

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 30 (1-2)
(1-216) (1984)

1984

tom 30 nr 1-2

PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

TOM 30 ZESZYT 1-2
1984

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 30 (1-2)
(1-216) (1984)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: A. Legocki (Poznań)

Zastępca: I. Szumiel (Warszawa)

Sekretarz: B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa)

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

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Skup

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), J. Rytko (Warszawa), J. Skangiel-Kramka (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

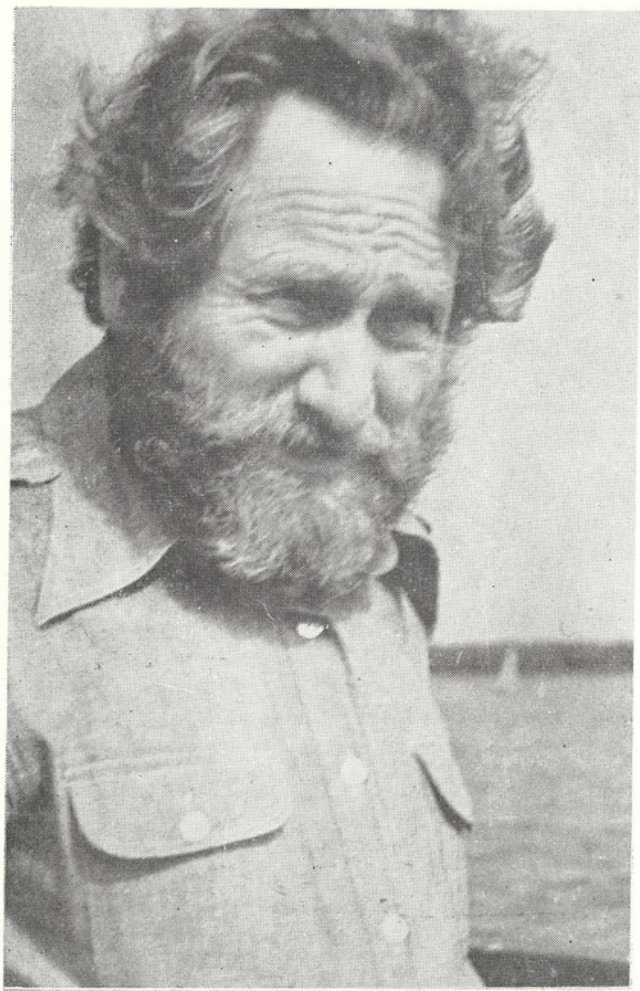
Adres Redakcji

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1984

Nakład 1810	Oddano do składania 23 XII 1983 r.
Ark. wyd. 16,5; ark. druk. 13,5	Podpisano do druku we wrześniu 1984 r.
Pap. druk. sat. kl. IV 70 g, 70×100	Druk ukończono w styczniu 1985 r.
Zam. 5369/12/83	Cena zł 180,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa



Prof. dr hab. Witold Drabikowski
1925—1983

Profesor dr hab. WITOLD DRABIKOWSKI
1925—1983

Dnia 17 września 1983 roku zmarł w wieku 58 lat w pełni sił twórczych prof. dr hab. Witold Drabikowski, nasz kolega, przyjaciel i nauczyciel, wybitny uczony o światowej sławie.

Przez ponad 31 lat swego życia związany był z Instytutem Biologii Doświadczałnej im. Marcelego Nenckiego, w którym w 1952 roku rozpoczął pracę, bezpośrednio po studiach w Uniwersytecie Łódzkim. Ukończył dwa wydziały, chemię i biologię w zakresie biochemii. Obie jego prace magisterskie zostały opublikowane. Pracę naukową w Instytucie zaczął w zespole zajmującym się biochemią mięśni. I biochemii mięśni poświęcił swe zdolności oraz pasję badawczą przez cały czas swej kariery naukowej. Obdarzony niezwykłą inteligencją i wyobraźnią naukową, szybko stał się autorytetem w tej dziedzinie wiedzy. Początkowo zajmował się badaniem związków fosforowych mięśni, a następnie białek mięśniowych oraz, w ostatnich latach, białek kurczliwych i regulujących skurcz komórek niemięśniowych. Szczególnie owocne i ważne wyniki dotyczą białek regulujących skurcz mięśnia oraz struktury drugo- i trzeciorzędowej białek wiążących jony wapnia.

