA. Uczestniczą w integracji prowirusowego DNA z genomem gospodarzy, zawierają sygnały inicjacji i poliadenylacji transkryptów wirusowego RNA, a także sekwencje regulatorowe, które modulują sprawność transkrypcji prowirusa (Grover B., Hynes M.E., *Trends Biochem. Sci.* 1982, 400 – 403).

M

maltoporyna (*maltoporin*), białko uczestniczące w transporcie maltodekstryn przez zewnętrzną błonę. *E. coli* (Cline A. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984, 121, 34 – 40).

manoalid (*manoalide*), naturalny sesterpenoid, nieodwracalnie hamujący fosfolipazę A_2 i fosfolipazy C. Silny inhibitor mobilizacji wapnia w różnych typach komórek (Wheeler L.A. et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 6531 – 6538).

mastoparan (*mastoparan*), zasadowy, hydrofobowy amid peptydu, złożonego z 14 reszt aminokwasowych, występuje w jadzie osy. Wzmaga transport Ca^{2+} , Na^+ i K^+ przez czarne błony (Higashi T. et al., *FEBS Lett.* 1983, 152, 176 – 182).

maturaza mRNA (*mRNA maturase*), aktywność enzymatyczna, uczestniczy w wycinaniu odcinków mitochondrialnych prekursorów mRNA, kodowanych przez introny odpowiedniego genu. Maturaza jest częściowo kodowana przez intron mitochondrialnego genu grzybów i drożdży, bierze udział w wycinaniu

tego intronu z pre-mRNA.-transkryptu odpowiedniego genu. a być może także innych sekwencji, kodowanych przez introny, z transkryptów innych genów (Grivell L.A., Borst O., *Nature* 1982, 298, 703 – 704).

melityna (*mellitin*), hydrofobowy amid peptydu, składającego się z 26 reszt aminokwasowych o znanej sekwencji. Wydzielona z jadu pszczoł, aktywuje fosfolipazę A i wywołuje zmiany przepuszczalności błon (Lauterwien J. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 556, 244 – 256).

mepryna (*meprin*), endopeptydaza związana z błoną, zawiera Zn^{2+} i Ca^{2+} . Wydzielono ją z tkanki nerek (Butler P.E., Bond J.S., *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 13419 – 13426).

metalotioneiny (*metallothioneins*), białka uczestniczące w detoksykacji oraz w homeostazie cynku i miedzi (Mayo K.E. et al., *Cell* 1982, 29, 99 – 108).

meta-winkulina (*meta-vinculin*), białko o M_r 150 000, immunologicznie pokrewne winkulinie. Winkulina jest białkiem o M_r 130 000, wiążącym aktyne, występuje w obszarach błon zasocjowanych z cytoszkieletem. Meta-winkulinę znaleziono w komórkach nabłonkowych jelit, fibroblastach, mięśniu sercowym i szkieletowym. Podczas gdy winkulinę cechuje rozpuszczalność, właściwa białkom peryferyjnym, meta-winkulina ma właściwości integralnego białka błonowego. Sądząc z lokalizacji komórkowej, meta-winkulina może być integralnym białkiem „kotwicowym” włókienek aktyny (D'Angelo Siliziano J, Craig S.W., *Nature* 1982, 300, 533 – 535).

metabolon (*metabolon*), supramolekularny kompleks enzymów, uczestniczących kolejno w danym metabolizmie (np. glikolizie) oraz strukturalnych elementów komórkowych (Srere P.A., *Trends Biochem. Sci.* 1985, 10, 109 – 110).

metanopteryna (*methanopterin*), nowy kofaktor, wydzielony z *Methanobacterium thermoautotrophicum*, składa się z 2-amino-4-hydroksypterydiny (pteryny), kwasu glutaminowego, fosforanu, heksozoaminy i innych niezidentyfikowanych składników (Keltjens J.T. et al., *Eur. J. Biochem.*, 1983, 130, 537 – 544).

mezenterykopeptydaza zasadowa (*alkaline mesentericopeptidase*) (synonim: hydrolaza peptydylopeptydowa, EC 3.4.21), proteaza serynowa, wydzielona z *Bacillus mesentericus*, zawiera 275 reszt aminokwasowych, ma jeden łańcuch peptydowy o znanej sekwencji (Svendsen I. et al., *FEBS Lett.* 1986, 196, 228 – 232).

c.d. Leksykonu ukaże się w 1 zeszytce 37 tomu (1991).

pie 3. Do wykrycia zmutowanego genu *PAH* zastosowano cDNA pHPAH247. Regiony zawierające eksony genu były subklonowane w fagu M13mp18 dla analizy sekwencji nukleotydów. Stwierdzono, że sekwencja nukleotydów zmutowanego genu jest identyczna z sekwencją prawidłowego genu [16] z wyjątkiem substytucji (A → G) w trzeciej zasadzie kodonu 232 (Gln) [16,45,48] oraz tranzycji G → A w miejscu donorowym 5' wycinania intronu 12, zmieniającej obligatoryjny donorowy dwunukleotyd GT w AT. Wprowadzenie zmutowanego genu do komórek eukariotycznych i ocena jego ekspresji wykazały, że mutacja powoduje nieprawidłowości w wycinaniu intronów czego rezultatem jest pominięcie eksonu 12 w dojrzłym mRNA, a w konsekwencji powstawanie nieprawidłowego, niestabilnego białka. Istotnym uzupełnieniem w badaniach mutacji związanej z haplotypem 3 było przygotowanie biblioteki cDNA z mRNA nosiciela PKU, u którego gen związany był również z haplotypem 3. Z tej biblioteki wyizolowano 8 klonów, które zawierały fragmenty eksonu 12. Substytucja G → A powoduje prawidłowe składanie RNA — pominięcie eksonu 12, co prowadzi do przesunięcia ramki odczytu i powstania przedwczesnego kodonu „stop”. W następstwie powstaje defektywne białko, w którym brak 52 aminokwasów karboksylowego końca. Do wykrycia tej mutacji można również za-

stosować oligonukleotydowe sondy (21-mery) rozróżniające prawidłowy i zmutowany allel, komplementarne do kodującej nici prawidłowego genu lub zmutowanego genu z substytucją G → A. Analiza DNA innych rodzin z PKU wykazała, że mutacja G → A w miejscu istotnym dla wycinania intronu 12 nie jest swoista dla haplotypu 3, ponieważ występują również prawidłowe allele w tym haplocyocie. Powyższa mutacja nie występuje jednak w innych haplocyociach. Interesujące było również ustalenie miejsca mutacji w genie *PAH* w przypadku haplotypu 2, drugiego co do częstości występowania w populacji duńskiej. Stosując podobne procedury jak poprzednio wyizolowano kilka klonów [21]. Analiza sekwencji zawierających eksony zmutowanego genu wykazała pojedynczą mutację — substytucję C → T w pierwszej zasadzie kodonu 408 prowadzącą do zmiany Arg → Trp w 12-tym eksonie. Celem potwierdzenia, że ta substytucja była bezpośrednią przyczyną fenyloketonurii przeprowadzono kierunkową mutagenezę z użyciem specyficznego oligonukleotydu, a następnie oceniono ekspresję zmutowanego genu po wprowadzeniu do komórek ssaków. Sonda nukleotydowa była komplementarna do kodującej nici prawidłowej sekwencji eksonu z wyjątkiem miejsca mutacji C → A w zmutowanym genie. Ponieważ Arg408 znajduje się w wewnętrznym fragmencie HindIII o długości 588 pz prawidłowego klonu

POLTRADE LIMITED

WYŁĄCZNY DYSTRYBUTOR NA POLSKĘ
WYROBÓW : BIBBY STERILIN I AMICON

ma przyjemność poinformować państwa, że wszelkie informacje techniczno-handlowe można uzyskać w nowo powstałym biurze:

"PROSPECTA"

Skr. Pocz. 11, Wa-wa21
ul. Korotyńskiego 5
02-121 Warszawa

tel. (022) 235852
fax/tel. (022) 235306
tlx. 816675

Bibby Sterilin

Jest jednym z największych na świecie producentem sprzętu laboratoryjnego ze szkła borokrzemowego i sodowapniowego oraz z tworzyw sztucznych, sprzedawanymi pod znakami firmowymi: PYREX, QUICKFIT, E-MIL, SVL, MBL, AZLON.

Bibby Sterilin specjalizuje się również w naczyniach do hodowli komórkowej, sprzedając swoje wyroby pod znakami firmowymi: CORNING, TISSUE CULTURE i STERILIN.

Firma posiada także bogaty asortyment urządzeń laboratoryjnych takich jak: destylarki, wyparki obrotowe, pH-metry, halogenowe płytki grzejne, termometry, biurety cyfrowe, dozowniki.

amicon

Amicon dostarcza technologii do ultrafiltracji i chromatografii, aparatury do izolowania do zastosowania w badaniach naukowych, laboratoriach klinicznych i produkcyjnych, szpitalach, jak też w przemyśle.

Produkty tej firmy są szeroko stosowane w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym i biotechnologii.

cDNA phPAH247, fragment ten subklonowano w fa-
gu M13mp18 [50], a następnie powielono przy użyciu
zmutowanej sondy jako primera. Zmutowanym frag-
mentem HindIII zastąpiono fragment HindIII
w phPAH247 celem uzyskania pełnej długości zmuto-
wanego cDNA *PAH*, zawierającego mutację Trp408.
Z kolei zmutowany i prawidłowy cDNA *PAH* były
niezależnie włączone do eukariotycznych wektorów
o wysokiej ekspresji — p91023 (B) [51]. Zmutowaną
i prawidłową oligonukleotydową sondą wykrywającą
mutację Trp408 użyto do bezpośredniej analizy miejs-
ca mutacji w prawidłowym i zmutowanym zrekom-
binowanym klonie cDNA/p91023 (B) *PAH* [52]. Tra-
wienie tych klonów restryktazą EcoRI powodowało
powstanie fragmentu 2,4 kZ odpowiadającego prawid-
łowemu lub zmutowanemu cDNA *PAH*. W odpowie-
dnio dobranych warunkach hybrydyzacji prawidłowa
sonda hybrydyzowała wyłącznie z fragmentem 2,4 kZ
EcoRI prawidłowego cDNA, natomiast zmutowana
sonda hybrydyzowała specyficznie ze zmutowanym
cDNA. Te dane potwierdziły obecność substytucji
w zmutowanym klonie cDNA *PAH*. Prawidłowe
i zmutowane klony cDNA/p91023 (B) *PAH* wprowa-
dzono metodą transfekcji do komórek COS nerki
małpy celem analizy produktów ekspresji [22]. Wyka-
zano aktywność *PAH* w ekstraktach komórki ludzkiej
wątroby (kontrola) oraz w komórkach, do których
wprowadzono prawidłowy cDNA *PAH*/p91023 (B),
natomiast nie wykryto aktywności tego enzymu po
wprowadzeniu zmutowanego cDNA *PAH*/p91023 (B)
i w ekstrakcie wątroby przy braku syntetycznego
kofaktora 6-metylotetrahydropteryny. Chociaż anali-
za RNA techniką Northern komórek COS poddanych
transfekcji wykazała, że zarówno sekwencje reprezen-
tujące zmutowany jak i prawidłowy cDNA ulegały
transkrypcji na podobnym poziomie techniką Western
nie wykazano obecności zmutowanego produktu biał-
kowego w ekstraktach komórek poddanych transfek-
cji zmutowanym cDNA *PAH*/p91023 (B). Całkowity
brak aktywności *PAH* oznacza klasyczny fenotyp
PKU [1] i może być przypisany zamianie Arg → Trp,
wywołanej substytucją C → T w 12 eksonie [53].

VII. Uwagi końcowe

W bliskiej przyszłości należy oczekiwać poznania
mutacji występujących w innych haplotypach, co
przyczyni się do wyjaśnienia, czy PKU jest spowodo-
wana przez ograniczoną liczbę mutacji, które rozprzes-
trzeniły się wśród osób białej rasy, czy też różnorodne
mutacje powstały niezależnie w różnych populacjach.
Takie badania pomogłyby wyjaśnić ewolucje i po-
chodzenie mutacji prowadzących do fenyloketonurii.
W przypadku potwierdzenia hipotezy o sprzężeniu
specyficznych mutacji z danym haplotypem RFLP
w locus *PAH*, stałoby się możliwe przygotowanie
zestawu sond oligonukleotydowych pozwalających na

wykrycie około 90% zmutowanych genów u osób
białej rasy. W ten sposób zostałby również rozwiązany
problem wykrywania nosicielstwa.

Artykuł otrzymano 6 września 1988r.
Zaakceptowano do druku 2 listopada 1989r.

Piśmiennictwo

1. Foelling A., (1934), *Nord. Med.*, **8**, 1054 – 1059.
2. Jervis G. A., (1953), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **82**, 514 – 515.
3. Kaufman S., (1976), w *Advances in Neurochemistry* vol. **2** (red. Agranoff B.W. Aprison M.H.), Plenum New York, 1 – 132.
4. Foelling A., (1934), *Chemistry*, **227**, 169 – 176.
5. Jervis G. A., (1953), *Exp. Biol. Med.*, **82**, 514 – 515.
6. Guettler F., (1980), *Acta Paediatr. Scand. Suppl.*, **280**, 1 – 80.
7. Scriver C. R., Clow C. L., (1980), *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1336 – 1342.
8. Lidsky A. S., Law M. L., Morse H. G., Kao F. T., Rabin M., Ruddle F. H., Woo S. L. C., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6221 – 6225.
9. Słomski R., Ziętkiewicz E., (1987), *Post. Bioch.*, **33**, 451 – 472.
10. Robson K. J., Chandra T., MacGillivray R. T., Woo S. L. C., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4701 – 4705.
11. Shiman R., (1980), *J. Mol. Chem.*, **255**, 10029 – 10032.
12. Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guettler F., Chandra T., Robson K. J. H., (1983), *Nature*, **306**, 151 – 155.
13. Robson K. J. H., Beattie W., James R. J., Cotton R. C. H., Morgan F. J., Woo S. L. C., (1984), *Biochemistry*, **23**, 5671 – 5675.
14. Chandra T., Stackhouse R., Woo S. L. C., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1845 – 1848.
15. Hagenbuchle O., Santer M., Steitz J. A., Mans R. J., (1978), *Cell*, **13**, 551 – 563.
16. Kwok S. C. M., Ledley F. D., DiLella A. G., Robson K. J. H., Woo S. L. C., (1985), *Biochemistry*, **24**, 556 – 561.
17. Gitschier J., Wood W. I., Goralka T. M., Wion K. L., Chen E. Y., Eaton D. H., Vehar G. A., Capon D. J., Lawn R. M., (1984), *Nature*, **312**, 326 – 330.
18. Van Ommen G. J. B., Arnberg A. C., Baas F., Brocus H., Sterka., Tegelaers W. H. H., Vassart G., de Vijlder J. J. M., (1983), *Nucleic Acid Res.*, **11**, 2273 – 2281.
19. Wilks A., Cato A. C. B., Cozens P. J., Mattaj J. W., Jost J. P., (1981), *Gene*, **16**, 249 – 254.
20. Blake C., (1983), *Nature*, **308**, 535 – 540.
21. DiLella A. G., Kwok S. C. M., Ledley F. D., Marvit S., Woo S. L. C., (1986), *Biochemistry*, **25**, 743 – 749.
22. Ledley F. D., Grenett H. E., DiLella A. G., Kwok S. C. M., Woo S. L. C., (1985), *Science*, **228**, 77 – 81.
23. Lidsky A. S., Robson K. J. H., Thirumalachary C., Barker P. E., Ruddle F. H., Woo S. L. C., *Am. J. Hum. Genet.*, **36**, 527 – 533.
24. Law M. L., Kao F. T., (1979), *Cytogenet. Cell Genet.*, **24**, 102 – 114.
25. Law M. L., Kao F. T., (1982), *J. Cell. Sci.* **53**, 245 – 254.
26. Kaufman S., Fisher D. B., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 4745 – 4750.
27. Barranger J. A., Geiger P. J., Husino A., Bessman S. P., (1972), *Science*, **175**, 903 – 905.
28. Gillam S. S., Woo S. L. C., Woolf L. I., (1974), *Biochem. J.* **139**, 731 – 739.
29. Tourian A., Treiman L., Kaiko A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4055 – 4060.
30. Miller M. R., McClure D., Shiman R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3677 – 3684.
31. Friedman P. A., Kaufman S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 56 – 61.

32. Choo K. H., Cotton R. G. H., Danks D. M., Jannings I. G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 285 – 294.
33. Donlon J., Kaufman S., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1011– 1017.
34. Abita J. P., Milstein S., Change N., Kaufman S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5310 – 5314.
35. Cotton R. G. H., Grattan P. J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 427 – 430.
36. Abita J. P., Blandin-Savoja F., Rey F., (1983), *Biochem. Int.*, **7**, 727 – 737.
37. Donlon J., Kaufman S., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2146 – 2152.
38. Zweig S. E., (1984), *Nucleic Acid Res.*, **12**, 767 – 776.
39. Wretborn M., Humble E., Ragnarson U., Engstrom L., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **93**, 403 – 408.
40. Donlon J., Kaufman S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6657 – 6659.
41. Heisberg M. C., Berry H. K., (1979), *J. Exp. Zool.*, **208**, 161 – 168.
42. Letendre C. H., Dickens G., Guroff G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7186 – 6882.
43. Letendre C. H., Dickens G., Guroff G., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6672 – 6678.
44. Ledley F. D., DiLella A. G., Kwok S. C. M., Woo S. L. C., (1985), *Biochemistry*, **24**, 3389 – 3392.
45. Lidsky A. S., Ledley F. D., DiLella A. G., Kwok S. C. M., Daiger S. P., Robson K. J. H., Woo S. L. C., (1985), *Am. J. Hum. Genet.*, **37**, 619 – 634.
46. Woo S. L. C., (1984), *Pediatrics*, **74**, 412 – 423.
47. Guettler F., DiLella A. G., Ledley F. D., Lidsky A. S., Kwok S. C. M., Marvit J., Woo S. L. C., (1987), *Eur. J. Pediatr.*, **15**, 101 – 118.
48. Kan Y. W., Dozy A. M., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5631 – 5635.
49. Marvit J., DiLella A. G., Brayton K., Ledley F. D., Robson K. J. H., Woo S. L. C., (1987), *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5613 – 5628.
50. Messing J., (1983), *Meth. Enzym.*, **101**, 20 – 78.
51. Wong G. G., (1985), *Science*, **228**, 810 – 814.
52. DiLella A. G., Woo S. L. C., (1987), *Meth. Enzym.*, (in press).
53. DiLella A. G., Marvit J., Brayton K., Woo S. L. C., (1987), *Nature*, **327**, 333 – 336.
54. DiLella A. G., Marvit J., Lidsky A. S., Guettler F., Woo S. L. C., (1986), *Nature*, **322**, 799 – 803.

Diagnostyka prenatalna: szansa? zagrożenie? dylemat?*

Prenatal Diagnosis: a chance? danger? dilemma?*

BARBARA CZARTORYSKA¹

Pod pojęciem wrodzonej wady metabolicznej rozumiemy taki rodzaj błędu aparatu genetycznego, który prowadzi do braku lub znaczącego niedoboru aktywności jednego enzymu lub, ogólniej, jednego białka (enzymu, hormonu, receptora itd.).