Witold Drabikowski uzyskał doktorat w 1959 roku, habilitował się w roku 1963; w roku 1970 został mianowany profesorem nadzwyczajnym, a w roku 1976 — profesorem zwyczajnym. Kierownik Zakładu noszącego ostatnio nazwę Zakładu Badania Mięśni i Systemów Kurczliwych, był promotorem 12 prac doktorskich. Z Jego Zakładu czterech doktorów osiągnęło już pozycję samodzielnych pracowników naukowych. Opublikował jako autor, lub współautor ponad 150 prac doświadczalnych i artykułów przeglądowych; był wybitnym organizatorem prac badawczych. Jako kierownik prac doświadczalnych bardzo wymagający, w dyskusji naukowej bywał trudny, lecz zawsze gotowy uznać każdy rzeczowy argument.

Dzięki swej naukowej pozycji z łatwością kierował swych uczniów i współpracowników na staże podoktorskie do najlepszych zagranicznych ośrodków naukowych. Od szeregu też lat żaden poważniejszy zjazd w dziedzinie biochemii mięśni nie odbył się bez Jego udziału, lub też udziału Jego uczniów. W uznaniu osiągnięć naukowych otrzymał indywidualną nagrodę państwową pierwszego stopnia, a także wiele zespołowych nagród wraz ze współpracownikami. Stworzył On liczącą się w nauce światowej polską szkołę badań molekularnych mechanizmów skurczu mięśni.

Profesor Witold Drabikowski, człowiek o głębokiej wiedzy i szerokich zainteresowaniach, także pozazawodowych, odznaczał się przedsiębiorczością i niezwykłą energią w działaniu. Był patriotą głęboko zaangażowanym w sprawy Kraju, zawsze znajdującym czas na działalność społeczną. Czynnie uczestniczył w radach naukowych, towarzystwach i komitetach Polskiej Akademii Nauk. Był romantykiem wiernym swoim zasadom, bezkompromisowym i odważnym, szczególnie wrażliwym na nonsens i indolencję.

Mimo poważnej choroby, na którą cierpiał przez ostatnie lata, nie zwolnił tempa działania i nie zmienił trybu życia — dosłownie do ostatniej chwili pracował naukowo. Pozostanie w naszej pamięci jako barwna, silna osobowość o wielkim naukowym autorytecie.

NOWE W BIOCHEMII

ANNA D. INGLOT *)

Kilka uwag o kontroli wzrostu i różnicowania komórek przez hormono-podobne czynniki tkankowe **)

Wydaje się, że nie można zrozumieć znaczenia odkrycia transformujących czynników wzrostu bez poznania podstawowych mechanizmów hormonalnej kontroli wzrostu i różnicowania komórek i tkanek. Kontrola ta odbywa się przy udziale klasycznych hormonów współpracujących z czynnikami tkankowymi (*tissue factors*), które często określa się jako tzw. „nieklasyczne” hormony. Dla przykładu podam, że spośród klasycznych hormonów endokrynowych tylko insulina wykazuje bezpośrednie działanie mitogenne i to w ograniczonym stopniu. Podczas gdy przysadkowy hormon wzrostu (somatotropina) działa poprzez czynniki wzrostu zwane somatomedinami.

Czynniki wzrostu zostały zdefiniowane jako substancje, wytwarzane przez różne tkanki, które stymulują podziały komórek i posiadają inne właściwości troficzne, lecz nie są ani czynnikami odżywczymi, strukturalnymi ani też enzymami. Czynniki wzrostu są zwykle białkami informacyjnymi reagującymi w nanogramowych lub pikogramowych stężeniach ze swoistymi receptorami na powierzchni komórek. Najbardziej znanymi spośród nich są czynnik wzrostu naskórka (EGF), czynnik wzrostu z płytek krwi (PDGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu nerwów (NGF), insulino-podobna grupa polipeptydów (wśród nich przede wszystkim wspomniane somatomedyny) oraz nowo odkrywana rodzina transformujących czynników wzrostu (TGF). Cechy czynników wzrostu mają również wazopresyna, witamina A i jej pochodne, niektóre prostaglandyny, interleukiny 1, 2 i 3 oraz niektóre inne monokiny lub limfokiny (1—3).