W badaniach nad wrodzonymi wadami metabolicznymi biochemik może wybrać jedno z dwu podejść: teoretyczno-poznawcze lub praktyczne.

ad. 1/ Wrodzony niedobór jakiegoś białka to idealny materiał doświadczalny do badania jego roli w metabolizmie. Pozwala na śledzenie gromadzenia się jednych metabolitów i braku innych, na obserwację sposobu wykorzystywania szlaków alternatywnych, rozmaitych skutków pozornie odległych od pierwotnej przyczyny itp. To właśnie badania nad komórkami — zazwyczaj hodowanymi *in vitro* — pochodzącymi od takich chorych pozwoliły na wyjaśnienie wielu faktów np. na wyznaczenie dróg katabolizmu gangliozydów, inkorporacji enzymów lizosomalnych do lizosomu itp. Analiza DNA, a także śledzenie syntezy i obróbki białka pozwoliło w wielu przypadkach na doświadczalne potwierdzenie teoretycznych założeń możliwości mutacji (Np. stwierdzono, że pierwotną przyczyną choroby Fabry'ego tj. niedoboru α -galak-

tozydazy lizosomalnej bywa mutacja punktowa, delecja lub duplikacja fragmentu genu).

ad. 2/ Medycyna oczekuje jednak od biochemika pomocy w rozwiązaniu spraw praktycznych, a mianowicie w opracowaniu metod diagnostycznych oraz w wyznaczaniu dróg leczenia.

a/ Diagnoza w przypadkach chorób metabolicznych opiera się na:

1. Stwierdzeniu gromadzenia metabolitu, będącego w normalnych warunkach albo bezpośrednim substratem „defektywnego” enzymu (np. gangliozyd G_{m2} w tkance mózgowej chorych na chorobę Tay-Sachsa) albo produktem wykorzystania alternatywnej drogi metabolicznej, nie mającej znaczenia w komórce prawidłowej (np. kwas fenylopirogonowy w moczu chorych na fenyloketonurię, kwas moczowy w komórkach chorych na tzw. chorobę Lesh-Nyhena)
2. Stwierdzeniu braku lub niedoboru bezpośredniego produktu „defektywnego” genu — na ogół aktywności enzymatycznej (np. arylosulfatazy A w komórkach chorych na leukodystrofię meta-chromatyczną), rzadziej hormonu (hypotyroidyzm) lub receptora (rodzina hipercholesterolemia).
3. Oznaczeniu substancji, której obniżenie stwierdzono doświadczalnie u chorych nie znając przyczyny tego obniżenia (np. ceruloplazmina w chorobie Wilsona).

¹ Dr, Zakład Genetyki, Instytut Psychiatrii i Neurologii

* Na marginesie artykułu J. Jaruzelskiej i R. Słomskiego „Molekularne podstawy fenyloketonurii”.

4. Analizie DNA. Podstawą metody jest zjawisko polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych pochodzących z samego nieprawidłowego genu lub też z blisko z nim sąsiadujących fragmentów DNA. Jest to podejście kosztowne i wymagające wyspecjalizowanych laboratoriów ale niezastąpione w przypadkach, gdy nie ma dobrej metody oznaczania aktywności „defektywnego” enzymu, gdy nie znany jest ani enzym ani jego metabolity a znany jedynie kliniczny przebieg choroby oraz sposób dziedziczenia (np. płasawica Huntingtona) albo też gdy niedostępne są komórki, w których obserwuje się ekspresję danego genu.

b/ Leczenie. Prawidłowa diagnoza ma służyć prawidłowemu leczeniu. I tu zasadnicza trudność. Trzeba powiedzieć brutalnie, że genetycznie uwarunkowane wady metaboliczne są nieuleczalne. Nie mamy możliwości „naprawy” wadliwie pracującego kodu genetycznego. Możemy jedynie usuwać, łagodzić czy minimalizować skutki danej wady. Oczywiście istnieją wady metaboliczne nieszkodliwe (np. albinizm), wady, które wcale lub w stopniu minimalnym utrudniają człowiekowi prawidłowe funkcjonowanie. Na ogół jednak wady metaboliczne są to bardzo ciężkie schorzenia, prowadzące do inwalidztwa fizycznego, a często również do upośledzenia umysłowego.

W wielu przypadkach możemy dziś usuwać lub łagodzić skutki choroby — pacjent jednak zawsze pozostaje przez całe życie lub jakiś jego okres inwalidą zmuszonym do przestrzegania bardzo ścisłego reżimu. W jaki sposób można skutkom choroby zapobiec?

- I. Usuwając gromadzone nieprawidłowe metabolity (np. w chorobie Wilsona usuwa się gromadzoną miedź podając penicylaminę lub sole cynku).
- II. Ograniczając — na ogół w krytycznym okresie dzieciństwa — podaż substancji będących substratami „defektywnego” enzymu (np. glutenu w celiakii czy białka w fenyloketonurii).
- III. Uzupełniając niedobór brakującego metabolitu (np. fosforan we wrodzonej hypofosfatemii — podaje się go sondą, przez 12 godz. na dobę).
- IV. Unikając podawania leków lub innych czynników wyzwalających nieprawidłową reakcję (np. chronić przed światłem chorych na porfirię).
- V. Stosując leczenie substytutowe (podawanie czynnika VIII krzepnięcia w przypadkach hemofilii, hormonów tarczycy w przypadkach hypotyroidyzmu itp). Szczególną odmianą metody substytucji jest przeszczepienie tkanek lub grupy komórek (np. nerki, łożyska lub hodowanych fibroblastów skóry). Przeszczepiony organ (lub grupa komórek) ma być źródłem ciągłego dopływu brakującego białka. Metoda ta jest najracjonalniejsza, lecz stosowanie jej jest ograniczone do sytuacji, gdy brakuje białka wydzielanego, produkowanego przez wyspecjalizowany narząd, organ, tkankę lub grupę komórek na potrzeby innych komórek czy tkanek. Inaczej ma się rzecz w przypadkach, gdy

każda komórka produkuje dane białko na własne potrzeby — jak to ma miejsce np. w przypadkach chorób lizosomalnych. Wprawdzie istnieje zjawisko międzykomórkowego „przekazywania” enzymu oraz „wychwytywania” go z krwi przez opłukiwane komórki, są to jednak najczęściej ilości niedostateczne. Pozytywne skutki przeszczepu, nawet jeśli w początkowym okresie są dostrzegalne, na ogół są krótkotrwałe. Dodatkową przeszkodą nie do przekroczenia jest bariera krew/mózg. Ponadto ograniczeniem jest niebezpieczeństwo odrzucenia przeszczepu oraz jego obumieranie. Inną metodą substytutowego leczenia może być wykorzystanie szczepów bakteryjnych z „wstawionym” odpowiednim genem człowieka. Być może w przyszłości będzie to droga zapobiegania skutkom chorób metabolicznych, choć i na tej drodze piętrzą się trudności analogiczne do przedstawionych powyżej (patrz Addendum).

Powtarzam istnieje wciąż jeszcze kilkadziesiąt bardzo ciężkich chorób metabolicznych albo całkowicie nie poddających się leczeniu albo takich, w których częściowe złagodzenie skutków można osiągnąć stosując drakoński reżim (np. bardzo ostra dieta, ciągły wlew dożylny lub doustny-przez sondę itp.).

W przypadkach chorób poddających się leczeniu ogromne znaczenie ma wczesna (czasami oznacza to kilka dni po urodzeniu) i prawidłowa diagnoza. A w przypadkach nie poddających się leczeniu? Prawidłowa diagnoza nie jest pozbawiona znaczenia — często pozwala oszczędzić pacjentowi wielu bezużytecznych badań, zabiegów itp. Ale z drugiej strony odbiera nadzieję pacjentowi czy, częściej, jego rodzicom. Dodatkowym dylematem jest możliwość postawienia diagnozy na długo, kilka, kilkanaście lub nawet ponad 20 lat, przed wystąpieniem pierwszych objawów (np. płasawica Huntingtona). Czy słuszne jest by pacjent żył z tą groźbą? a z drugiej strony jeśli jest możliwość uspokojenia go, że mimo ryzyka genetycznego może być spokojny, że nie zachoruje.

W przypadku rodzin obarczonych wysokim ryzykiem urodzenia następnego dziecka chorego (25% w przypadku chorób dziedziczonych w sposób recesywny, 50% w przypadku dziedziczenia w sposób dominujący) dodatkową pokusą jest możliwość diagnozy prenatalnej — na podstawie badania metabolitów w płynie owodniowym (mukowiscydoza, mukopolisacharydozy), aktywności enzymatycznej w hodowanych komórkach z płynu owodniowego, lub komórek kosmówki, wreszcie analizy DNA otrzymanego z tych komórek.

W przypadku stwierdzenia, że dziecko urodzi się zdrowe można uspokoić rodziców. A w przypadku stwierdzenia defektu? To, co dzisiaj proponuje się rodzicom w poradniach genetycznych zwie się eufemistycznie „selektywną aborcją”, a jest po prostu propozycją zabicia chorego dziecka przed jego urodzeniem.

Czy istotnie dziecko chore nie ma prawa do życia?

i jakie stosować tu kryterium? Jaki chory nie ma prawa do urodzenia się? Chory na chorobę Tay—Sachsa, której pierwsze objawy wystąpią w 4-6 miesiącu życia, dziecko przestanie się rozwijać a potem pocznie cofać się w rozwoju psychomotorycznym i zginie przed 2-gim rokiem życia ślepe, głuche, nie reagujące na otoczenie? na chorobę Huntera — u dziecka upośledzenie umysłowe i ruchowe, zmiany kostne, maskaronowata twarz pogłębiają się z wiekiem i pacjent ginie na ogół przed 20-tym rokiem życia? na chorobę Huntingtona w której pierwsze objawy pojawiają się po 30-tym roku życia i prowadzą do ciężkiego inwalidztwa? fenyloketonurię, w przypadku której prawidłowy rozwój dziecka zapewnia ostra dieta uniemożliwiająca np. wyjazdy na normalne kolonie, obozy itp?, hemofilię, w której każde skaleczenie grozi śmiertelnym krwotokiem a najmniejszy zabieg chirurgiczny wymaga stosowania preparatów krwi grożących zakażeniem?

Kto ma decydować? rodzice? ich decyzja będzie zawsze emocjonalna, uwikłana w tysiące zależności — od poziomu wykształcenia i poziomu moralnego, od sposobu przedstawienia sprawy przez lekarza, od nacisku opinii społecznej, od perspektyw pomocy przy pielęgnacji chorego dziecka. Lekarz? jego rolą jest leczyć nie zabijać. Ustawa? jakaś komisja?

Dotychczas sprawy te regulują tzw. komisje etyczne, sesje etyki lekarskiej różnych zjazdów itp. złożone na ogół ze zwolenników „selektywnej aborcji”. Czy naprawdę Światowy Zjazd Naukowy jest autorytetem

moralnym zdolnym decydować o prawie człowieka do życia?

A jaka w tym rola i odpowiedzialność biochemika, dostarczającego coraz liczniejszych, precyzyjniejszych, lepszych, nowocześniejszych metod?

*Artykuł otrzymano 10 sierpnia 1989r.
Zaakceptowano do druku 15 sierpnia 1989r.*

* *Addendum*, grudzień 1990 r.

W ostatnim czasie „leczenie genem” ze sfery fantazji przeszło do fazy eksperymentalnej. Time z 24.09.1990 r. donosi o podjętej we wrześniu br. przez zespół z Centrum Klinicznego NIH w Bethesda próbie leczenia niedoboru dezaminazy adenozy, ciężkiej choroby objawiającej się całkowitym brakiem odporności immunologicznej. Dziecku dotkniętemu tą chorobą przetoczono jego własne limfocyty T zainfekowane zmodyfikowanym retrowirusem, w którego genom wbudowano gen kodujący syntetazę dezaminazy adenozy. Zadaniem tych limfocytów będzie produkcja brakującego enzymu. Wyniki nie zostały jeszcze opublikowane. Na skutki tego leczenia musimy poczekać.

Redakcja zaprasza do dalszych wypowiedzi na temat diagnostyki prenatalnej.

Nowe odmiany aktywatorów plazminogenu

New versions of plasminogen activators

TADEUSZ PIETRUCHA¹
CZESŁAW CIERNIEWSKI²

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Mutanty scu-PA
- III. Mutanty t-PA
- IV. Stabilne kompleksy utworzone z aktywatorów plazminogenu sprzężonych z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi
- V. Hybrydy białkowe aktywatorów plazminogenu
- VI. Chimery białkowe powstałe wskutek łączenia aktywatorów plazminogenu z innymi białkami
- VII. Podsumowanie

Contents:

- I. Introduction
- II. scu-PA mutants
- III. t-PA mutants
- IV. Stable complexes of plasminogen activators and monoclonal antibodies
- V. Hybrid protein of plasminogen activators
- VI. Chimeric proteins formed by plasminogen activators and other proteins
- VII. Summary

Wykaz stosowanych skrótów:

SK — streptokinaza, UK; u-PA — urokinaza; t-PA — tkankowy aktywator plazminogenu; sct-PA — jednołańcuchowa postać tkankowego aktywatora plazminogenu; tct-PA — dwułańcuchowa postać tkankowego aktywatora plazminogenu; scu-PA — jednołańcuchowa postać aktywatora

¹ mgr, ² prof., Zakład Biofizyki, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna, 90 – 131 Łódź, ul. Lindleya 3
Praca napisana w ramach problemu JPBR 3.3.

plazminogenu typu urokinazowego (prourokinaza); r — oznacza, że dane białko przed nazwą którego umieszczono tę literę otrzymano techniką rekombiacji DNA; APSAC — acylowany kompleks streptokinazy z plazminogenem; EGF — epidermalny czynnik wzrostowy; F — domena typu „finger”; E — domena o budowie podobnej do EGF; K — domena typu „kringle”; P — łańcuch B w t-PA i u-PA zawierający centrum aktywne; X — reszty cukrowe w cząsteczce aktywatora plazminogenu; S — peptyd sygnałny; L — prepeptyd; FDP — produkty degradacji włókniaka

I. Wstęp

Zakrzepy i zatory zakrzepowe w naczyniach krwionośnych serca i mózgu wstrzymujące przepływ krwi są bezpośrednią przyczyną większości zgonów w uprzemysłowionych krajach, a także obniżenia wydolności organizmu i zdolności do pracy. Powstanie skrzepu jest wynikiem lokalnej aktywacji układu krzepnięcia krwi zachodzącej w miejscu uszkodzenia ściany naczynia,

mającego zwykle naturę miażdżycową. Aktywatory plazminogenu wykorzystywane są w medycynie do rozpuszczania tych skrzepów, zwłaszcza w miejscach szczególnie newralgicznych, takich jak naczynia wieńcowe. Powodują one przejście nieaktywnego plazminogenu w plazminę (enzym proteolityczny), która hydrolizuje włóknik stanowiący podstawowy element strukturalny skrzepu krwi (Ryc. 1.).

Stosowanie w praktyce klinicznej czynników trombolitycznych takich jak streptokinaza, urokinaza, a także wprowadzonych ostatnio: t-PA, scu-PA i APSAC, potwierdziło ich skuteczność w terapii wielu chorób o podłożu zakrzepowym, ale również ujawniło występowanie towarzyszących im niekorzystnych efektów ubocznych [1 – 3]. Rozpoczęto więc poszukiwanie nowych wersji tych leków, lepszych od dostępnych obecnie [4].

Celem przyświecającym konstruowaniu nowych mutantów tych białek, jest nabycie przez nie na-

Ryc. 1. Schemat działania aktywatorów plazminogenu w procesie fibrylizy. Linia pozioma oddziela aktywatory przekształcające w miarę selektywnie plazminogen do plazminy na powierzchni skrzepu (t-PA, scu-PA, APSAC) od działających niespecyficjnie (streptokinaza, tcu-PA). Strzałki narysowane przerywaną linią wskazują działanie inhibitora wolnej plazminy.

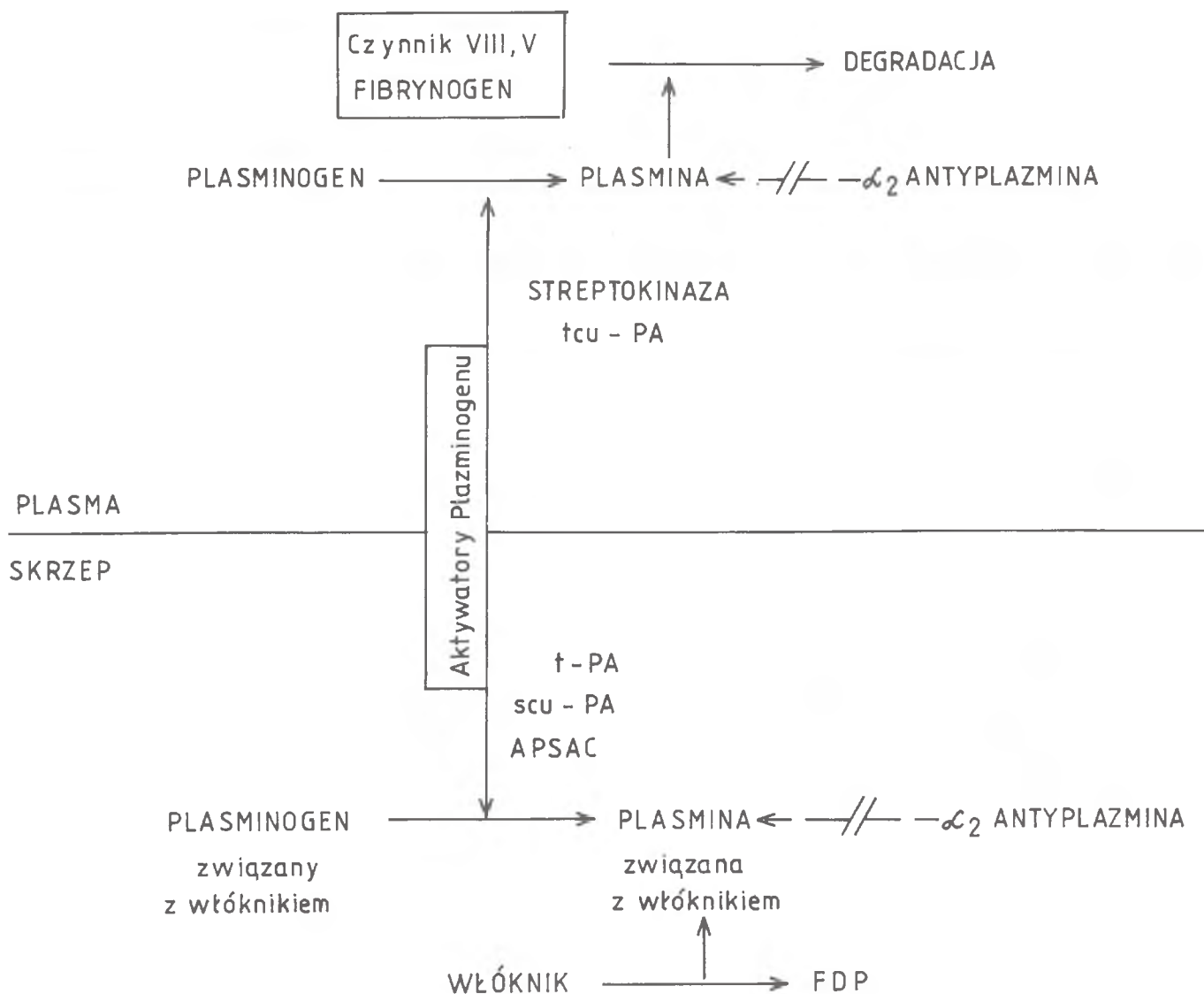


Tabela 1

Mutanty rscu-t-PA otrzymane techniką mutacji punktowej. Strzałki wskazują wiązania peptydowe w sekwencji t-PA, które ulegają rozszczepieniu w wyniku działania trombiny i plazminy

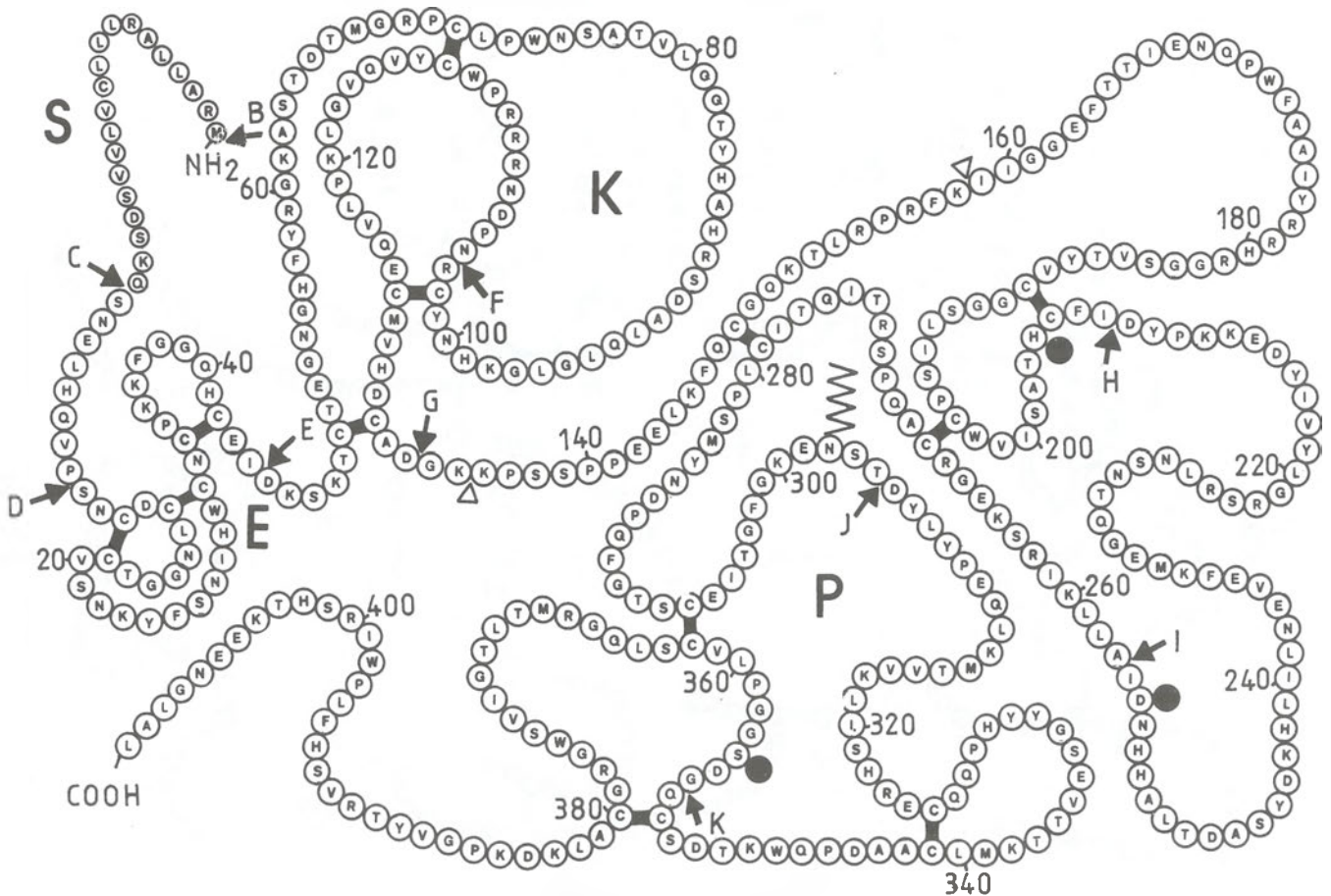
Opis mutantu	trombina		plazmina		Piśmiennictwo
	- Arg -	Phe - Lys -	- Ile - Ile -	Gly	
rscu-PA - Glu ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Glu			51-53
rscu-PA - Gly ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Gly			51
rscu-PA - Met ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Met			52, 53
rscu-PA - Ala ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Ala			52
rscu-PA - Val ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Val			53
rscu-PA - Arg ₁₅₈	Lys ₁₅₈	→ Arg			55
rscu-PA - Thr _{156,158}	Arg ₁₅₆	→ Thr			54
	Lys ₁₅₈	→ Thr			
rscu-PA - Gly _{156,158}	Lys ₁₅₈	→ Gly			55
	Ile ₁₆₀	→ Lys			
rscu-PA - Pro ₁₅₉	Ile ₁₅₉	→ Pro			55
rscu-PA - Gly ₁₅₉	Ile ₁₅₉	→ Gly			55

stępujących własności: a) zwiększonego powinowactwa wiązania z włóknikiem, b) wydłużonego w warunkach *in vivo* okresu półtrwania w krążeniu, c) ulepszonej specyficzności i selektywności działania.

II. Mutanty scu-PA

Cząsteczka scu-PA jest jednołańcuchowym polipeptydem o m.c. 54000 zbudowanym z 411 aminokwasów (Ryc. 2.). Przekształcenie jej do formy dwułańcuchowej (tcu-PA) następuje w wyniku hydrolizy wiązania peptydowego Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ przez plazminę. scu-PA zawiera trzy domeny: N-końcowy region utworzony z domeny E i K oraz C-końcowy region zawierający podjednostkę enzymatyczną. Funkcja N-końcowego regionu scu-PA nie jest w pełni poznana. Przypuszcza się, że pośredniczy on w oddziaływaniu z receptorami komórkowymi i jest w zna-

Ryc. 2. Schemat struktury pierwszorzędowej jednołańcuchowego urokinazowego aktywatora plazminogenu (scu-PA). Zygzakiem zaznaczone są miejsca glikozylacji. Czarne kropki wskazują aminokwasy z centrum aktywnego. Trójkątem zaznaczone jest wiązanie peptydowe, które ulega rozbięciu przy przejściu do postaci dwułańcuchowej. Strzałki (od B do M) wskazują fragmenty polipeptydowe kodowane przez poszczególne egzony wchodzące w skład struktury genu scu-PA.



cznym stopniu odpowiedzialny za usuwanie tego aktywatora z układu krążenia [5].

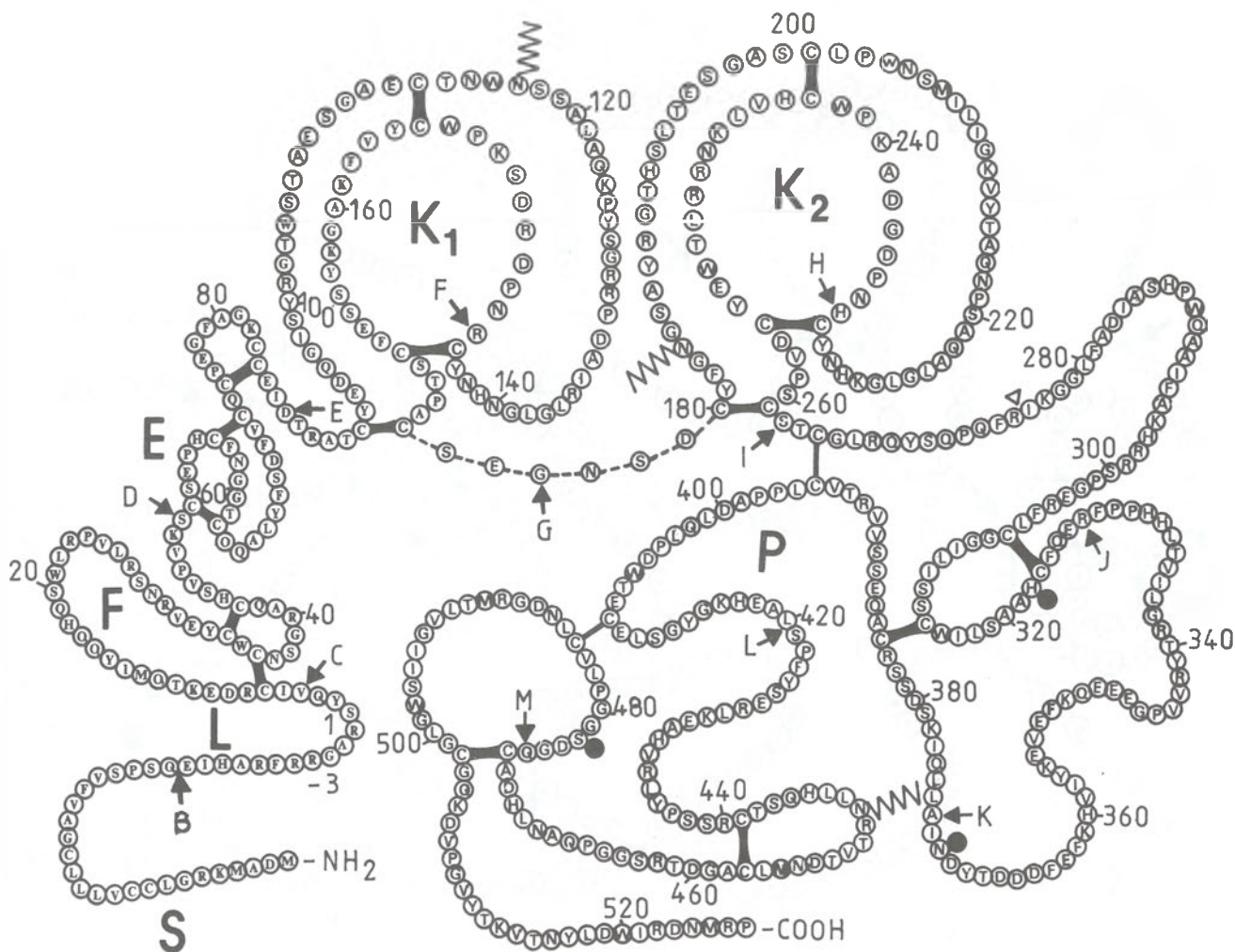
W wyniku szczegółowych badań różnych mutantów (Tab. 1.) okazało się, że dla właściwego funkcjonowania aktywatora reszty aminokwasowe tworzące wiązanie 158 – 159 są bardzo ważne. Mutant rscu-PA (Glu₁₅₈) oporny na działanie plazminy, w którym podstawiono Glu w miejsce Lys₁₅₈ miał 10-20-krotnie niższy potencjał katalityczny w porównaniu z rscu-PA typu dzikiego. Obecność Ile w pozycji 159 determinuje aktywność enzymatyczną zarówno jednokaj i dwułańcuchowego prekursora urokinazy. W osoczu krwi wszystkie mutanty odporne na działanie plazminy posiadały niższą aktywność od rscu-PA typu dzikiego i zmniejszoną specyficzność w stosunku do włókniaka [6].

Naturalnie syntetyzowany scu-PA zawiera resztę cukrową w pozycji Asn₃₀₂. Pozbawienie go tej reszty podnosi jego specyficzność w stosunku do włókniaka przy zachowaniu niezmiennych własności fibrynolitycznych i farmakokinetycznych. Mutant ten otrzymywany jest przy pomocy techniki rekombinacji DNA

w komórkach bakteryjnych *E. coli*. Podobne właściwości posiada rscu-PA, w którym zmiana aminokwasu w pozycji 302 (Asn → Asp) uniemożliwia uzyskanie glikozylowanego białka w komórkach eukariotycznych (np. *Saccharomyces cerevisiae*) [7]. Mutant scu-PA o wydłużonym półokresie trwania w krążeniu uzyskuje się poprzez delecję domeny E [8].

Ze względu na możliwość zastosowania klinicznego, bardzo interesującym aktywatorem plazminogenu jest niskocząsteczkowy scu-PA, powstały w wyniku rozszczepienia wiązania peptydowego Glu₁₄₃-Leu₁₄₄ przez niezidentyfikowaną proteazę. Aktywator ten określany jako scu-PA-32k, po raz pierwszy otrzymany został z hodowli linii komórek nowotworu płuc (CALU-3). Występuje on również w komórkach nerek małpy. Podobnie jak scu-PA utrzymuje on względną specyficzność w stosunku do włókniaka oraz powoduje znacznie mniej zaawansowaną fibrynogolizę niż tcu-PA. Tę formę aktywatora urokinazowego otrzymano również w warunkach laboratoryjnych dzięki zastosowaniu techniki rekombinacji DNA [9]. rscu-PA-32k jest nie do odróżnienia od naturalnie

Ryc. 3. Schemat struktury pierwszorzędowej tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA). Oznaczenia analogiczne jak w rycinie 2.



występującego scu-PA-32k i może być konkurencyjny w produkcji na skalę przemysłową w stosunku do rscu-PA. Brak polipeptydu Ser₁-Glu₁₄₃ nie wpływa na właściwości biochemiczne tego aktywatora [10]. Wykorzystuje się go nie tylko jako czynnik trombolityczny, ale także do konstrukcji białek fuzyjnych (chimer aktywatorów plazminogenu).

III. Mutanty t-PA

Cząsteczka t-PA jest jednołańcuchową glikoproteiną o m.c. 70000 składającą się z 527 aminokwasów. Zbudowana z pięciu domen, z których każda kodowana jest przez jeden lub kilka egzonów [11]. Łańcuch ciężki stanowi N-końcowy region cząsteczki i obejmuje cztery domeny (Ryc. 3.). Są to: domena F — podobna do segmentów występujących w fibronektynie, domena E o budowie podobnej do epidermalnego czynnika wzrostowego (EGF) [12], dwie domeny K — K₁ i K₂. Piątą domenę P stanowi łańcuch lekki (łańcuch B) zawierający centrum katalityczne enzymu. Wewnątrz cząsteczki znajdują się trzy miejsca glikozytacji (Asn₁₁₇, Asn₁₈₄, Asn₄₄₈). Z łańcuchem lekkim bezpośrednio oddziałuje szybko i swoiście reagujący inhibitor o nazwie PAI-1 [13 – 14].

Selektywność działania t-PA w stosunku do plazminogenu zaadsorbowanego na włóknach skrzepu wynika z obecności w cząsteczce aktywatora miejsc wiążących włókniak, zlokalizowanych na domenach F, E i K₂ [15]. Miejsca te nie reagują z fibrynogenem, w którym obszary oddziaływujące z t-PA są ukryte. Po związaniu z włóknikiem zmienia się kinetyka oddziaływania t-PA z plazminogenem, o czym świadczy spadek wartości stałej Michaelisa (K_M) z 83 do 0.18 μM oraz wzrost k_{cat} z 0,07 do 0,28sek⁻¹. Oznacza to, że wydajność katalityczna tkankowego aktywatora plazminogenu po związaniu z włóknikiem wzrasta ponad 1000-krotnie [16].

Jednołańcuchowa postać t-PA znacznie lepiej wiąże się z włóknikiem niż forma dwułańcuchowa [17]. Podczas fibrynolizy zmiana konformacji cząsteczki, wywołana rozbięciem wiązania peptydowego Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ przez plazminę powoduje obniżenie powinowactwa wiązania tego wiązania. Poprzez zmianę techniką mutacji punktowej reszty Arg w pozycji 275 na inny aminokwas można temu zapobiec.

Skonstruowano mutanty t-PA, w których Arg₂₇₅ podstawiona została kolejno wszystkimi naturalnie występującymi aminokwasami [18]. Otrzymane mutanty charakteryzują się następującymi właściwościami: a) utrzymują postać jednołańcuchową (z wyjątkiem t-PA-Lys₂₇₅), b) zachowują niezmienną zdolność wiązania się z włóknikiem (z wyjątkiem t-PA-Cys₂₇₅) oraz aktywacji plazminogenu związanego z włóknikiem, c) *in vivo* mogą przechodzić w formę dwułańcuchową w wyniku hydrolizy przez plazminę wiązania przy Lys₂₇₇.

Jedynie mutanty, które mają Gln i Ile w pozycjach

odpowiednio: 275 i 277 zachowują formę jednołańcuchową oraz utrzymują zdolność selektywnej aktywacji plazminogenu w obecności włóknika [18]. Wydaje się, iż mutanty odporne na działanie plazminy w warunkach *in vivo* są czynnikami trombolitycznymi bardziej specyficznymi w stosunku do włóknika niż t-PA typu dzikiego.

Usunięcie jedynie domeny F z cząsteczki t-PA nie znosi zdolności oddziaływania aktywatora z włóknikiem [19], ale je obniża. Wypadnięcie domen E i F powoduje podobne konsekwencje w aktywności t-PA [20]. Mutanty delecyjne t-PA pozbawione domen F i E, ale zawierające domeny kringlowe posiadają normalną aktywność enzymatyczną, wykazują umiarkowanie lub znacznie [20 – 21] zredukowane możliwości oddziaływania z włóknikiem. Optymalne oddziaływanie z włóknikiem wymaga również obecności w cząsteczce t-PA domeny K₂. W przypadku pojawienia się defektów genetycznych w tej domenie, jej funkcję przejmuje domena K₁ [22]. Aktywność enzymatyczna t-PA nie jest uzależniona od pierwszych 4 domen cząsteczki. Centrum aktywne enzymu mieści się w łańcuchu lekkim (łańcuch B). Obszar ten, bez względu na to czy jest wyodrębniony z cząsteczki za pomocą metod chemicznych, czy też otrzymany techniką rekombinacji DNA wykazuje właściwą dla t-PA aktywność enzymatyczną. Aktywność ta nie jest jednak stymulowana obecnością włóknika tak jak w przypadku rt-PA typu dzikiego, ale mutant utworzony z domeny F i łańcucha lekkiego wiąże się z włóknikiem i zachowuje aktywność enzymatyczną.

Próba zwiększenia powinowactwa wiązania do włóknika poprzez zastąpienie domeny K₁, domeną K₂, delecję domeny E i zmianę Asn₅₉ na Ser (FK₂P, K₂PLys₂₇₇ Asn₅₉ → Ser) nie dała, przynajmniej w warunkach *in vitro*, pozytywnych rezultatów. Wydłużył się natomiast znacznie okres półtrwania (do 25 – 30 min) w osoczu [23]. Pohl i współautorzy [24] wykazują, że mutanty tkankowego aktywatora plazminogenu: K₂P, K₂PLys₂₇₇ → Val₂₇₇, K₂PAsn₄₄₈ → Gln₄₄₈, FK₂PLys₂₇₇ → Val₂₇₇, FK₂Asn₄₄₈ → Gln₄₄₈ posiadają także znacznie niższe powinowactwo wiązania z włóknikiem i są dużo mniej efektywne w rozpuszczaniu skrzepu. Jednak najnowsze doniesienia częściowo temu przeczą. Wydaje się, że jednak mutant K₂P odznacza się bardzo korzystnymi cechami fibrynolitycznymi [25].

Za szybkie usuwanie t-PA z krążenia (okres półtrwania — t_{1/2} wynosi od 1 do 4 min) odpowiedzialne są komórki wątroby — hepatocyty oraz komórki śródbłonka. Wydłużenie czasu przebywania aktywatora w krążeniu jest jednym ze sposobów podniesienia jego skuteczności terapeutycznej. t_{1/2} rt-PA, (głównie w postaci dwułańcuchowej), który używany jest w celach leczniczych, wynosi ok. 6 min. Jednołańcuchowa postać przebywa w krążeniu o 30 – 40% czasu krócej. Za usuwanie rt-PA odpowiedzialne są głównie domeny łańcucha ciężkiego. Wypadnięcie domeny F [26] i domeny E [27] powoduje znaczne

wydłużenie czasu $t_{\frac{1}{2}}$. Delecja domen F, E wraz z mutacjami punktowymi w miejscach glikozylacji cząsteczki (Asn \rightarrow Gln) wydłuża czas $t_{\frac{1}{2}}$ do 25 min w przypadku t-PA Δ FE, 42 min dla t-PA Δ FE1X (Asn₁₇₄ \rightarrow Gln) i 14 min — t-PA Δ FE3X (we wszystkich punktach glikozylacji w miejsce Asn podstawione były Gln). W tym eksperymencie okres półtrwania naturalnego t-PA ($t_{\frac{1}{2}}$) wynosił 4 min [28]. Nie tylko delecje całych domen, ale także zmiana pojedynczych aminokwasów tak jak w przypadku t-PA (Pro₄₇ \rightarrow Gly, Lys₄₉ \rightarrow Asn) i t-PA (Gln₄₂ \rightarrow Asn, His₄₄ \rightarrow Glu) powoduje utrzymanie wyższego stężenia aktywatora w osoczu przez znacznie dłuższy okres czasu niż obserwuje się to w przypadku rt-PA typu dzikiego [29].