Opisano także „negatywne” czynniki wzrostu, które bezpośrednio hamują proliferację komórek i tkanek. Są nimi chalony, endogenne, wysoce tkankowo-swoiste polipeptydy o aktywności antymitogennej (4). Według ostatnio opublikowanej przeze mnie koncepcji hormonalnej interferonu, również białko o cechach interferonu typu α , β i γ zostały zaliczone do rodziny „nieklasycznych” hormonów działających antagonistycznie w stosunku do czynników wzrostu (5, 6).

Nowa teoria hormonów ostatnio opracowywana przez grupę amerykańskich endokrynologów (Roth, de Roith, Rozenzweig i współpr., 7, 8) zakłada, że czynniki tkankowe są najprostszą i najbardziej konserwatywną formą interakcji między komórkami. Dopiero w miarę ewolucji wykształciły się gruczoły dokrewne produkujące klasyczne hormony. Klasyczne hormony spełniały początkowo funkcję czynników tkankowych. Insulinę, ludzką gonadotropinę łożyskową, tyreotropinę

*) Laboratorium Wirusologii Nowotworów, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław.

**) Podstawowe informacje na temat tkankowych czynników wzrostowych znaleźć może czytelnik w książce: *Tissue Growth Factors*, red. R. Baserg, wydanej jako 57 tom *Handbook of Experimental Pharmacology* przez Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1981, str. 630.

i szereg innych hormonów wykryto ostatnio u bakterii i pierwotniaków. Prymitywne organizmy posiadają również receptory i system efektorowy odpowiedzi na bodziec hormonalny (8).

W warunkach fizjologicznych działanie czynników wzrostu jest niezwykle precyzyjnie regulowane dla zapewnienia homeostazy. Dla przykładu podam, że w czasie krzepnięcia krwi wyznaczynionej w wyniku skaleczenia z ziarnistości α płytek krwi wydziela się bardzo aktywny czynnik wzrostu — PDGF, który ma działanie chemotaktyczne wobec fibroblastów i leukocytów oraz stymuluje proliferację komórek mezenchymalnych. Umożliwia to gojenie się rany. Jednakże proces ten ulega samostannemu wygaszeniu i nie doprowadza do bujania tkanek typu nowotworowego (2).

Grupa badaczy pod kierunkiem G. Todaro wykryła, że stransformowane komórki wydzielają do środowiska czynniki wzrostu (TGF), które pobudzają produkcję je komórki do nieograniczonej proliferacji. Taka autostymulacja może zachodzić w czasie embriogenezy, w układzie immunologicznym i przypuszczalnie jest ważną cechą wzrostu nowotworowego. Dlatego też powstał termin: stymulacja autokrynowa (dla odróżnienia od endokrynowej i parakrynowej) (3, 9—12).

Komórki obdarzone autokrynowym systemem uniezależniają się od endokrynowej kontroli wzrostu, chociaż mogą zachować receptory różnych hormonów i mogą częściowo na nie reagować. Zjawisko to, które jest korzystne dla wzrostu klonu komórek *in vitro*, może być wybitnie szkodliwe *in vivo*, gdyż oznacza zaburzenie homeostazy i niekontrolowany wzrost typu nowotworowego.

Dalsze badania nad transformującymi czynnikami wzrostu pokazały, że są one wytwarzane nie tylko przez tkanki nowotworowe, lecz też przez tkanki prawidłowe. Są one więc jednymi z odmian „normalnych” czynników wzrostu, które odgrywają ważną rolę w procesach embriogenezy (3, 9—12). Obecnie znane są postacie TGF zbliżone strukturalnie i funkcjonalnie albo do EGF albo do PDGF (10—13).

Jeżeli nie wszystkie, to prawdopodobnie większość komórek nowotworowych zawiera onkogeny determinujące nieprawidłowy wzrost i różnicowanie. Przynajmniej w jednym przypadku nowotworów doświadczalnych małą wykryto, że produktem onkogenu *v-sis* jest czynnik wzrostu homologiczny z PDGF (14, 15). W innych komórkach rozkojarzenie kontroli wzrostu może zachodzić w sposób pośredni np. przez zaburzenie systemu receptorów lub efektorów czynników wzrostu.