W procesie eliminacji t-PA z krążenia ważną rolę odgrywają również reszty cukrowe [30–33]. Znaczne wydłużenie okresu półtrwania w krążeniu uzyskać można poprzez eliminację techniką mutacji punktowej oligosacharydu mannozy występującego w pozycji 117 łańcucha białka (zamienia się Asn na Gln) [34]. Podobny efekt wywiera analogiczna mutacja w pozycji Asn₄₄₈. Całkowite usunięcie cukrów z cząsteczki znacznie wydłuża okres półtrwania w krążeniu zarówno jedno jak i dwułańcuchowej formy enzymu. Początkowo sugerowano, że reszty cukrowe biorą udział w wiązaniu tego białka z receptorami hepatocytów. Obecnie uważa się, że usuwanie t-PA z krążenia odbywa się za pośrednictwem receptorów dwóch rodzajów. Jedne, rozpoznające pewne regiony łańcucha ciężkiego znajdują się na komórkach parenchymy wątroby (hepatocytach), drugie (specyficzne dla mannozy) na komórkach śródbłonkowych [35]. Najwolniej usuwane z krążenia są mutanty t-PA pozbawione domen F i E [35]. Mutanty te wiążą się również znacznie słabiej ze świeżo wyodrębnionymi hepatocytami szczura. W odróżnieniu od przeciwciał anty K₂, które nie mają wpływu na te reakcje, przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko domenom F/E i K₁ hamują odpowiednio w 27% i 67% wiązanie ¹²⁵Irt-PA z hepatocytami. Również *in vivo* przeciwciała monoklonalne otrzymane dla domen F/E znacznie bardziej hamowały usuwanie rt-PA niż przeciwciała monoklonalne dla domeny K₁. Wynika stąd, iż w wiązaniu rt-PA z receptorami hepatocytów nie uczestniczą dokładnie te same obszary, które odpowiedzialne są za eliminację tego białka z krążenia [57]. Dokładny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze poznany. O jego złożoności świadczy fakt, iż zamiana nawet pojedynczego aminokwasu w domenie E (Tyr₆₇ \rightarrow Asn) znacząco wpływa na wiązanie t-PA z hepatocytami [36].

Komórki śródbłonkowe posiadają dwa rodzaje receptorów dla t-PA [37]: a) receptory o wysokim powinowactwie wiązania, które przyłączają t-PA skompleksowany z PAI-1 oraz b) o niskim powinowactwie ale większej pojemności. Związanie aktywatora przez te drugie receptory nie powoduje utraty jego aktywności [59]. W oddziaływaniu z tymi receptorami

prawdopodobnie pośredniczą domeny F i E [38].

W celu uchronienia rt-PA przed inaktywacją przez szybko działające inhibitory, takie jak PAI-1 i PAI-2, konstruuje się acylowane pochodne tego białka [39]. Po wprowadzeniu do układu krążenia zachodzi powolna deacylacja aktywatora i odblokowanie jego aktywności biologicznej.

IV. Kompleksy trwałe utworzone z aktywatorów plazminogenu sprzężonych z odpowiednimi przeciwciałami monoklonalnymi

Podwyższenie swoistości działania aktywatorów plazminogenu uzyskuje się przez przyłączenie do ich fragmentów zawierających domenę enzymatyczną, lub do całej cząsteczki aktywatora przeciwciał specyficznych rozpoznających włókniak [40–42]. Związanie, np. przeciwciał monoklonalnych 64C5, rozpoznających N-końcowy fragment łańcucha B ludzkiego włókniaka, z urokinazą za pomocą odczynnika sprzęgającego, podwyższało 100-krotnie potencjał fibrynolityczny otrzymanej chimery. Kompleksy jednołańcuchowego t-PA lub u-PA z innym przeciwciałem — 59D8 — wykazywały również 100-krotnie wyższą aktywność trombolityczną niż urokinaza oraz 10-krotnie niż t-PA. Tak zmienione cząsteczki aktywatorów przyspieszały od 3.2 do 4.5-krotnie lizę skrzepu w ludzkim osoczu [41]. Zaobserwowano także znaczne podniesienie ich swoistości działania, tj. chimery w minimalnym stopniu powodowały trawienie fibrynogenu i alfa₂—antyplazminy. Połączenie scu-PA z fragmentem Fab' przeciwciała 59D8 spowodowało 230-krotny wzrost aktywności fibrynolitycznej w porównaniu z rscu-PA, 430-krotny w odniesieniu do urokinazy oraz 33 razy wyższy niż t-PA [40]. Wynika to ze znacznego wzrostu powinowactwa wiązania tych chimery z włókniakiem przy zachowaniu strukturalnych i funkcjonalnych właściwości scu-PA.

Wykorzystując techniki inżynierii genetycznej otrzymano rekombinacyjną wersję chimery rt-PA z przeciwciałami monoklonalnymi 59D8. W tym celu sklonowano cDNA kodujące łańcuch ciężki przeciwciała 59D8, który następnie włączono do wektora ekspresyjnego, zawierającego sekwencję kodującą część konserwatywną łańcucha gamma2b oraz łańcuch B ludzkiego tkankowego aktywatora plazminogenu. Uzyskane w ten sposób białko hybrydowe zachowało właściwości przeciwciała monoklonalnego 59D8 oraz właściwości enzymatyczne t-PA. W warunkach *in vivo*, po podaniu donacyniowym takiej chimery cząsteczkowej obserwowano intensywniejszą lizę skrzepu niż po podaniu samego rt-PA. Polepszenie specyficzności i właściwości fibrynolitycznych uzyskano także w wyniku połączenia za pomocą odczynnika sprzęgającego rscu-PA bądź tcu-PA z przeciwciałami monoklonalnymi MA1505 dla fragmentu D-D otrzymanego z hydrolizatu plazminowego włókniaka [42].

Podobne chimery cząsteczkowe tworzono korzystając z przeciwciał monoklonalnych TCL8 (dla t-PA) i 59D8 (dla włóknika), lub przeciwciał monoklonalnych PEG2 (dla łańcucha A wysokocząsteczkowej urokinazy) oraz przeciwciał 59D8 (dla włóknika) [43]. Podane wraz z aktywatorem w warunkach *in vitro* powodowały wyraźny wzrost aktywności fibrynolitycznej, spowodowany swoistym zagęszczeniem aktywatora na powierzchni włóknika.

V. Hybrydy białkowe aktywatorów plazminogenu

W celu wzmocnienia specyficzności działania w stosunku do włóknika, połączono fragment cDNA kodujący łańcuch A t-PA (aminokwasy od Ser₁ do Thr₂₆₃) z cDNA kodującym scu-PA-32k (aminokwasy od Leu₁₄₄ do Leu₄₁₁). Ekspresję tak skonstruowanego genu białka hybrydowego uzyskano w komórkach CHO. W jego następnej wersji, by zminimalizować oddziaływanie steryczne, rozszerzono region łączący oba fragmenty białkowe o 17 aminokwasów (t-PA: Ser₁ — Phe₂₇₄, scu-PA: Ser₁₃₈-Leu₄₁₁). Aby zapobiec obecności wolnej cysteiny w pozycji 264 t-PA, nukleotydy od 997 do 981 (TGC) zastąpiono nukleotydami GGA kodującymi Gly [44]. Aktywność fibrynolityczna tej chimery gwałtownie wzrastała w obecności plazminy, która powodowała przejście z formy jednołańcuchowej do dwułańcuchowej (t-PA/tcu-PA).

Kompleks utworzony przez połączenie dwułańcuchowych cząsteczek t-PA i u-PA odznaczał się mniejszą specyficznością działania na włóknik niż kompleks jednołańcuchowych form tych samych białek. Stabilność w osoczu chimery złożonej z form jednołańcuchowych była podobna do stabilności scu-PA [45].

Rekombinowane białko fuzyjne zbudowane z domeny F t-PA (aminokwasy Ser₁ — Tyr₆₇) oraz fragmentu scu-PA (Lys₁₃₆ — Leu₄₁₁) cechowało się gorszym powinowactwem wiązania z włóknikiem niż rscu-PA, utrzymując podobną aktywność enzymatyczną. Podobne właściwości obserwowano w przypadku rscu-PA, który zawierał wstawioną domenę K₂ z t-PA (aminokwasy Cys₁₇₃ — Ser₂₆₂) pomiędzy reszty aminokwasowe Asp₁₃₀ i Ser₁₃₉ [46]. Zarówno te, jak i inne wersje białek hybrydowych aktywatorów plazminogenu [47] nie odznaczają się korzystniejszymi cechami od ich białek macierzystych. Nie obserwuje się spodziewanego zsumowania korzystnych cech różnych aktywatorów.

Bardziej interesującą generacją aktywatorów plazminogenu są chimery u-PA z wmontowanymi fragmentami łańcucha ciężkiego t-PA (FGK₂-u-PA, FK₂-u-PA, K₂-uPA), ułożonymi dokładnie przy miejscu, na które działa plazmina w cząsteczce urokinazowego aktywatora plazminogenu. Ekspresję kodujących je genów uzyskano w komórkach linii CHO [48]. Obecność domeny K₂ z tkankowego aktywatora

plazminogenu w u-PA powoduje 5-10-krotny wzrost aktywności stymulowanej przez włóknik. Słabszy efekt pojawiał się wówczas, gdy zamiast domeny K₂ wbudowywano domenę F. Chimery te odznaczały się znacznie wydłużonym okresem półtrwania oraz opornością na hamowanie przez PAI-1 [75]. Mutant t-PA, do którego wstawiono domenę kringlową pochodzącą z urokinazy (przed K₁) odznaczał się również wywoływaniem specyficznej lizy skrzepu, wydłużonym czasem przebywania w krążeniu oraz minimalną fibrynogenezą [49].

VI. Chimery białkowe powstałe wskutek łączenia plazminogenu z innymi białkami

Skonstruowano hybrydy zbudowane z łańcucha B urokinazy oraz N-końcowego regionu plazminy zawierającego miejsca wiążące lizynę, części enzymatycznej scu-PA i domeny K₁ plazminogenu [50], tcu-PA oraz centrum aktywnego plazminy [51]. Na razie brak jest bliższych danych charakteryzujących ich własności trombolityczne.

Wzrost powinowactwa do włóknika w porównaniu z rt-PA typu dzikiego wykazywała chimera, w której domeny F i E z t-PA zastąpiono domeną K₁ pochodzącą z plazminogenu, jak również jej zmodyfikowany wariant z usuniętym miejscem glikozylacyjnym (delecja Asp₁₁₇) z K₁ t-PA [52]. Zmiany te nie wpływają na ich funkcje enzymatyczne [53]. Dołączenie domeny E z czynnika XII do t-PA nie wpłynęło znacząco na zmianę jego właściwości [54].

Sygnalizowane jest także wykorzystanie fibrynogenu jako białka nośnikowego, dowożącego aktywator do miejsca powstawania zakrzepu. Łączy się go w sposób odwracalny z rt-PA [55]. Chimera wytworzona przez połączenie wiązaniem kowalencyjnym fibrynogenu z urokinazą posiadała znacznie zwiększoną efektywność w rozpuszczaniu zakrzepu tętniczego. 2500 j urokinazy w kompleksie z fibrynogenem podane na kg wagi ciała udrażniała naczynie krwionośne, podczas gdy ta sama ilość natywnego enzymu była nieskuteczna [56]. Wzrost aktywności fibrynolitycznej (2,5 – 3 razy) tego preparatu spowodowany jest specyficzną akumulacją preparatu na powierzchni włóknikowego skrzepu.

VII. Podsumowanie

Ze względu na olbrzymie zastosowanie praktyczne, aktywatory plazminogenu znalazły się w centrum zainteresowania tak klinicystów, jak i biologów molekularnych. Dokonywane modyfikacje mają je wyposażać w nowe korzystne cechy. Do chwili obecnej otrzymano i przetestowano ponad 100 mutantów t-PA i u-PA. Pozytywne wyniki uzyskano w przypadku niektórych wersji t-PA z wymienionymi pojedynczymi aminokwasami (zwłaszcza w pozycji Arg₂₇₅), mutantów delecyjnych (K₂P) oraz chimer cząsteczkowych,

które utworzone zostały przez kowalencyjne związanie aktywatorów lub ich fragmentów ze swoistymi przeciwciałami. Chimery te dzięki zwiększonej zdolności wiązania się z powierzchnią włóknika charakteryzują się wyższą specyficzną substratową w stosunku do włóknika niż innych białek osocza, w tym fibrynogenu. Własności trombolityczne tak zmodyfikowanych cząsteczek aktywatorów nie są jednak w pełni poznane i wymagają dalszych badań.

Artykuł otrzymano 20 marca 1990r.
Zaakceptowano do druku 30 sierpnia 1990r.

Piśmiennictwo

- Collen D., Lijnen H. R., Todd P. A., Goa K. L., (1989), *Drugs*, **38**, 346 – 388.
- Collen D., (1989), *Neth. J. Cardiol.*, **2**, 35 – 45
- Fears R., (1989), *Semin. Thromb. Hemos.*, **15**, 129 – 139
- Haber E., Quertermous T., Matsueda G. R., Runge M. S., (1989), *Science*, **243**, 51 – 56
- Blasi F., (1988), *Fibrinolysis*, **2**, 73 – 84
- Lijnen H. R., Gheysen D., de Foresta F., Pierard L., Jacobs P., Bollen A., Collen D., (1988), *Fibrinolysis*, **2**, 85 – 93.
- Kenny E., Steven J., Sutton A., Cederholm-Williams S. A., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 65 (Streszczenie 148).
- Hiramatsu R., Kasai S., Amatsuji Y., Kawai T., Hirose M., Morita M., Tanabe T., Kawabe H., Arimura H., Yokoyama K., (1989), *Fibrinolysis*, **3**, 147 – 151.
- Lijnen H. R., Nelles L., Holmes W. E., Collen D., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 5594 – 5598.
- Mao J., Puma P., Hsiao K., Salvato K., Hemmerdinger H., Capparell N., Broeze R., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 50 (Streszczenie 112).
- Gething M. -J., (1988), *EMBO J.*, **7**, 2731 – 2738
- Fears R., (1989), *Biochem. J.*, **261**, 313 – 324.
- Ranby M., Nguyen G., Scarabin P. Y., Samama M., (1989), *Thromb. Haemost.*, **61**, 409 – 414
- Monge J. C., Lucore Ch. L., Fry E. T. A., Sobel B. E., Billadello J. J., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 10922 – 10925
- Lijnen H. R., Collen D., (1988), *Enzyme*, **40**, 90 – 96
- Collen D., Stassen J. M., Blaber M., Winkler M., Verstraete M., (1984), *Thromb. Haemost.*, **52**, 27 – 31
- Husain S. S., Hasan A. A. K., Budzyński A. Z., (1989), *Blood*, **74**, 999 – 1006.
- Higgins D. L., Lamb M. C., Holmes W. E., Young S. L., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 122 (Streszczenie 278)
- Johannessen M., Diness V., Pingel K., Petersen L. C., Rao D., Lioubin P., O'Hara P., Mulvihill E., (1990), *Thromb. Haemost.*, **63**, 54 – 59
- Larsen G. R., Henson K., Blue Y., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 1023 – 1029.
- Kalyan N. K., Lee S. G., Wilhelm J., Fu K. P., Hum W. T., Rappaport R., Hartzell R. W., Urbano C., Hung P. P., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 3971 – 3978.
- Yoshitake S., Kato H., Hashimoto A., Ikeda Y., Kuwada M., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 542 (Streszczenie 1720).
- Feigen L., King L., Panzer-Knodle S., Bennet S., Gorczyński R., Steele L., Day K., Meyer E., Wun T.-C., Warren T., Bell L., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 543 (Streszczenie 1723).
- Pohl G., Sterky C., Attersand A., Nyberg E., Löwenadler B., Hansson L., Wikström K., Mattsson C., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 338 (Streszczenie 1050).
- Burck P. J., Berg D. H., Warrick M. W., Berg D. T., Walls J. D., Jaskunas S. R., Crisel R. M., Weigel B., Vlahos C. J., McClure D. B., Grinnell B. W., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 5170 – 5177.
- Larsen G. R., Hensen K., Blue Y., Horgan P., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 29 (Streszczenie 59)
- Browne M. J., Carey J. E., Chapman C. G., Tyrrel W. R., Entwisle C., Lawrence G. M. P., Reavy B., Dodd I., Esmail A., Robinson J. H., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 1599 – 1602.
- Collen D., Stassen J. M., Larsen G., (1988), *Blood*, **71**, 216 – 219.
- Ahern J., Morris G. E., Barone K. M., Horgan P. G., Angus L. B., Henson K. S., Langer-Safer P. R., Larsen G. R., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 338 (Streszczenie 1053).
- Haigwood N. L., Mullenbach G. T., Morre G. K., DesJardin L. E., Tabrizi A., Brown-Shimer S. L., Staub H., Stöhr Pagues E. -P., (1989), *Protein Eng.*, **2**, 611 – 620.
- Smedsrod B., Einarsson M., (1990), *Thromb. Haemost.*, **63**, 60 – 66
- Ahern T. J., Morris G. E., Barone K. M., Horgan P. G., Timony G. A., Angus L. B., Henson K. S., Stoudemire J. B., Langer-Safer P. R., Larsen G. R., (1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 5540 – 5545.
- Wilhelm J., Lee S. G., Kalyan N. K., Cheng S. M., Wiener F., Pierzchala W., Hung P. P., (1990), *Bio/Technology*, **8**, 321 – 325.
- Hotchkiss A., Refino C., O'Connor J., Tate K., Nakamura J., Leonard C., Powers D., Mohler M., McCabe J., Anderson S., Spellman M., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 30 (Streszczenie 62).
- Chen S. A., Foster D. L., Keyt B. A., Fendley B., Sinicropi D., Baughman R. A., Billings R. E., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 337 (Streszczenie 1049).
- Gething M. -J., Sambrook J., McGookey D., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 338 (Streszczenie 1051).
- Barnathan E. S., Kuo A., Van der Keyl H., McCrae K. R., Larsen G. R., Cines D. B., (1988), *J. Biol. Chem.*, **263**, 7792 – 7799.
- Barnathan E. S., Cines D. B., Barone K., Kuo A., Larsen G. R., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 28 (Streszczenie 58).
- Stürzebecher J., Richter M., Markwardt F., (1987), *Thromb. Res.*, **47**, 699 – 703.
- Bode C., Runge M. S., Schoenermark S., Eberle T., Matsueda G. R., Kubler W., Collen D., Haber E., (1988), *Clin. Res.*, **36**, 203A (Streszczenie).
- Runge M. S., Bode C., Matsueda G. R., Haber E., (1988), *Biochemistry*, **27**, 1153 – 1157.
- Dewerchin M., Lijnen H. R., De Mol M., Collen D., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 541 (Streszczenie 1716).
- Charpie J. R., Runge M. S., Matsueda G. R., Collen D., Haber E., (1986), *Clin. Res.*, **36**, 436A (Streszczenie).
- Lijnen H. K., Nelles L., Van Nuffelen A., De Cock F., Collen D., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 124 (Streszczenie 282).
- Lijnen H. R., Nelles L., Van Hoef B., De Cock F., Collen D., (1988), *Thromb. Haemost.*, **60**, 247 – 251
- Lijnen H. R., Pierard L., Raff M. E., Gheysen D., (1988), *Thromb. Res.*, **52**, 431 – 443
- Nelles L., Lijnen H. R., Van Nuffelen A., De Cock F., Collen D., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 541 (Streszczenie 1717).
- Heim J., Asselbergs F., Bürgi R., Chaudhuri B., Küenzi M., Meyhack B., Rajput B., Oostrum J. V., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 337 (Streszczenie 1048).
- Lee S. G., Wilhelm J., Hung P. P., Kalyan N. K., Cheng S. M., James H. L., Nachowiak D., Weinheimer C. J., Sobel E. E., Bergmann S. R., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 338 (Streszczenie 1052).
- Devlin P., Schaefer M., Panganiban L., Clark R., Mark D., Devlin J., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 124 (Streszczenie 283).
- Ferres H., Cassels R., Fears R., Freeman A. M., Hibbs M. J., Kalindjian S. B., Smith R. A. G., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 64 (Streszczenie 146).
- Langer-Safer P. R., Angus L. B., Barone K. M., Morris G. E., Larsen G. R., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 337 (Streszczenie 1047).
- Yoshitake S., Kato H., Hashimoto A., Ikeda Y., Kawada M., Mulvihill E., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 542 (Streszczenie 1720).
- Katoh M., Shimizu Y., Kawauchi Y., Ishida J., Takayama M., Yokota M., Yano E., Kawasaki T., Katsuta K., Yano S., Morinaga T., Tsujit T., Kinoshita A., Gomi Y., Takemoto T., Itoh K., Ezoe H., Gushima H., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 542 (Streszczenie 1719).
- Smith R. A. G., Esmail A. F., (1988), *Fibrinolysis*, **2** (Suppl. 1), 31 (Streszczenie 67).
- Maksimenko A. V., Samarenko M. B., Petrov A. D., Tischenko E. G., Torchilin V. P., Ruda M. Y., (1989), *Thromb. Haemost.*, **62**, 541 (Streszczenie 17180).

Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA

High-molecular-weight complexes of aminoacyl-tRNA synthetases

HENRYK BERBEĆ¹

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Porównanie syntetaz aminoacylo-tRNA organizmów pro- i eukariotycznych
 - II-1. Ewolucja struktury
 - II-2. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie
 - II-3. Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA organizmów zwierzęcych
- III. Otrzymywanie, budowa i własności HMWSC
 - III-1. Otrzymywanie
 - III-2. Budowa
 - III-2.1. Wielkość, kształt oraz skład enzymatyczny
 - III-2.2. Obecność innych niż syntetazy aminoacylo-tRNA składników w HMWSC
 - III-3. Własności HMWSC
 - III-3.1. Własności katalityczne skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA
 - III-3.2. Diadenozynotetrafosforan (Ap₄A) a HMWSC
 - III-3.3. Fosforylacja-defosforylacja składników HMWSC
 - III-4. Rola biologiczna HMWSC
 - III-4.1. HMWSC w tkankach i narządach
 - III-4.2. Większa trwałość skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA
 - III-4.3. Syntetazy skompleksowane wykorzystują aminokwasy zewnątrzkomórkowe
 - III-4.4. Syntetazy skompleksowane zwiększają wierność translacji
 - III-4.5. HMWSC w patologii
- IV. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Comparison of pro- and eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetases
 - II-1. Evolution of the structure
 - II-2. Subcellular distribution
 - II-3. High-molecular-weight aminoacyl-tRNA synthetase complexes (HMWSC) of animal organisms
- III. Isolation, structure and properties of HMWSC
 - III-1. Isolation
 - III-2. Structure
 - III-2.1. Size, shape and enzymatic composition
 - III-2.2. Presence of other than aminoacyl-tRNA synthetase components in HMWSC
 - III-3. Properties of HMWSC
 - III-3.1. Catalytic properties of complexed aminoacyl-tRNA synthetases
 - III-3.2. Diadenosine-tetraphosphate (Ap₄A) synthesis and HMWSC
 - III-3.3. Phosphorylation-dephosphorylation of the enzymes of HMWSC
 - III-4. Biological role of HMWSC
 - III-4.1. HMWSC in tissues and organs

- III-4.2. Greater stability of complexed aminoacyl-tRNA synthetases
- III-4.3. Complexed aminoacyl-tRNA synthetases use extracellular amino acids
- III-4.4. Complexed aminoacyl-tRNA synthetases increase translation fidelity
- III-4.5. HMWSC in pathology
- IV. Concluding remarks

Wykaz stosowanych skrótów:

HMWSC — wielkocząsteczkowy kompleks syntetaz aminoacylo-tRNA (ang. high-molecular-weight synthetase complex, Ap₄A — diadenozyno-5',5'''-P¹,P⁴-tetrafosforan, E — enzym, aa — aminokwas.

I. Wstęp

Syntetazy aminoacylo-tRNA pełnią kluczową funkcję w początkowym etapie biosyntezy białka specyficznie katalizując tworzenie aminoacylo-tRNA. Badania ostatnich lat wykazały, że rola tych enzymów jest bardziej wszechstronna niż pierwotnie przypuszczano. Oprócz reakcji aminoacylacji, niektóre syntetazy katalizują tworzenie diadenozynotetrafosforanu [1,2], związku, któremu przypisuje się udział w regulacji syntezy DNA [3, 4]. Sugeruje się również wykazywanie aktywności kinazowej przez syntetazy aminoacylo-tRNA [5].

Szeroko prowadzone badania nad tymi enzymami ujawniły, że w wyższych organizmach mogą one występować w postaci wieloenzymatycznych wielkocząsteczkowych kompleksów zawierających w swoim składzie oprócz syntetaz aminoacylo-tRNA także inne składniki. Szczególnie interesujący jest fakt, że wielkocząsteczkowe kompleksy syntetazowe (HMWSC, high-molecular-weight synthetase complex) występują wyłącznie w wyższych organizmach. Wydaje się, że zjawisko to stanowi wyraz większej złożoności maszynery syntetyzującej białko wykształconej w toku ewolucji. W piśmiennictwie zagranicznym ukazało się kilka opracowań omawiających dotychczasowe badania nad kompleksami syntetaz aminoacylo-tRNA i dyskutujących ich rolę biologiczną [6 – 10]. W niniejszym artykule przedstawiono aktualny stan wiedzy o wielkocząsteczkowych kompleksach syntetaz aminoacylo-tRNA.

¹ Dr. Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej, Lubartowska 85, 20—123 Lublin

II. Porównanie syntetaz aminoacylo-tRNA organizmów pro- i eukariotycznych

II-1. Ewolucja struktury

Syntetazy aminoacylo-tRNA organizmów prokariotycznych są białkami prostymi o masie cząsteczkowej w granicach 30-270 – x 10³ i strukturze podjednostkowej typu α , α_2 , α_4 , $\alpha\beta$, $\alpha_2\beta_2$, przy czym masa pojedynczego protomeru dochodzi do 95 kDa [11]. W niektórych syntetazach stwierdzono obecność powtarzających się odcinków o tej samej sekwencji aminokwasów. W tworzeniu form oligomerycznych biorą udział C-końcowe odcinki łańcuchów polipeptydowych, podczas gdy funkcje katalityczne pełnią odcinki N-końcowe [12, 13]. W organizmach prokariotycznych znaleziono tylko jedną syntetazę aminoacylo-tRNA dla każdego z aminokwasów [11].

Liczba występujących w organizmach eukariotycznych syntetaz aminoacylo-tRNA przewyższa liczbę znajdujących w białkach aminokwasów. W cytosolu bowiem występują wielorakie formy syntetaz, jeszcze inne formy syntetaz występują w mitochondriach i chloroplastach, a nawet w jądrze komórkowym [11, 14].

Długości łańcuchów polipeptydowych syntetaz wyższych organizmów są na ogół większe niż prokariotycznych (patrz Tab. 1 oraz [7, 13]). W toku ewolucji syntetazy aminoacylo-tRNA (przynajmniej niektóre) powiększyły się o znajdujący się w obrębie C-końca polipeptydu [13] odcinek, który nie jest niezbędny dla ich funkcji katalitycznej. Zauważono wyraźne różnice we właściwościach fizykochemicznych (rozpoznawanych metodami chromatograficznymi) syntetaz eukariotycznych i prokariotycznych. Syntetazy eukariotyczne zatrzymywane są na kolumnach z anionowymi i hydrofobowymi nośnikami, np. z immobilizowanym RNA [29], z heparyną [30, 31], na kolumnach fenolo-agarozowych [24], podczas gdy odpowiadające im enzymy z *E. coli* nie wykazują tej właściwości. Powyższe różnice spowodowane są występowaniem w syntetazach eukariotycznych regionów bogatych w aminokwasy elektrododatnie i hydrofobowe.

Uogólniając można stwierdzić, że syntetazy aminoacylo-tRNA zbudowane są z rdzenia odpowiedzialnego za aktywność katalityczną oraz z części nie niezbędnej, która w organizmach eukariotycznych jest bardziej rozbudowana niż u prokaryota [13].

Tabela 1

Porównanie wielkości niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA pochodzenia zwierzęcego z syntetazami bakteryjnymi*

Syntetaza specyficzna dla	Syntetazy zwierzęce				Syntetazy z <i>E. coli</i>		
	Pochodzenie enzymu	M _r pojedynczego łańcucha x 10 ³	Skład podjednostkowy	Piśmienictwo	M _r pojedynczego łańcucha x 10 ³	Skład podjednostkowy	Piśmienictwo
Arg	wątroba szczura	60	α	15, 16	60	α	22
		89*		20			
		65*		19			
		72*		18			
	wątroba owcy	73*		21			
	wątroba królika	74*		16, 21			
Gln	wątroba owcy	94*		21	69	α	26
	wątroba królika	96*		21			
Glu	wątroba owcy	85*		21	56	α	23
	wątroba królika	150*		21			
Ile	wątroba owcy	139*		25	112	α	23
Leu	wątroba owcy	129*		21, 24	104	α	23
	wątroba królika	108*		20			
		129*		21			
Lys	wątroba szczura	129*	α_2	20	52	α_2	23
		73*		19			
		66*		17			
	wątroba owcy	79*		21, 24			
	wątroba królika	76*		21			
Met	wątroba szczura	90*	α	20	85	α_2	23
		104*		27			
	wątroba owcy	103*		21			
	78*	28					
	wątroba królika	108*		21			

* Syntetaza pochodzi z wielkocząsteczkowego kompleksu.

II-2. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie

Syntetazy aminoacylo-tRNA u prokaryota występują w rozpuszczalnej frakcji komórki jako wolne, dyfundujące enzymy lub jako kompleksy enzym-substrat z odpowiednimi tRNA [11]. Syntetazy wyższych organizmów (przynajmniej niektóre) wykazują zdolność do wiązania się z rybosomami oraz z elementami struktur wewnątrzkomórkowych.

Posługując się technikami immunocytologicznymi wykazano [14], że niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA w wątrobie szczura są zasocjowane z włóknami cytoszkieletu. Znalezione znaczną część aktywności syntetazy metionyno-tRNA w składnikach retikulum endoplazmatycznego, nierozpuszczalnych w buforze z detergentem [27]. Wg Deutschera [8], syntetazy zwierzęce zasocjowane są z błonami plazmatycznymi. Wiązanie jest względnie słabe, o czym świadczy fakt, że enzymy te nie frakcjonują się jak typowe białka błonowe.

Większość zwierzęcych syntetaz aminoacylo-tRNA wykazuje zdolność wiązania się z rybosomami [32, 33]. Za wiązanie odpowiedzialny jest rybosomalny RNA [29, 34 – 36]. Nie wiadomo, czy wzajemne oddziaływanie syntetaz z rybosomami ma jakieś znaczenie funkcjonalne *in vivo*. W badaniach *in vitro* wykazano, że związanie z rybosomami zwiększa aktywność syntetaz oraz ich trwałość. Wg niektórych autorów [27, 29, 34] poprawia sprawność translacji dzięki wysokiej miejscowej koncentracji tych enzymów.

II-3. Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetaz aminoacylo-tRNA (HMWSC) organizmów zwierzęcych

Najbardziej uderzającą różnicą pomiędzy syntetazami aminoacylo-tRNA organizmów prokariotycznych i wyższych zwierząt jest występowanie u tych ostatnich wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych. Kompleksy te, których M_r dochodzi do 6×10^6 , zawierają oprócz syntetaz aminoacylo-tRNA, także inne białka oraz składniki nie będące białkami. Kompleksy powstają dzięki wykształconej w toku ewolucji zdolności syntetaz eukariotycznych do asocjacji i do łączenia się z elementami strukturalnymi wnętrza komórki [8, 27, 36–38]. Regiony polipeptydowe o oddziaływaniu elektrododatnim i hydrofobowym, występujące w syntetazach eukariotycznych, są najprawdopodobniej odpowiedzialne za tę zdolność [8, 17, 24, 37, 39 – 41]. Uważa się, że HMWSC stanowią wyraz dodatkowego, supramolekularnego poziomu organizacji aparatu biosyntezy białka. Pojawiły się propozycje nazw, które wyrażałyby strukturę i funkcję tych, jeszcze niezbyt poznanych, tworów: „ligasomy” [42], „kodosomy”, [43], „translasomy” [44].

III. Otrzymywanie, budowa i własności HMWSC

III-1. Otrzymywanie

W celu otrzymania wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych stosowano standardowe techniki oczyszczania białek i enzymów. Mając na uwadze nietrwałość kompleksów, preferowano techniki łagodne. Zastosowanie procedury polegającej na traktowaniu supernatantu post-mikrosomalnego wielkocząsteczkowym glikolem polietylenowym, sączeniu molekularnym uzyskanego preparatu oraz na chromatografii powinowactwa przy użyciu kolumn z immobilizowanym tRNA pozwoliło na uzyskanie kompleksów zawierających 7–9 syntetaz aminoacylo-tRNA [28, 45 – 47]. Odmianą metodą posługiwali się Dang i Yang [20], którzy z supernatantu post-mikrosomalnego otrzymywali frakcję X (frakcja sedymentująca w wyniku długotrwałego wirowania supernatantu post-mikrosomalnego), po rozpuszczeniu w buforze poddawali ją sączeniu molekularnemu przez kolumny z żelom Sphadex G 200, i po zatężeniu w atmosferze azotu frakcjonowali za pomocą wirowania w gradencie stężenia sacharozy. Autorzy otrzymywali kompleks o stałej sedymentacji 24S, oczyszczony około 1000-krotnie, z wydajnością 30%.

Stosowano też wirowanie w gradencie stężenia glicerolu w celu uzyskania ludzkich i zwierzęcych kompleksów syntetazowych [48, 49].

III-2. Budowa HMWSC

III-2.1. Wielkość, kształt oraz skład enzymatyczny

Jak podano w tabeli 2, wielkość kompleksów syntetazowych charakteryzowana za pomocą stałych sedymentacji zawiera się w granicach 12 – 24 S, zaś za pomocą masy cząsteczkowej — w granicach 10^6 — 6×10^6 . Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetazowe opisywane są jako twory owalne (globularne) o wymiarach 8 — 27 nm [77 – 80]. W ich budowie można wyróżnić rdzeń lipidowy, w którym zasocjowane są hydrofobowe odcinki łańcuchów polipeptydowych syntetaz. Na zewnątrz znajdują się hydrofilowe funkcjonalne regiony enzymów rozmieszczone w sposób umożliwiający łatwy dostęp substratów. Odcinki łańcuchów polipeptydowych o oddziaływaniu elektrododatnim znajdują się w miejscach odległych od domen katalitycznych [8]. Opublikowane zostały fotografie z mikroskopu elektronowego przedstawiające twory o budowie heksamerycznej [79] i oktamerycznej [78] oraz owalne i prostokątne [77, 80] jako kompleksy syntetazowe, jednak brak jest przekonujących dowodów na to, że przedstawione agregaty są rzeczywiście skompleksowanymi syntetazami [9]. Hipotetyczny przekrój HMWSC sporządzony na podstawie sugestii Deutschera [8] oraz innych autorów [24, 30, 37, 81] przedstawiony jest na rycinie 1.

Tabela 2

Syntetazy aminoacylo-tRNA wykryte w składzie wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych. Symbole literowe wskazują aminokwasy, dla których specyficzne syntetazy znajdują się w kompleksie

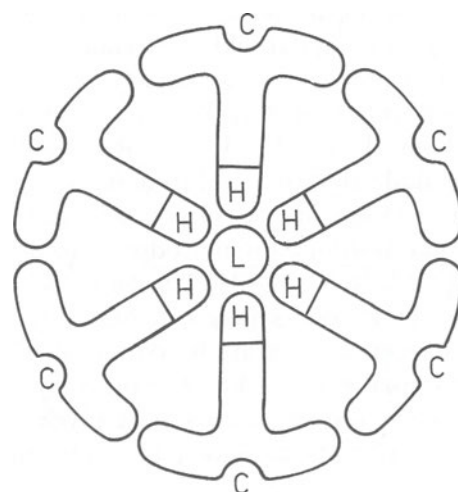
L.P.	Pochodzenie HMWSC	Czystość preparatu	Wielkość HMWSC	Syntetazy aminoacylo-tRNA	Piśmiennictwo
1	Embriony myszy	PS		RDQEILKMPV	50
2	Wątroba myszy	PS		RDQEILKMPV	50
3	" "	PS		ARDNQGHILKMFPSTYV	51, 52
4	Wątroba szczura	PS		ARDQEGHILKMFPSTWYV	53
5	" "	PS		RDCÉLKMFPWV	54
6	" "	PO	24 S	RQEILKMP	20
7	" "	PO		RDQEILKMP	16
8	" "	PO	18 S	RQILKM	42
9	" "	PS		RDQEG L K M F P S T Y	55
10	" "	PS		QILKM	56
11	" "		18 S	ARDNCQEILKMFPWYV	57
12	" "	PO	12 S	RK	19, 58, 59, 76
13	" "	PO	24 S	RQEILKM	60
14	" "	PO		RILKM	61
15	Gruzoł mleczny szczura	PO	3x10 ⁶ Da	RCQILKMV	62
16	Mięsień szkieł. szczura	PS		RCQEILKMPV	63
17	Tarczyca świni	PS		RDNCEHILKMFPSTYV	64
18	Wątroba owcy	PO	10 ⁶ Da	RQEILKM	28, 45-47, 65, 66
19	" "	PO	6x10 ⁶ Da	RQEILKM	40
20	Mózg wołu		2x10 ⁶ Da	RDNQELKPV	67, 68
21	Mózg cielęcia	PS		ARDNQEGHILKMFPSTYV	49
22	Łożysko ludzkie	PO	17-21 S	RQEILKM	48
23	Embriony kurze	PS		RDQEILKMPV	50
24	Komórki białacz. Frienda	PS		RDQEILKMP	50
25	Śledziona owcy	PO	10 ⁶ Da	RQEILKM	47
26	Komórki jajnika chomika	PS		RDCQEHLKMPTV	69
27	" "	PS		RDCQEILKMFPV	70
28	" "	PO	1,2x10 ⁶ Da	RDQEILKMP	71
29	Wątroba królika	PO	10 ⁶ Da	RQEILKM	21, 32, 39, 47
30	" "	PO	1,1x10 ⁶ Da	RDQEILKM	72
31	" "	PS		RDNCQEILKMFPWYV	44
32	Komórka HeLa	PS		RDQEILKMPV	50
33	Retikulocyty królika	PO	16 S	RILKM	73
34	" "	PS		RDQEILKMPV	50
35	" "	PO	10 ⁶ Da	RQEILKM	47, 74
36	Komórki raka wątroby Yoshida	PO	24 S	RDQEILKMP	75
37	Komórki erytroleukemiczne myszy	PO	25 S	RDQEILKMP	77

W tabeli ujęto tylko te pomiary, w których oznaczano co najmniej 17 syntetaz aminoacylo-tRNA. PS - preparat surowy, PO - preparat oczyszczony.

Szczególną rolę w utrzymaniu struktury kompleksu przypisuje się lipidom [8, 17, 39–41, 60], które prawdopodobnie wiążą się z hydrofobowymi regionami łańcuchów polipeptydowych syntetaz, jak również zasadowym odcinkom N-końcowej części polipeptydu, wykazującym powinowactwo do ujemnie naładowanych cząsteczek [8, 18, 24].

Brak jest jednomyślności odnośnie ilości syntetaz aminoacylo-tRNA znajdujących się w natywnych HMWSC. W kompleksach nie oczyszczonych znajdowano więcej enzymów niż w kompleksach wysoko oczyszczonych (patrz tabela 2). Niektórzy autorzy dzielą syntetazy na trzy klasy w zależności od występowania ich w składzie HMWSC [7, 10, 37]. Do klasy I-szej zaliczają enzymy specyficzne dla następujących aminokwasów: Arg, Asp, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, które to enzymy można uważać za „kompleksotwórcze”, ponieważ powszechnie występują w kompleksach syntetazowych wyższych zwię-

Ryc. 1. Hipotetyczny przekrój przez wielkocząsteczkowy kompleks syntetazowy. H – regiony hydrofobowe, C – centra aktywne syntetaz aminoacylo-tRNA, L – lipidy. (Sporządzono na podstawie sugestii [8, 24, 30, 37, 80]).



rząt. Enzymy te znaleziono w kompleksach, które udało się wyizolować i oczyścić (patrz tabela 2).