Jest wielce prawdopodobne, że odkrycie transformujących czynników wzrostu i stymulacji autokrynowej może mieć nie tylko podstawowe znaczenie dla poznania istoty procesów nowotworowych oraz rozwoju zarodka, lecz także otworzy drogę do nowych zastosowań praktycznych. Możliwa staje się bowiem synteza polipeptydów działających antagonistycznie w stosunku do TGF np. przez blokowanie receptorów dla tych hormonów obecnych na powierzchni komórek nowotworowych.

Ponadto ważne znaczenie mogą mieć badania antagonizmu między TGF a naturalnymi inhibitorami proliferacji komórek takimi jak chalony lub interferony (5, 6).

TGF podobnie jak inne czynniki wzrostu mogą też znaleźć zastosowanie w medycynie jako substancje przyspieszające gojenie się ran (2). Ich działanie jest bowiem wyłącznie fenotypowe i nie mogą one, według obecnych założeń teoretycznych, bez udziału onkogenów wywoływać trwałej i dziedzicznej transformacji nowotworowej komórek.

PIŚMIENNICTWO

1. Bradshaw, R. A., Rubin, J. S., (1980), *J. Supramol. Struct.*, **14**, 183—199.
2. Heldin, C. H., Wastermark B., Mellström K., Johnsson A., Ek B., Nister M., Betsholtz C., Rönstrand L., Wasteson A., (1983), *Survey and Synthesis of Pathology Research*, wyd. J. M. Cruse S. Karger A. G., Basel, str. 153—164.

3. Todaro, G. J., (1983), w: *Maturation Factors and Cancer*, wyd. M. A. S. Moore, Raven Press, N. York, str. 115—128.
4. Balazs A., Blazsek I., (1979), *Control of cell proliferation by endogenous inhibitors*, Akadémiai Kiado, Budapest, str. 1—272.
5. Inglot A. D., (1982—82), *Texas Reps. Biol. Med.*, **41**, 402—410.
6. Inglot A. D., (1983), *Arch. Virol.*, **76**, 1—13.
7. Roth J., Le Roith D., Shiloach J., Rosenzweig J. L., Leśniak M.-Havrankova J., (1982), *New Engl. J. Med.*, **306**, 523—527.
8. Le Roith D., Shiloach J., Berelowitz M., Frohman L. A., Liotta A. S., Krieger D. T., Roth J., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 2602—2607.
9. Sporn M. B., Todaro G. J., (1980), *New Engl. J. Med.*, **303**, 878—880.
10. Sherwin S. A., Twardzik D. R., Bohn W. H., Cockley D. K., Todaro G. J., (1983), *Cancer Res.*, **43**, 403—407.
11. Lipton A., Kepner N., Rogers C., (1982), w: *Interaction of Platelets and Tumor Cells*, A. L. Liss, Inc., N. York, 233—248.
12. Kaplan P. L., Anderson M., Ozanne B. (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 485—489.
13. Dicker, P., Pohjanpelto P., Pettican P., Rozengurt E., (1981), *Exp. Cell Res.*, **135**, 221—227.
14. Doolittle R. F., Hunkapillar M. W., Hood L. E., Devare S. G., Robbins K. C., Aaronson S. A., Antoniades H. N., (1983), *Science*, **221**, 275—276.
15. Waterfield, M. D., Scrace G. T., Whittle N., Stroobant T., Johnsonn A., Wasteson A., Westermark B., Heldin C. H., Huang J. S., Deuel T. F., (1983), *Nature*, **304**, 35—39.