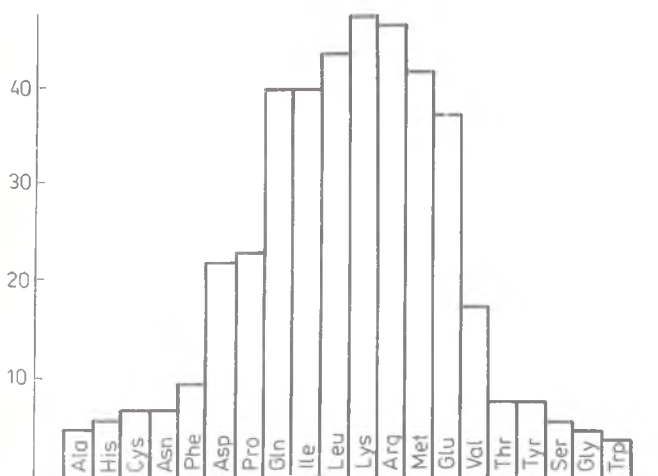
Do klasy 2-giej zaliczane są enzymy rzadziej znajdowane w kompleksach, lub tworzące kompleksy nietypowe, zawierające na przykład oligomeryczne postacie jednego enzymu (kompleksy homotypowe) [81]. Do klasy trzeciej zaliczane są syntetazy, które bardzo rzadko występują w kompleksach, lub może lepiej należałoby powiedzieć, których do tej pory nie udało się znaleźć w preparatach oczyszczonych kompleksów. Są w tej klasie enzymy specyficzne dla: Ala, Asn, Gly, His, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr.

Częstość występowania poszczególnych syntetaz w kompleksach otrzymanych z różnych organizmów może być zilustrowana za pomocą histogramu, tak jak przedstawiono na rycinie 2.

Porównanie histogramu z tabelą 2 wskazuje, że 7 — 9 syntetaz, które znajdowano w oczyszczonych kompleksach syntetazowych, to właśnie syntetazy, które najczęściej wykrywano w surowych preparatach HMWSC. Różna trwałość enzymów tworzących kompleksy może być przyczyną tego, że w oczyszczonych preparatach HMWSC można znaleźć jedynie syntetazy mocno związane ze składnikami kompleksów. Dane doświadczalne wskazują, że niektóre enzymy są szczególnie słabo związane w HMWSC, od którego mogą być łatwo oddysocjowane nawet w czasie homogenizacji [82], w trakcie wirowania w gradiencie stężenia sacharozy [20], lub podczas chromatografii hydrofobowej [17, 20].

Największe wysoko oczyszczone kompleksy, zawierające 9 syntetaz, otrzymali C i r a k o g l u i współautorzy [16] z wątroby szczura oraz M i r a n d e i współautorzy [71] z hodowli komórek jajnika chomika. Kompleksy te składały się z 12 rodzajów polipeptydów, z których 9 było syntetazami wymienionymi wyżej jako syntetazy klasy 1-szej. Najluźniej związa-

Ryc. 2. Histogram obrazujący częstość wykrywania poszczególnych syntetaz aminoacylo-tRNA w wielkocząsteczkowych kompleksach syntetazowych różnych organizmów zwierzęcych. Uwzględniono badania, w których oznaczano co najmniej 17 syntetaz (patrz Tab. 2).



nym w kompleksie enzymem była syntetaza proliło-tRNA. Znaczenie trzech pozostałych polipeptydów nie było znane. Badając relacje ilościowe enzymów w kompleksach stwierdzono, że syntetazy aminoacylo-tRNA występują w ilości jedna lub dwie cząsteczki na kompleks [42, 65].

Uważa się, że niektóre syntetazy wyższych zwierząt występują *in vivo* jedynie w postaci wielkocząsteczkowych kompleksów (np. syntetaza lizylo-tRNA wątroby szczura) [16], inne mogą występować równolegle jako wolne i skompleksowane. Niektórzy autorzy [39, 46, 83] sugerują, że syntetazy wolne występujące obok skompleksowanych są produktami proteolizy tych ostatnich.

Jak wynika z tabeli 2, wszystkie syntetazy aminoacylo-tRNA wykryto w wielkocząsteczkowych kompleksach syntetazowych wyższych zwierząt. Należy uznać za znaczące sugestie autorów [8, 9, 63, 73, 82], które utrzymują, że natywne kompleksy są znacznie większe i bogatsze w enzymy niż te kompleksy, które udało się wyizolować i oczyścić.

III-2.2. Obecność innych niż syntetazy aminoacylo-tRNA składników w HMWSC

W tabelach 3 i 4 podane są białkowe i niebiałkowe składniki HMWSC występujące obok syntetaz aminoacylo-tRNA. Wśród składników białkowych, w kompleksach znaleziono translacyjne czynniki inicjacji i elongacji, enzymy modyfikujące kwasy nukleinowe i białka, w tym kinazy białkowe. Wśród niebiałkowych składników znaleziono znaczne ilości lipidów, RNA, a także cukry (związane z łańcuchami polipeptydowymi syntetaz). Lipidy, które znaleziono w HMWSC, to cholesterol wolny i zestryfikowany oraz fosfolipidy. Przypuszcza się, że oddziaływanie hydrofobowych regionów łańcuchów polipeptydowych syntetaz z lipidami odgrywa rolę w utrzymaniu struktury HMWSC oraz wpływa na trwałość budujących kompleks enzymów [8, 41, 97]. Interesujące jest, że usunięcie lipidów destabilizuje aktywność skompleksowanych syntetaz, nie powoduje jednak zniszczenia kompleksu [41].

III-3. Własności HMWSC

III-3.1. Własności katalityczne skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA

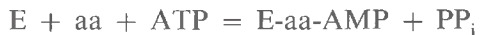
Reakcje aminoacylacji katalizowane przez obecne w kompleksie syntetazy odbywają się równocześnie i niezależnie [39, 60]. Jest dość zaskakujące, że reakcje te nie oddziałują wzajemnie na siebie. Wykazano za pomocą badań kinetycznych, że wolne i skompleksowane syntetazy mają podobne powinowactwo do substratów [39, 60, 83].

Dokładniejsze badania porównawcze własności katalitycznych syntetaz wolnych i skompleksowanych pozwoliły jednak znaleźć pewne różnice, które mogą mieć znaczenie funkcjonalne. W badaniach *in vitro* wykazano, że aminoacylacja w obecności wolnej syntetazy lizylo-tRNA z wątroby szczura jest dwa razy wyższa niż w obecności enzymu skompleksowanego [98], zaś synteza diadenozynotetrafosforanu jest sześć razy wyższa [99]. Skompleksowana syntetaza leucylo-tRNA komórek jajnika chomika chińskiego wykazuje wyższą wrażliwość na hamujące działanie pirofosforanu niż enzym wolny [100]. Badając parametry kinetyczne dla wszystkich trzech substratów wolnej i skompleksowanej syntetazy lizylo-tRNA z wątroby szczura (dla tRNA, lizyny i ATP) stwierdzono, że szybkość maksymalna dla enzymu wolnego jest nieznacznie lecz znamienne wyższa [17].

Przytoczone wyżej spostrzeżenia świadczą, że funkcja katalityczna syntetaz może być modulowana poprzez tworzenie kompleksów. Jednak trzeba zaznaczyć, że miałyby to znaczenie regulacyjne jedynie wówczas, kiedy w warunkach *in vivo* zachodziłaby interkonwersja pomiędzy enzymami wolnymi a skompleksowanymi. Takiego zjawiska dotychczas nie stwierdzono.

III-3.2. Diadenozynotetrafosforan (Ap₄A) a HMWSC

Jak wspomniano we wstępie, niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA, tak pro- jak i eukariotyczne, mianowicie: lizynowa, prolinowa, alaninowa, fenyloalaninowa i serynowa [101 – 104] są zdolne do katalizowania syntezy diadenozynotetrafosforanu (diadenozyno-5',5''' -Pⁱ, P⁴- tetrafosforan, Ap₄A). Synteza odbywa się wg następującego mechanizmu [3, 103]:



Sugeruje się, że ten niezwykle dinukleotyd bierze udział w inicjacji replikacji DNA [1, 3, 89]. Wewnątrzkomórkowe stężenie Ap₄A jest skorelowane z aktywnością proliferacyjną komórek [102]. Postuluje się udział tego związku w zjawiskach szoku komórkowego [105]. Należy dodać, że poziom komórkowego Ap₄A nie zależy jedynie od poziomu jego syntezy, lecz również od aktywności hydrolaz [3, 106, 107], katalizujących jego rozpad.

Dotychczas zgromadzono jedynie fragmentaryczne informacje na temat zależności występowania syn-

Tabela 3

Biologicznie aktywne białka obecne w wielkocząsteczkowych kompleksach syntetazowych obok syntetaz aminoacylo-tRNA

Aktywne białko	Pochodzenie kompleksu	Piśmiennictwo
Translacyjne czynniki elongacji	Łożysko ludzkie	48
	Komórki raka wysiękowego Ehrlicha	84
	Wątroba szczura	85
	Retikulocyty królika	31
Translacyjne czynniki inicjacji	Retikulocyty królika	31
Acetylotransferaza petydylowa	Wątroba szczura	55
Metylotransferaza tRNA	Leukocyty ludzkie i mysie	86,87
Sulfotransferaza tRNA	Wątroba szczura	88
Rybonukleaza	Gruzoł tarczowy świni	64
Polimeraza DNA alfa	Komórki HeLa	89
Fosfatazy białkowe	Wątroba szczura	61
Kinaza białkowa	Wątroba szczura	61
Kinaza kazeinowa I	Retikulocyty królika	74
Pirofosfataza nieorganiczna	Wątroba szczura i królika	43

tetaz aminoacylo-tRNA w stanie skompleksowanym, a ich rolą w syntezie Ap_4A . Wolna syntetaza lizylo-tRNA jest 6 razy bardziej aktywna w syntezie Ap_4A niż syntetaza skompleksowana, przy tym obserwuje się zwiększoną stymulację syntezy tego związku przez Zn^{2+} w obecności enzymu wolnego [99]. Postuluje się odmienny mechanizm syntezy Ap_4A przez enzymy wolne i skompleksowane [99, 108].

III-3.3. Fosforylacja-defosforylacja składników HMWSC

Modulowanie aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA na drodze fosforylacji-defosforylacji było postulowane wielokrotnie [61, 74, 90, 109, 110]. W ostatnich latach udowodniono, że rzeczywiście możliwa jest fosforylacja syntetaz tak bakteryjnych [111], jak wolnych syntetaz zwierzęcych

[109, 110, 112, 113] oraz syntetaz skompleksowanych [43, 61, 74, 90]. Stwierdzono, że fosforylacja skompleksowanych syntetaz może zachodzić *in vitro* [74, 90] i *in vivo* [61] i prowadzi do znacznej utraty własności katalitycznych tych enzymów. Są znane również doniesienia, że niektóre syntetazy aminoacylo-tRNA wykazują wyższą aktywność po ufosforylowaniu [109].

Stwierdzono fosforylację seryny i w niewielkim stopniu treoniny w skompleksowanych syntetazach glutamilo-, izoleucylo-, metionilo- i lizylo-tRNA [74]. Postuluje się obecność kinazy kazeinowej I jako stałego składnika natywnych kompleksów syntetazowych biorącego udział w regulacji aktywności enzymów na drodze fosforylacji [74, 90]. Wykazano, że fosforylacja skompleksowanych syntetaz odbywa się przy udziale cyklicznego AMP, co wskazuje na możliwość hormonalnej regulacji tego procesu [90]. Należy nadmienić, że ogłoszono również wyniki badań, w których

Tabela 4

Składniki niebiałkowe wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych

Pochodzenie kompleksu	Składnik niebiałkowy kompleksu *	Piśmiennictwo
Wątroba szczura	Cholesterol i estry cholesterolu (5%)	20
	Kwas cholesterolo-14-metylo-heksadekanowy(N.O.)	91
	Estry cholesterolu (20 — 25%)	92
	Glikolipidy (N.O.)	55
	Cukry (14%)	58
	Cukry (N.O.)	93
	Cukry (0,7%)	59
	RNA (N.O.)	84
	tRNA (0,2%)	20
tRNA (N.O.)	53	
tRNA (3%)	55	
Gruzoł mleczny szczura	Cholesterol (N.O.)	62
	RNA (4%)	62
Wątroba myszy	RNA (7,2%)	94
Retikulocyty królika	RNA wysokocząsteczkowy (N.O.)	95
	Lipidy (lipidy obojętne – ok. 0,5%, fosfolipidy – ok. 0,06% P)	73
Komórki raka wosłkowego Ehrlicha	RNA wysokocząsteczkowy (N.O.)	84
Komórki jajnika chomika	RNA (N.O.)	70
Fibroblasty myszy	tRNA (N.O.)	96

* W nawiasach podano procentową zawartość składnika:
N.O. — nie oznaczano

nie potwierdzono fosforylacji syntetaz w komórkach jajnika chomika chińskiego i *HeLa* [71].

III-4. Rola biologiczna HMWSC

Znaczenie funkcjonalne wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych jest jeszcze mniej zrozumiałe niż ich strukturalna organizacja. Jeśli natywne kompleksy składają się z 9 syntetaz aminoacylo-tRNA, to brak jest jakiegokolwiek korelacji pomiędzy występowaniem w kompleksie danych syntetaz, a biologicznymi lub chemicznymi właściwościami aktywowanych przez nie aminokwasów.

Niektóre enzymy i inne białka uważane do tej pory za rozpuszczalne, są w rzeczywistości połączone w komórkach eukariontów w wieloenzymatyczne agregaty lub są zasocjowane ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. Podobnie aparat syntetyzujący białka jest, prawdopodobnie, w organizmach wyższych zwierząt połączony ze strukturami szkieletu komórkowego [114, 115]. Z tych względów rozpatrywanie procesu biosyntezy białka w wymiarze supramolekularnym jest, jak się wydaje, bliższe rzeczywistości. Połączenie syntetaz aminoacylo-tRNA w kompleks zasocjowany ze strukturami wewnątrzkomórkowymi może usprawnić przekazywanie powstających aminoacylo-tRNA z syntetyzujących je enzymów na czynniki inicjacji, na rybosomy itd. Wydaje się, że pojawienie się w toku ewolucji wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych stanowi przejaw usprawnienia procesu biosyntezy białka. E l s k a j a i współautorzy [43] sugerują, że istnienie HMWSC ułatwia aminoacylację i umożliwia regulację tego procesu dzięki obecności w kompleksach takich składników jak pirofosfataza nieorganiczna (usuwanie pirofosforanu) i kinaza białkowa (regulacja aktywności na drodze fosforylacji).

III-4.1. HMWSC w tkankach i narządach

Występowanie syntetaz aminoacylo-tRNA w tkankach i narządach różnych zwierząt nie jest jednakowe. Przeważnie jest ono skorelowane z szybkością rozrostu komórkowego i z aktywnością metaboliczną tkanki. Przykładowo, znaczną aktywność syntetazy arginylo-tRNA znaleziono w tkankach i narządach szczura o wysokiej aktywności mitotycznej (wątroba, kora nadnerczy, grasica), zaś niewielką w tkankach i narządach o niskim wskaźniku mitotycznym (tkanka tłuszczowa, płuca, serce, mózg) [116]. Podobnie u wołu stwierdzono, że aktywności syntetaz mózgowych są znacznie niższe niż wątrobowych [68].

Niewiele wyników zgromadzono na temat specyficzności narządowej i tkankowej wysokocząsteczkowych kompleksów syntetazowych. Z mózgu wołu wyizolowano HMWSC o masie 2×10^3 kDa, zawierający 9 syntetaz aminoacylo-tRNA [68]. Na uwagę za-

sługuje nieco odmienny skład enzymatyczny kompleksu mózgowego w porównaniu z kompleksami wątrobowymi (patrz tabela 2). Jednakże trudno wnioskować o specyficzności narządowej na podstawie zauważonych różnic, ponieważ w badaniach posługiwano się nie jednakową metodyką. W badaniach prowadzonych na oczyszczonych kompleksach syntetazowych otrzymanych z różnych narządów owcy i królika wykazano istnienie różnic gatunkowych, podczas gdy w obrębie tego samego gatunku kompleksy były identyczne [47]. Nie stwierdzono różnic w budowie kompleksów pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami [9, 27].

Interesującą sugestię wysunęli V a d e b o n c o e u r i L a p o i n t e [67] na temat roli HMWSC w mózgu. Autorzy sugerują udział skompleksowanej syntetazy glutaminylo-tRNA i glutaminianu w neurotransmisji w obszarze synaptycznym. Sugestia ta ma jednak dość spekulatywny charakter.

III-4.2. Większa trwałość skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA

Sprawą, która zainteresowała badaczy, jest zmniejszona trwałość enzymów wbudowanych w kompleks. Zgromadzono wiele dowodów na to, że skompleksowane syntetazy aminoacylo-tRNA wykazują mniejszą termowrażliwość w porównaniu z enzymami wolnymi [60, 97, 117 – 122]. Przypuszcza się, że jest to spowodowane wzajemnymi oddziaływaniami łańcuchów polipeptydowych skompleksowanych syntetaz oraz wpływem niebiałkowych składników kompleksów [60, 97]. Zmniejszoną podatność syntetaz skompleksowanych na inaktywację termiczną wykazano dla syntetazy leucylo-tRNA z mięśnia sercowego świni [122] i z komórek chomika chińskiego [118], jak również dla syntetazy lizylo-tRNA z wątroby szczura [117] i syntetazy arginylo-tRNA z wątroby królika [97]. Podobnie, w badaniach prowadzonych na termowrażliwych mutantach komórek chomika, stwierdzono zmniejszoną termowrażliwość skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA w porównaniu z enzymami wolnymi [119–121]. Istnieją także doniesienia o braku różnic w termowrażliwości skompleksowanych i wolnych syntetaz [43] oraz o zwiększonej wrażliwości na temperaturę skompleksowanej syntetazy arginylo-tRNA z wątroby szczura [83].

Liczni badacze podnoszą sprawę wrażliwości HMWSC na proteolizę wewnątrzkomórkową, który to proces może być odpowiedzialny za pojawienie się syntetaz wolnych obok skompleksowanych [15, 32, 45, 47, 60, 123] oraz za unieczynnianie enzymów [124]. Wykazano, że skompleksowane syntetazy są bardziej odporne na działanie endogennych proteaz niż enzymy wolne [46, 83, 124]. Na tej podstawie przypuszcza się, że znaczenie biologiczne tworzenia przez wyższe organizmy kompleksów syntetazowych polega na ochronie syntetaz przed wewnątrzkomórkową proteolizą

[46, 83, 124]. Pośrednim dowodem może być fakt znalezienia w skompleksowanych syntetazach charakterystycznych sekwencji aminokwasowych PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) [124], które stanowią sygnał dla działania wewnątrzkomórkowych proteaz. Prawdopodobne jest, że sekwencje te są maskowane dzięki tworzeniu HMWSC [124].

III-4.3. Syntetazy skompleksowane wykorzystują aminokwasy zewnątrzkomórkowe

W badaniach prowadzonych z użyciem mutantów komórek chomika chińskiego [120], w których zauważono dodatnią korelację pomiędzy nie występowaniem niektórych syntetaz aminoacylo-tRNA w składzie HMWSC a zwiększoną termowrażliwością komórek, stwierdzono, że wysokie stężenia aminokwasów w środowisku (aminokwasów będących substratami dla badanych syntetaz) wykazywały działanie ochronne w stosunku do mutantów. Obserwacje powyższe pozwoliły autorom na sformułowanie hipotezy, że skompleksowane syntetazy aminoacylo-tRNA wykorzystują przede wszystkim aminokwasy z przestrzeni pozakomórkowej, podczas gdy syntetazy wolne wykorzystują aminokwasy wewnątrzkomórkowe. Trzeba zaznaczyć, że istnieją dowody na to, że zewnątrzkomórkowe aminokwasy mogą być zużywane do biosyntezy białka bez mieszania się z pulą aminokwasów wewnątrzkomórkowych [118, 125].