RYSZARD FARBISZEWSKI *)

Hormono-podobne czynniki tkankowe transformujące wzrost komórek

W ostatnich kilku latach uwaga jednej z grup badaczy z National Cancer Institute, Bethesda (USA) zwrócona jest na polipeptydowe czynniki wzrostu komórek, wytwarzane przez komórki i tkanki nowotworowe. Czynniki te nazwano transformującymi czynnikami wzrostu (ang. *transforming growth factors* — TGFs). Nazwa pochodzi stąd, że czynniki te wywołują w warunkach *in vitro* zmiany fenotypowe komórek nienowotworowych, podobne do zmian obserwowanych po transformacji nowotworowej. Czynniki te, w wyniku połączenia ze swoistymi receptorami na zewnętrznej powierzchni komórek, wywołują w nich zmiany wewnątrzkomórkowe, prowadzące do dostrzegalnych zmian zespołu cech morfologicznych. Dodane w nanogramowych stężeniach do hodowli komórek nerki szczura, wywołują progresywny ich wzrost, utratę hamowania wzrostu zależnego od gęstości komórek i znikanie zjawiska zahamowania kontaktowego. Ponadto, czynniki te pozwalają na wzrost komórek prawidłowych w postaci kolonii w półpłynnym żelu agarowym (1, 2). Nietransformowane nowotworowo komórki i nienowotworowe zwykle nie tworzą kolonii w takich warunkach. Pierwszym odkrytym w 1978 r. czynnikiem TGT był czynnik wzrostu mięsaka (ang. *sarcoma growth factor* — SGF), wyizolowany z hodowli mysich komórek transformowanych wirusem mięsaka myszy (MSV) (1).

Roberts i wsp. są zdania, że termin transformujące czynniki wzrostu jest terminem tymczasowym (roboczym) i z pewnością będzie on w przyszłości zastąpiony przez bardziej adekwatne określenie, w miarę jak czynniki TGFs będą z różnych komórek i tkanek oczyszczane do homogenności i będzie poznawana ich sekwencja aminokwasowa oraz struktura II rzędowa (3).

Wyznaczono już masy cząsteczkowe, składy aminokwasowe i strukturę drugorzędową niektórych czynników TGFs. Masy cząsteczkowe wynoszą od 8000 do 20 000 (1). Czynniki te są termo- i kwasostabilne, wrażliwe na działanie trypsyny i dwutiotreitolu, wykazują bardzo podobne właściwości biologiczne, lecz różnią się siłą działania stymulującego wzrost komórek. Początkowo sądzono, że występują one tylko w komórkach nowotworowych i komórkach transformowanych wirusami onkogennymi lub czynnikami chemicznymi. Ostatnio wykazano, że wszystkie tkanki zwierząt różnych gatunków i człowieka wytwarzają czynniki transformujące wzrost komórek (2—8).

Chociaż aktywność czynników TGFs określa się *in vitro* obserwując wzrost i tworzenie kolonii komórek w półpłynnym żelu agarowym (zmianę fenotypu), nie nasuwa to wniosku, że ich aktywność *in vivo* wiąże się koniecznie z rozwojem nowotworu. Dane wskazują, że czynniki TGFs mają prawdopodobnie istotną rolę w funkcjonowaniu prawidłowych komórek, zwłaszcza w toku rozwoju embrionalnego.

*) Doc. dr, Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Instytut Chemii i Biofizyki Akademii Medycznej w Białymstoku.

Ze względu na oddziaływanie TGFs ze specyficznymi receptorami naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor* — EGF) na powierzchni komórek, Sporn i wsp. (10) zaproponowali klasyfikację TGFs, opartą na powinowactwie z EGF na:

— czynniki TGFs zaliczane do typu α — współzawodniczą z EGF o wiązanie z receptorami, ale nie wymagają EGF do indukowanego wzrostu komórek w postaci kolonii w półpłynnym żelu agarowym,

— czynniki TGFs zaliczane do typu β — nie współzawodniczą z EGF o wiązanie z receptorami, ale wymagają obecności EGF lub innych polipeptydów o podobnym działaniu do EGF do wzrostu komórek w postaci kolonii w półpłynnym żelu agarowym.