III-4.4. Syntetazy skompleksowane zwiększają wierność translacji

Spośród teorii tłumaczących znaczenie funkcjonalne HMWSC, na uwagę zasługuje hipoteza Ryazanowa [126] przypisująca kompleksom zwiększanie wierności translacji. Hipoteza opiera się na spostrzeżeniu, że tRNA specyficzne dla następujących aminokwasów: Arg, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys, którym odpowiadają syntetazy aminoacylo-tRNA zawsze występujące w składzie HMWSC, mają na pierwszej pozycji w antykodonie zmodyfikowany uracyl. Ponieważ w składzie HMWSC znajdują się także enzymy modyfikujące tRNA (patrz tabela 3), można przypuszczać, że równocześnie z aminoacylacją lub wcześniej dochodzi do modyfikacji uracylu, co zapobiega połączeniu z nieodpowiednim kodonem mRNA. Autor hipotezy podkreśla, że niezależnie od innych możliwych funkcji HMWSC, zgrupowanie syntetaz i enzymów modyfikujących tRNA w jednym kompleksie zabezpiecza komórkę przed błędnym odczytaniem kodu genetycznego.

III-4.5. HMWSC w patologii

Dążąc do wyjaśnienia roli biologicznej skom-

pleksowanych postaci syntetaz aminoacylo-tRNA, podjęto badania na regenerujących narządach oraz na narządach i tkankach zmienionych patologicznie. Zgromadzono szereg informacji, z których trudno jest, jak do tej pory, wyciągnąć jednoznaczne wnioski.

W badaniach prowadzonych na regenerującej wątrobie szczura [127] zauważono wzrost aktywności skompleksowanych syntetaz lizylo- i glutamylo-tRNA jak również wyraźne zwiększenie zawartości fosfolipidów w kompleksach, w porównaniu z narządem prawidłowym. W podobnych badaniach [128] wykazano zwiększenie aktywności skompleksowanej syntetazy prolilo-tRNA.

Porównując fibroblasty mysie transformowane wirusem mięsaka mysiego z komórkami zdrowymi [96], stwierdzono wzrost aktywności skompleksowanych syntetaz w komórkach transformowanych. W nowotworze wątroby szczurów stwierdzono obecność kilku rodzajów wielkocząsteczkowych kompleksów syntetazowych oraz zwiększoną aktywność skompleksowanej syntetazy prolilo-tRNA [128].

Z komórek wysiękowego nowotworu wątroby szczura Yoshida AH 130 (*Yoshida ascites hepatoma AH 130*) otrzymano HMWSC o stałej sedymentacji 24 S, zawierający 9 syntetaz aminoacylo-tRNA, w tym trwale związaną syntetazę prolilo-tRNA [75]. Syntetazy obecne w powyższym kompleksie wykazywały zwiększoną odporność na endogenną proteolizę w porównaniu z enzymami kompleksu otrzymanego w identyczny sposób z komórek zdrowych.

W badaniach nad doświadczalnym zawałem serca u królików stwierdzono, że w chorobie tej dochodzi do zmian aktywności skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA w wątrobie: wzrasta aktywność syntetazy leucylowej i lizylowej, maleje natomiast serylowej i glicylowej [129]. Obserwowano ponadto zmniejszenie zawartości fosfolipidów w kompleksie syntetazowym z wątroby.

W badaniach prowadzonych na mózgu królika z wrodzoną drżączką porażenną, wśród skompleksowanych syntetaz aminoacylo-tRNA, obok glutaminylowej, lizylowej i asparaginylowej znaleziono także syntetazę glicylową, na ogół nie spotykaną w składzie HMWSC [130].

W zapaleniu wielomięśniowym na tle autoalergicznym (polymyositis), stwierdzono obecność przeciwciała anti-Jol, skierowanego przeciwko syntetazie histydylo-tRNA [131, 132]. Badania wykazały, że antygen znajduje się wyłącznie w cytozolu [133]. W schorzeniu wykryto również przeciwciała przeciwko syntetazom treonylo-tRNA [134] i alanylo-tRNA [135]. Interesujące jest, że autoprzeciwciała polymyositis skierowane są przeciwko syntetazom aminoacylo-tRNA należącym do klasy 3-ciej, a więc przeciwko tym, które rzadko występują w kompleksach syntetazowych. Przypuszcza się [10], że fakt ten ma związek z rozpuszczalną naturą tych enzymów, co sugeruje możliwość opuszczania przez nie zmienio-

nych chorobowo komórek. Syntetazy klasy 1-szej, związane w wielkocząsteczkowych kompleksach, nie mogą wydostawać się do przestrzeni pozakomórkowej.

IV. Uwagi końcowe

Występowanie wielkocząsteczkowych kompleksów syntetaz aminoacylo-tRNA w organizmach zwierzęcych jest najbardziej uderzającą różnicą pomiędzy syntetazami organizmów pro- i eukariotycznych. W toku ewolucji wiele spośród syntetaz aminoacylo-tRNA zyskało dodatkowy odcinek łańcucha polipeptydowego, nie zmieniający ich własności katalitycznych, a nadający im zdolność wiązania się z systemem błon wewnątrzkomórkowych, jak to ma miejsce u drożdży, oraz zdolność do tworzenia wielkocząsteczkowych wieloenzymatycznych agregatów, co stwierdzono u wyższych zwierząt. Badania *in vitro* wskazują, że tworzenie kompleksów modeluje niektóre własności budujących je syntetaz aminoacylo-tRNA, zmienia ich termowrażliwość, zmniejsza podatność na proteolizę.

Mimo, że od czasu wykrycia skompleksowanych postaci syntetaz aminoacylo-tRNA upłynęło już około 20 lat, wielu spraw odnoszących się do ich występowania, budowy i funkcji jeszcze nie wyjaśniono. Nie wiadomo, czy kompleksy syntetazowe występują w świecie roślinnym oraz u niższych zwierząt. Nie wiadomo ile syntetaz buduje natywne kompleksy, nie jest jasna ich rola biologiczna. Największy dotychczas wyizolowany i oczyszczony kompleks zawierał 9 syntetaz, lecz wiele przesłanek przemawia za tym, że funkcjonujące w komórkach wyższych zwierząt kompleksy są bardziej rozbudowane i zawierają więcej enzymów. Wielkocząsteczkowe kompleksy syntetazowe znaleziono u wyższych zwierząt, nie wiadomo jednak w jakim stadium filogenetycznego rozwoju organizmów eukariotycznych pojawiają się.

Powstawanie kompleksów jest wyrazem dodatkowej supramolekularnej organizacji wewnątrzkomórkowych procesów, co wydaje się szczególnie ważne w odniesieniu do syntetaz aminoacylo-tRNA, enzymów, które obok swej zasadniczej funkcji wiązania aminokwasów do tRNA, katalizują również syntezę Ap_4A , związku będącego ogniwem łączącym syntezę białka z syntezą DNA.

* * *

Autor wyraża wdzięczność prof. dr Tomaszowi Borkowskiemu za cenne uwagi podczas przygotowywania niniejszego artykułu oraz za krytyczną ocenę tekstu.

Artykuł otrzymano 22 maja 1989r.
Zaakceptowano do druku 12 marca 1990r.

Piśmiennictwo

1. Zamecnik P. C., Rapaport E., Baril E. F., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1791 – 1794.
2. Hilderman R. H., Ortwerth B. J., (1987), *Biochemistry*, **26**, 1586 – 1591.
3. Zamecnik P. C., (1983), *Analyt. Biochem.*, **134**, 1 – 10.
4. Varshavsky A., (1983), *Cell*, **34**, 711 – 712.
5. Rapaport E., Remy P., Kleinkauf H., Vater J., Zamecnik P. C., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7891 – 7895.
6. Dang C. V., Johnson D. L., Yang D. C. H., (1982), *FEBS Lett.*, **142**, 1 – 6.
7. Dang C. V., Dang C. V., (1983), *Biosci. Rep.*, **3**, 527 – 538.
8. Deutscher M. P., (1984), *J. Cell Biol.*, **99**, 373 – 377.
9. Dang C. V., Dang C. V., (1984), *Mol. Cell. Biochem.*, **63**, 131–136.
10. Dang C. V., Dang C. V., (1986), *Biochem. J.*, **239**, 249–255.
11. Schimmel P. R., Söll D., (1979), *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 601 – 648.
12. Jasin M., Regan L., Schimmel P., (1984), *Cell*, **36**, 1089 – 1095.
13. Schimmel P., (1987), *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 125 – 158.
14. Mirande M., LeCorre D., Louvard D., Reggio H., Pailliez J. P., Waller J. P., (1985), *Expl. Cell. Res.*, **156**, 91 – 102.
15. Deutscher M. P., Ni R. C., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6003 – 6006.
16. Cirakoglu B., Waller J. P., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 173 – 179.
17. Johnson D. L., Dang C. V., Yang D. C. H., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 4362 – 4366.
18. Vellekamp G., Deutscher M. P., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 9927 – 9930.
19. Dang C. V., Gliniski R. L., Gainey P. C., Hilderman R. H., (1982), *Biochemistry*, **21**, 1959 – 1966.
20. Dang C. V., Yang D. C. H., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5350 – 5356.
21. Mirande M., Cirakoglu B., Waller J. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11056 – 11063.
22. Charlier J., Gerlo E., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3171 – 3178.
23. Joachimiak A., Barciszewski J., (1980), *FEBS Lett.*, **119**, 201 – 211.
24. Cirakoglu B., Waller J. P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **151**, 101 – 110.
25. Lazard M., Mirande M., Waller J. P., (1985), *Biochemistry*, **24**, 5099 – 5106.
26. Kern D., Potier S., Lapointe J., Boulanger Y., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **607**, 65 – 80.
27. Dang C. V., Yang D. C. H., Pollard T. D., (1983), *J. Cell Biol.*, **96**, 1138 – 1147.
28. Kellermann O., Brevet A., Tonetti H., Waller J. P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 205 – 210.
29. Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P., (1982), *FEBS Lett.*, **144**, 149 – 153.
30. Cirakoglu B., Waller J. P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **149**, 353 – 361.
31. Hradec J., Dusek Z., (1980), *Mol. Biol. Rep.*, **6**, 245 – 248.
32. Mirande M., Pailliez J. P., Schwencke J., Waller J. P., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **747**, 71– 77.
33. Pailliez J. P., Waller J. P., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 15491 – 15496.
34. Fedorov A. N., Alzhanova A. T., Ovchinnikov L. P., (1985), *Biochimija*, **50**, 1639 – 1645.
35. Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P., (1987), *Eur. J. Biochem.*, **169**, 185 – 191.
36. Spirin A. S., (1978), *FEBS Lett.*, **88**, 15 – 17.
37. Cirakoglu B., Mirande M., Waller J. P., (1985), *FEBS Lett.*, **183**, 185 – 190.

38. Lorber B., Mejdoub H., Reinbolt J., Boulanger Y., Giege R., (1988), *Eur. J. Biochem.*, **174**, 155 – 161.
39. Mirande M., Cirakoglu B., Waller J. P., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **131**, 163 – 170.
40. Brevet A., Kellermann O., Tonetti H., Waller J. P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 551 – 558.
41. Sihag R. K., Deutscher M. P., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 11846 – 11850.
42. Johnson D. L., Yang D. C. H., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4059 – 4062.
43. Elskaja A. W., Iwanow L. L., Jaremczuk A. D., Stapulenis R. R., Jarmolenko W. W., Tamuljawičius A. I., Bułdakowa O. W., Kowalenko M. I., (1986), *Ukr. Biochim. Žurn.*, **58**, 15 – 22.
44. Berbeć H., Paszkowska A., Borkowski T., (1984), *Mol. Cell. Biochem.*, **62**, 149 – 155.
45. Kellermann O., Viel C., Waller J. P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **88**, 197 – 204.
46. Kellermann O., Brevet A., Tonetti H., Waller J. P., (1979), *Eur. J. Biochem.*, **99**, 541–550.
47. Kellermann O., Tonetti H., Brevet A., Mirande M., Pailliez J. P., Waller J. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11041 – 11049.
48. Denney R. M., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 157 – 167.
49. Charęziński M., Borkowski T., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **207**, 241 – 247.
50. Ussery M. A., Tanaka W. K., Hardesty B., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **72**, 491 – 500.
51. Berg B. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 164 – 172.
52. Berg B. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **395**, 173 – 178.
53. Bandyopadhyay A. K., Deutscher M. P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **60**, 113 – 122.
54. Bont W. S., Geels J., Rezelman G., (1976), *Mol. Biol. Rep.*, **2**, 379 – 384.
55. Saxholm H. J. K., Pitot H. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 386 – 399.
56. Vennegoor C. J. G. M., Stols A. L. H., Bloemendal H., (1972), *J. Mol. Biol.*, **65**, 375 – 378.
57. Vennegoor C., Bloemendal H., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 462 – 473.
58. Glinski R. L., Gainey P. C., Mawhinney T. P., Hilderman R. H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 1052–1061.
59. Dang C. V., Mawhinney T. P., Hilderman R. H., (1982), *Biochemistry*, **21**, 4891 – 4895.
60. Dang C. V., Ferguson B., Burke D. J., Garcia V., Yang D. C. H., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 319 – 326.
61. Damuni Z., Caudwell F. B., Cohen P., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **129**, 57 – 65.
62. Hele P., Herbert L., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 311 – 321.
63. Arbeeny C. M., Briden K. L., Stirewalt W. S., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **564**, 191 – 201.
64. Vellekamp G. J., Kull F. J., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **118**, 261 – 269.
65. Mirande M., Kellermann O., Waller J. P., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11049 – 11055.
66. Mirande M., Gache Y., La Corre D., Waller J. P., (1982), *EMBO J.*, **1**, 733 – 736.
67. Vadeboncoeur C., Lapointe J., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **109**, 581 – 587.
68. Vadeboncoeur C., Lapointe J., (1980), *Brain Res.*, **188**, 129 – 138.
69. Enger M. D., Ritter P. O., Hampel A. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2435 – 2438.
70. Ritter P. O., Enger M. D., Hampel A. E., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **562**, 377 – 385.
71. Mirande M., La Corre D., Waller J. P., (1985), *Eur. J. Biochem.*, **147**, 281 – 289.
72. Wolfson A. D., Motorin Y. A., Orłowski A. F., Gladilin K. L., (1987), *Biochimija*, **52**, 1847 – 1854.
73. Som K., Hardesty B., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 507 – 517.
74. Pendergast A. M., Traugh J. A., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 11769 – 11774.—
75. Perego R., Del Monte U., (1986), *Cell. Biol. Internat. Rep.*, **10**, 477.
76. Goto T., Schweiger A., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 1027 – 1033.
77. Norcum M. T., (1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 15043 – 15051.
78. Gulik A., Orsini G., (1984), *Mol. Biol. Rep.*, **10**, 23 – 30.
79. Harris J. R., (1983), *Micron. Micros. Acta*, **14**, 193 – 205.
80. Godar D. E., Godar D. E., Garcia V., Jacobo A., Aebi U., Yang D. C. H., (1988), *Biochemistry*, **27**, 6921 – 6928.
81. Pan F., Lee H. H., Pai S. H., Yu T. C., Guoo J. Y., Duh G. M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 271 – 283.
82. Walker E. J., Treacy G. B., Jeffrey P. D., (1983), *Biochemistry*, **22**, 1934 – 1941.
83. Vellekamp G., Sihag R. K., Deutscher M. P., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 9843 – 9847.
84. Roberts W. K., Olsen M. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 480 – 492.
85. Smulson M., Lin C. S., Chirikjian J. G., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 458 – 468.
86. Agris P. F., Woolverton D. K., Setzer D., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3857 – 3861.
87. Agris P. F., Playl T., Goldman L., Horton E., Woolverton D., Setzer D., Rodi C., (1983), *Recent Results Cancer Res.*, **84**, 237 – 254.
88. Harris C. L., Martin K., Stewart D., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 657 – 662.
89. Rapaport E., Zamecnik P., Baril E. F., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 838 – 842.
90. Pendergast A. M., Venema R. C., Traugh J. A., (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 5939 – 5942.
91. Hradec J., Dusek Z., (1969), *Biochem. J.*, **115**, 873 – 880.
92. Bandyopadhyay A. K., Deutscher M. P., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 257 – 261.
93. Dignam J. D., Rhodes G. D., Deutscher M. P., (1980), *Biochemistry*, **19**, 4978 – 4984.
94. Berg B. H., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **414**, 93 – 98.
95. Alzhanova A. T., Fedorov A. N., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S., (1980), *FEBS Lett.*, **120**, 225 – 229.
96. Thomas K., Scheets K., Allen S., Hedgcoth C., (1982), *Canad. J. Biochem.*, **60**, 804 – 810.
97. Berbeć H., Paszkowska A., (1989), *Mol. Cell Biochem.*, **86**, 125 – 133.
98. Wahab S. Z., Yang D. C. H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 5286 – 5289.
99. Wahab S. Z., Yang D. C. H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12735 – 12739.
100. Klekamp M., Pahuski E., Hampel A., (1982), *Biochemistry*, **21**, 3513 – 3517.
101. Goerlich O., Foeckler R., Holler E., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **126**, 135 – 142.
102. Hilderman R. H., (1983), *Biochemistry*, **22**, 4353 – 4357.
103. Blanquet S., Plateau P., Brevet A., (1983), *Mol. Cell Biochem.*, **52**, 3 – 11.
104. Jakubowski H., (1983), *Acta Biochim. Polon.*, **30**, 51 – 69.
105. Brevet A., Plateau P., Best-Belpomme M., Blanquet S., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 15566 – 15570.
106. Cameselle J. C., Costas M. J., Gunther S., Sillero A., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 2879 – 2885.
107. Jakubowski H., Guranowski A., (1983), *J. Biol. Chem.*, **258**, 9982 – 9989.
108. Wahab S. Z., Yang D. C. H., (1985), *J. Biol. Chem.*, **260**, 12735 – 12739.
109. Berg B. H., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 152 – 171.
110. Berg B. H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 274 – 287.
111. Wada M., Sekine K., Itikawa H., (1986), *J. Bacteriol.*, **168**, 213 – 220.
112. Gerken S. C., Arfin S. M., (1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 11160 – 11161.
113. Gerken S. C., Andrulis I. L., Arfin S. M., (1986), *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 215 – 217.
114. Lenk R. L., Ransom Y., Kaufman Y., Penman S., (1977), *Cell*, **10**, 67 – 78.
115. Fulton A. B., Wan K. M., Penman S., (1980), *Cell*, **20**, 849 – 857.

116. McCune S. A., Morris H. P., Weber G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta* **561**, 410 – 420.
117. Dang C. V., (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 44 – 47.
118. Hampel A., Mansukhani A., Condon T., (1984), *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.*, **43**, 2991 – 2993.
119. Klekamp M., Pahuski E., Hampel A., (1981), *Somat. Cell Genet.*, **7**, 725 – 735.
120. Pahuski E., Klekamp M., Condon T., Hampel A. E., (1983), *J. Cell Physiol.*, **114**, 82 – 87.
121. Mansukhani A., Condon T., Hampel A., Oxenderr D. L., (1984), *Biochem. Genet.*, **22**, 349 – 355.
122. Stapulenis R. R., Iwanow L. L., Łukoszczyński L. J., Jarmolenko W. W., Praszczewicz A. K., (1986), *Biopolimery i Kletka*, **2**, 302 – 307.
123. Sidiqi F. A., Yang D. C. H., (1985), *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 177 – 187.
124. Jacobo-Molina A., Villa-Garcia M., Chen H. C., Yang D. C. H., (1988), *FEBS Lett.*, **232**, 65 – 68.
125. Tanaka K., Ichihara A., (1983), *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 1339 – 1348.
126. Ryazanov A. G., (1984), *FEBS Lett.*, **178**, 6 – 9.
127. Jaremczuk A. D., Elskaja A. W., (1983), *Ukr. Biochim. Zurn.*, **55**, 363–367.
128. Del Monte U., Capaccioli S., Neri C. G., Perego R., Caldini R., Chevanne M., (1986), *Biochem. J.*, **236**, 163 – 169.
129. Iwanow L. L., Tamulewicz A. A. J., Łukoszczyński L. J., Kowalenko M. I., Rodowicz G. A., Praszczewicz A. K., (1984), *Molek. Biolog.*, **18**, 1326 – 1329.
130. Borkowski T., Zelman I. B., Bicz B., (1986), *Neuropat. Pol.*, **24**, 305 – 314.
131. Yang D. C. H., Dang C. V., Arnett F. C., (1984), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 15 – 21.
132. Bernstein R. M., Bunn C. C., Hughes G. R. V., Francoeur A. M., Mathews M. B., (1984), *Mol. Biol. Med.*, **2**, 105 – 120.
133. Dang C. V., LaDuca F. M., Bell W. R., (1986), *Exp. Cell Res.*, **164**, 261 – 266.
134. Mathews M. B., Reichlin M., Hughes G. R. V., Bernstein R. M., (1984), *J. Exp. Med.*, **160**, 420 – 434.
135. Bunn C. C., Bernstein R. M., Mathews M. B., (1986), *J. Exp. Med.*, **163**, 1281 – 1291.

EMBO COURSES 1991

Subject	Organizer(s)	Address for Inquiries	Date/Place/ Number of Students
Protein crystallography	A. Jones C.I.Bränden	Department of Molecular Biology Biomedical Center, Husargatan 3, s-75124 Uppsala, SWEDEN	27 May-7 June S-Uppsala 20
Analysis of gene expression during embryogenesis by in situ hybridisation	T. Jowett et al.	Department of Biochemistry and Genetics, Medical School of the University GB-Newcastle upon Tyne NE2 4HH ENGLAND	10-20 April GB-Newcastle 20
Molecular approaches to mouse development	P. Gruss et al.	Department of Molecular Cell Biology MPI of Biophysical Chemistry Am Faßberg, D-3400 Göttingen FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	2-17 May D-Göttingen 10
Advanced techniques for studying secretion	B. Gomperts M.J. Whitaker	Department of Physiology Rockefeller Building University Street GB-London WCT ENGLAND	2-17 April GB-London 16
Gene transfer to plants	I. Potrykus et al.	Institute for Plant Sciences Swiss Federal Inst. of Technology ETH-Zentrum, LFW-E 59.1 CH-8092 Zürich, SWITZERLAND	9-21 September CH-Zürich 15
In vitro immunization and the production of human monoclonal antibodies	C. Borrebaeck et al.	Department of immunotechnology of the University, PO BOX 7031 S-220007 Lund, SWEDEN	13-19 October S-Lund 10
Recombinant expression and electrophysiology of ion channels	P. Seeburg et al.	Centre for Molecular Biology ZMBH, University Im Neuenheimer Feld 282 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	6-13 October d-Heidelberg 10

EMBO COURSES 1991 continued

Subject	Organizer(s)	Address for Inquiries	Date(Place) Number of Students
Cytometry, a tool in cellular and molecular biology	A. Radbruch et al.	Institute of Genetics of the University Weyertal 121, D-5000 Köln 41 FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	4-15 September D-kö 14
Xenopus embryology	J. Slack J. C. Smith	Developmental Biology Unit Department of Zoology, ICRF, of the University, South Parks Road GB-Oxford OX1 3PS, ENGLAND	8-15 September GB-Oxford 15
Solid phase techniques for DNA sequencing, cloning and protein purification	M. Uhlen et al.	Department of Biochemistry Royal Institute of Technology Teknikringen 30, S-10044 Stockholm SWEDEN	9-18 June S-Stockholm 16
Plant molecular biology	P. Starlinger et al.	Institute of Genetics of the University Weyertal 121, D-5000 Köln FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	16-28 September 15
Molecular biology of the Drosophila embryo	R. Rosset et al.	laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaires, CNRS, Case 907 F-13288 Marseille Cedex 9 FRANCE	16-28 September F-Marseille 12
Patch-clamp and fluorometric calcium monitoring in sliced preparations	A. Konnerth et al.	Zelluläre Neurophysiologie MPI für Biophysik. Chemie, Am Faßberg D-3400 Göttingen, FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	13-23 May 16
DNA-protein interactions	I.W. Mattaj et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	20-28 January D-EMBL, Heidelberg 15
Cellular and molecular biology of yeast	D. Tollervey et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	3-13 March D-EMBL, Heidelberg 20
Antibodies in cell biology	T.E. Kreis et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	26 May-5 June D-EMBL, Heidelberg 16
Microinjection and electro-transfection of cell	W. Ansorge et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	10-015 June D-EMBL, Heidelberg 15
Subcellular fractionation of transport vesicles	J. Gruenberg et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	23 June-4 July D-EMBL, Heidelberg 14-16
Electron microscopy in molecular cell biology of cells and tissues	G. Griffiths et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	18 July-2 August D-EMBL, Heidelberg 20
Advanced digital light microscopy	E.H.K. Stelzer J. De Mey	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	6-17 October D-EMBL, Heidelberg 16
DNA sequencing: approaches, automated methods and analysis	W. Ansorge et al.	EMBL, Meyerhofstrasse 1 D-6900 Heidelberg FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	13-23 November D-EMBL, Heidelberg 15

EMBO WORKSHOPS 1991

Subject	Organizer(s)	Address for Inquiries	Date/Place
Structural and motile proteins	J.V. Small	Institute of Molecular Biology Academy of Sciences Billrothstrasse 11,A-5020 Salzburg AUSTRIA	18-22 March A-Schladming
Bacterial conjugation systems	E. Lanka B. Wilkins	Department Schuster MPI für Molekulare Genetik Ihnestrasse 73, D- 1000 Berlin 33 FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	30 June-4 July D-Tegernsee
Genetic control of vertebrate development	P. Gruss D. Duboule	Department of Molecular Cell Biology MPI of Biophysical Chemistry Am Faßberg, D-3400 Göttingen FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	26-31 May GR-Kolymbari, Crete
Bacterial plasmid-coded toxins: bacteriocins, microcins, and lantibiotics	R. James et al.	School of Biological Sciences University of East Anglia GB-Norwich NR4 7TJ ENGLAND	22-26 September F-Island of Bendor
Viruses of fungi and simple eukaryotes	V. Rubio et al.	Centro Nacional de Biotecnologia Serrano 115 duplicate E-28006 Madrid SPAIN	3-6 September E-Mallorca
The genetics of translation: the interconnectedness of things	R.H. Buckingham et al.	Institut de Biologie Physico- Chimique 13,rue P el M Curie F-57005 Paris FRANCE	14-19 May F-Veyrier-du-Lac
Molecular cross-talk between epithelial cells and pathogenic microorganisms (co-sponsored by ASCB)	J.-P. Kraehenbuhl et al.	Swiss Institute for Cancer Research Ch. des Boveresses CH-1066 Epalinges SWITZERLAND	18-23 August CH-Arolla
From receptor to gene	Ch. Weissman et al.	Institute of Molecular Biology 1 of the University Hönggerberg, Ch-8093 Zürich SWITZERLAND	25 August-1 September Ch-Arolla
NMR structures of proteins	K. Wüthrich	Institute of Molecular Biology and Biophysics, ETH-Hönggerberg CH-8093 Zürich, SWITZERLAND	31 August-5 September Ch-Kandersteg
Molecular biology of Rhizobium-legume symbiosis	M. Iaccarino et al.	IIGB via Marchohi 10 I-80125 Naples ITALY	16-19 October I-Capri/Naples
Protein phosphatases	P. Cohen W. Merlevede	Katholieke Universiteit Afdeling Biochemie Campus Gasthuisberg, Herestraat 49 B - 3000 Leuven BELGIUM	25-30 August B-Leuven
Molecular biology of filamentous fungi	U. Stahl et al.	Department of Microbiology & Genetics University of Technology Gustav Meyer Allee 25, D-1000 Berlin 65 FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY	24-29 August D-Berlin

**32nd International Conference
on the Biochemistry of Lipids
September 18-21, 1991
Granada, Spain**

SCIENTIFIC PROGRAM

The scientific program will include plenary lectures with invited speakers, colloquia and poster sessions. A number of poster abstracts will be selected for oral presentation. The authors of these abstracts will be informed by June, 1991.

The themes of the conference will be:

- 1.— The oxysterol pathway and its biological implications.
- 2.— Synthesis and secretion of lipoproteins in the intestine.
- 3.— Polyunsaturated fatty acid of the n-3 series: biological and metabolic roles.

Poster communications may be related to the topics of the conference or to any other areas of lipid biochemistry and molecular biology.

CORRESPONDENCE

M.^a José Alejandre.
Dpto. de Biogüimica.y Biología Molecular
Universidad de Granada. Apdo. de Correos 70
18080 - Granada; Spain
Phone: (34) 58/243240. Fax: (34) 58/274258



**ORDER
FORM**

ISSN 0032-5422

Please enter my subscription for 1991 at:
institutional rate US\$ 60 or personal rate
US\$ 30 (including postage and handling)

I enclose my cheque (bank draft) for
US\$.

I am interested in receiving further infor-
mation (a free sample) copy of „Postępy
Biochemii”

NAME:

ADDRESS:

POSTAL CODE: DATE

Cheques should be made payable or remittance
transferred to:

Polish Biochemical Society
16 Freta Street, 00-227 Warszawa
Bank Handlowy, PBK XIII/O Warszawa
37 00 44 - 1225 - 139 - 11

**Send orders to:
Polish Biochemical Society
16 Freta Street
00-227 Warszawa
Poland**



Aby zaprenumerować „Postępy Biochemii” w 1991 r. należy wpłacić odpowiednią kwotę na konto bankowe wydawcy (Polskiego Towarzystwa Biochemicznego) za pomocą przekazu zamieszczonego na odwrocie. Zamówione egzemplarze będziemy wysyłać pocztą na adres podany nam na przekazie. Ponieważ odcinek prze-

kazu docierający do nas jest jednocześnie zamówieniem, prosimy o **bardzo wyraźne** napisanie imienia, nazwiska (lub nazwy instytucji) i dokładnego adresu razem z kodem pocztowym (**DRUKOWANYMI LITERAMI**) na wszystkich trzech odcinkach przekazu. **Prenumerata krajowa dla instytucji: 180 000 zł.**

<http://rcin.org.pl>

Prenumerata krajowa indywidualna: 80 000 zł; (50% zniżki dla członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego).

Prenumerując „Postępy Biochemii” wspierasz swoje czasopismo!



Wydawca prosi
o kontakt tych,
którzy chcieliby wykorzystać
łamy „Postępów Biochemii”
do reklamowania
swych produktów i usług
związanych z biochemią,
biologią molekularną
i biologią komórki.

Please
contact the Editors
if you wish
to advertise in „Postępy Biochemii”
the products and services
related to biochemistry,
molecular biology
and cell biology.



XXth EUROPEAN CONFERENCE ON MUSCLE CONTRACTION AND CELL MOTILITY

Dear Colleague,

The Twentieth Meeting of the European Muscle Club is due to take place in Oxford from 23rd — 27th September 1991, organised jointly by myself and Dr Chris Ashley of the Department of Physiology of Oxford University.

The meeting organizers are aware that our Eastern European colleagues cannot, in general, obtain hard currency for conference expenses in Western Europe. We shall therefore try to pay as much of their conference expenses as we are able to do, and we hope that they can buy travel tickets to Oxford (with is a short bus ride from London's Heathrow airport) in their own currency.

We are currently attempting to raise funds to make this possible. We therefore suggest that you photocopy the preliminary form if necessary, and send back to us one copy for each person who wishes to come to this meeting. When we know what the possibilities are we shall tell you, as a national group, how many people from your country we can afford to fund in Oxford, and in consultation with you we will try to sort out those with highest priority, if we are unable to help everyone who wishes to come.

It would be most useful for us to have your fax numbers, because this is without doubt the easiest form of communication for us, and probably for you also.

Yours sincerely,

Gerald Elliott

P.S. „Preliminary forms” są dostępne w Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.



Pokwitowanie dla wpłacającego

zł.....
słownie.....
wpłacający.....
.....
.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Odcinek dla posiadacza rachunku

zł.....
słownie.....
wpłacający.....
.....
.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Odcinek dla poczty lub banku

zł.....
słownie.....
wpłacający.....
.....
.....
imię, nazwisko, dokładny adres z kodem pocztowym
na rachunek

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
00-227 Warszawa, ul. Freta 16
P.B.K. XIII/O W-wa, Al. Jerozolimskie
37 00 44-1225-139-11

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

stempel

Pobrano opłatę

zł.....

.....
podpis przyjmującego

Wskazówki dla autorów

Wydawany przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje prace przeglądowe omawiające bieżące osiągnięcia, koncepcje i kierunki badawcze w dziedzinie biochemii i nauk pokrewnych; publikuje też noty z historii biochemii, zaady polskiego słownictwa biochemicznego, recenzje nadesłanych książek oraz sprawozdania ze zjazdów, konferencji i szkół, w których biorą udział członkowie Towarzystwa.

Prace przeznaczone do publikacji w „Postępy Biochemii” mogą mieć charakter artykułów monograficznych (do 20 stron tekstu licząc piśmiennictwo i tabele), minireviews (do 10 stron tekstu), oraz krótkich not o najnowszych osiągnięciach i poglądach (do 5 stron tekstu).

Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji oraz poprawność cytowania piśmiennictwa. Ujęcie prac winno być syntetyczne, a przedstawione zagadnienie zilustrowane za pomocą tabel, rycin, (wykresy, schematy, reakcje), wzorów i fotografii.

Wskazany jest podział artykułów monograficznych na rozdziały i podrozdziały, których rzeczowe tytuły tworzą spis treści. Zgodnie z przyjętą konwencją rozdziały noszą cyfry rzymskie podrozdziały odpowiednio rzymskie i arabskie np. I-1, I-2. Poprawność logiczna i stylistyczna tekstu warunkuje jego jednoznaczność i czytelność. Autorzy przeto winni unikać składni obcojęzycznej, gwary laboratoryjnej, a także ograniczać stosowanie doraźnie tworzonych skrótów, nawet jeżeli bywają używane w pracach specjalistycznych. Każda z nadesłanych do Redakcji prac podlega ocenie specjalistów i opracowaniu redakcyjnemu. Redakcja zastrzega sobie możliwość skrócenia tekstu i wprowadzenie zmian nie wpływających na treść pracy, deklaruje też gotowość konsultowania tekstu z Autorami.

Przekazanie artykułu do redakcji jest równoznacznie z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępy Biochemii”. W przypadku, gdy Autor(zy) zamierza(ją) włączyć do swego autora artykułu ilustracje publikowane przez autorów prac cytowanych, należy uzyskać i przekazać nam odpowiednią zgodę na przedruk.

Redakcja prosi Autorów o przestrzeganie następujących wskazówek szczegółowych:

TEKST: Maszynopis powinien być napisany jednostronnie czcionką wielkości standartowej, z podwójną interlinią, z lewym marginesem ok. 4 cm z trzydziestoma wierszami na stronie i 60 znakami w wierszu (litery + odstęp), odstępy pomiędzy wyrazami powinny odpowiadać jednemu znakowi (nie równać do prawego marginesu).

W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń, ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie co do charakteru czcionki drukarskiej mogą Autorzy zaznaczyć ołówkiem na marginesach maszynopisu. W przypadku stosowania w tekście liter alfabetu greckiego trzeba na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie.

Strona informacyjna maszynopisu jest nienumerowana, zawiera imiona i nazwisko (a) autora (ów), nazwy, adresy wraz z numerem telefonu zakładów (w języku polskim

i angielskim), w których pracują autorzy, adres do korespondencji nr telefonu i ewentualnie fax, adresy prywatne autorów, tytuł artykułu w języku polskim i angielskim oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę tabel, rycin, wzorów i fotografii oraz skrót tytułu pracy (do 25 znaków).

Strona 1 (tytułowa) zawiera imiona i nazwiska autorów, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści też w obu językach, tytuł naukowy każdego z autorów i ich miejsce pracy z adresem pocztowym oraz wykaz stosowanych skrótów.

Kolejno numerowane dalsze strony obejmują tekst pracy, piśmiennictwo, tabele, podpisy i objaśnienia rycin, wzorów i fotografii.

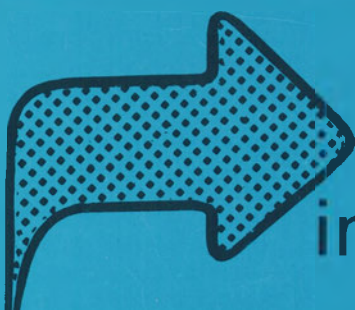
PIŚMIENNICTWO: Wykaz piśmiennictwa obejmuje prace w kolejności ich cytowania w tekście, zaznacza się je liczbami porządkowymi ujętymi w nawiasy kwadratowe, np. [3,7,9,—26]. Odnośniki bibliograficzne winny mieć nową uproszczoną formę. Sposób cytowania czasopism (1), monografii (2), rozdziałów z książek jednotomowych (3), rozdziałów z tomów serii opracowanej przez tych samych redaktorów (4), rozdziałów z tomów serii opracowanych przez różnych redaktorów (5) wskazują poniżej podane przykłady:

1. Hildenbrandt GR, Aronson NN (1980) *Biochim Biophys Acta* **631**: 499—502
2. Bostock CJ, Sumner AT (1978) *The Eukaryotic Chromosome*, Elsevier, North-Holland, Amsterdam
3. Norberth T, Piscator M (1979) W: Friberg L, Nordberg GF, Von VB (red) *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 541-553
4. Delej J, Kesters K (1975) W: Florkin M, Stotz EH (red) *Comprehensive Biochemistry* t 29B. Elsevier, North-Holland Amsterdam, str 1-77
5. Franks NP, Lieb WR (1981) W: Knight CG (red) *Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*, t 7. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, str 243-272

ILUSTRACJE: Ryciny winny być gotowe do reprodukcji. Fotografie czarno-białe (kontrastowe), powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub kalce technicznej. Wskazane jest, aby ryciny były dwukrotnie większe od przyszłej reprodukcji, tj. w skali 2:1. 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 winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmie wydawca. Ilustracji nie należy włączać w tekst maszynopisu, lecz odpowiednio ponumerować: tabele i ryciny noszą cyfry arabskie, wzory zaś rzymskie. Na marginesie tekstu należy zaznaczyć ołówkiem preferowane miejsce umieszczenia tabeli, rycin, czy wzoru. Tabele odpowiednio porubrykowane, winny być opatrzone jednoznacznym tytułem i ewentualnie także niezbędnymi objaśnieniami. Słowne objaśnienia znaków graficznych można umieścić w podpisie pod ryciną, rysunkowe zaś jedynie na planszy ryciny. Tytuły i objaśnienia rycin sporządza się w postaci oddzielnego wykazu. Ilustracje należy podpisać nazwiskiem pierwszego z autorów i pierwszym słowem tytułu pracy oraz oznaczyć „gó-ra-dół” (ołówkiem, na odwrocie). Ze względu na wewnętrzną spójność artykułu wskazane jest konstruowanie oryginalnych rycin i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa.

Maszynopis i załączniki (w dwu egzemplarzach), właściwie zabezpieczone przed uszkodzeniem w czasie transportu, należy przesłać na adres:

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
ul. Pasteura 3,
02-093 Warszawa



Place your advertisement in „Postępy Biochemii”!

It will reach
many Polish biochemists,
molecular biologists
and medical doctors.

Looking for a post-doctoral fellow?
Looking for a job?
We will publish
your advertisement!
(Advertisements up to 300 letters
are free in 1991).

Szukasz pracy? Szukasz pracownika?
Zamieścimy Twoje ogłoszenie!
20 pierwszych ogłoszeń do 300 znaków
będzie w 1991 roku bezpłatne.
Dział Ogłoszeń
„Postępów Biochemii”
może pośredniczyć
w wymianie informacji
gdy osoba ogłaszająca się
chce zachować incognito.