Zarówno czynniki typu α jak i β zostały wyizolowane z komórek i tkanek nowotworowych oraz nienowotworowych (1—8) a także z ludzkich płytek krwi (11). Czynniki TGFs, pochodzące z płytek nazwano z ang. *platelet-derived transforming growth factors*. Czynniki TGF typu β zawarty w płytkach został ostatnio całkowicie oczyszczony i dość dokładnie scharakteryzowany (12). Składa się on z dwóch podjednostek strukturalnych, każda o masie cząsteczkowej 12500, połączonych ze sobą mostkami dwusiarczkowymi. Tak skład aminokwasowy jak i podjednostkowa struktura oraz masa cząsteczkowa wskazują, że czynnik TGF typu β jest odmiennym czynnikiem od poznanego wcześniej czynnika wzrostu zawartego w płytkach a zwanego z ang. *platelet-derived growth factor* (PDGF), o działaniu mitogennym w stosunku do komórek pochodzenia mezenchymalnego. Ludzkie płytki krwi zawierają 40—100 krotnie więcej czynnika TGF typu β niż inne dotychczas badane tkanki nienowotworowe. Przypuszcza się, że biologiczna rola TGF typu β występującego w płytkach krwi może polegać na jego udziale w przyspieszaniu regeneracji tkanek. Na podstawie dotychczasowych danych doświadczalnych sugeruje się, że komórki nowotworowe i komórki nowotworowo stransformowane *in vitro* produkują czynniki TGFs tak typu α jak i β , natomiast komórki nienowotworowe wytwarzają czynniki TGFs typu β (13). Wysoko oczyszczony czynnik TGF typu α z tkanki nowotworowej szczura oraz EGF myszy dodane oddzielnie do hodowli komórek nerki szczura indukują w takim samym stopniu i w podobny sposób ich wzrost w postaci kolonii w półpłynnym żelu agarowym, prowadząc do powstania małych kolonii (średnia wielkość 1000 μm^2) (13). Podobnie ludzki TGF typu α wyizolowany z czerniaka stymuluje komórki nerki szczura do tworzenia kolonii o małych rozmiarach (13). Czynniki TGF typu β sam nie stymuluje wzrostu komórek, natomiast z łącznikiem z myśm EGF zwiększa bardzo znacznie liczbę i rozmiary kolonii (średnia wielkość kolonii 6000 μm^2) w porównaniu z aktywnością biologiczną TGF typu α (13).

Pierwszy wyizolowany czynnik wzrostu mięsaka (SGF) wyizolowany z hodowli mysich komórek linii 3T3, stransformowanych wirusem mięsaka, jest mieszaniną dwóch czynników TGF, należących do dwóch typów (14). Czynniki typu α odpowiada za indukcję wzrostu komórek nerki szczura w postaci małych kolonii, zaś czynniki typu β za indukcję wzrostu tych komórek w postaci kolonii o dużych rozmiarach.

Ostatnio wyizolowano w znacznych ilościach TGF z gruczołów ślinowych i nerek wołu (10) przy użyciu metody Roberts i wsp. (15) polegającej na ekstrakcji homogenatu tkankowego zakwaszonym etanolem i następnej chromatografii na kolumnie wypełnionej Bio-Gel P-30. W taki sposób otrzymany TGF charakteryzował się względną masą cząsteczkową około 10000. W tym stopniu oczyszczenia, specyficzna aktywność bydlęcego TGF, pochodzącego z nerek wzrastała 10— do 25-krotnie w porównaniu z jego aktywnością zawartą w ekstrakcie etanolewym (15). Następny etap oczyszczania bydlęcego TGF polegał na zastosowaniu chromatografii cieczowej (16). TGF otrzymany z gruczołów ślinowych i nerek cechowała aktywność cha-

rakterystyczna dla czynników β , ponieważ w jego obecności do wzrostu komórek w postaci kolonii, konieczny był także czynnik EGF.

Uzyskanie z nerek bydłych preparatu TGF typu β o znacznej czystości, pozwoliło badaczom z National Cancer Institute na zastosowanie go po raz pierwszy *in vivo* jako czynnika farmakologicznego w doświadczalnym leczeniu ran u szczurów (10). Pod skórę każdego zwierzęcia (13 szczurów) implantowano 6 komórek z metalowych siateczek, z których trzy traktowano jako doświadczalne i 3 jako kontrolne. W podskórne trzy siateczki wprowadzano przez 9 dni roztwór TGF ($7 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$) po uprzednim dodaniu mysiego EGF ($20 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$). W pozostałe 3 siateczki stanowiące kontrolę wprowadzano równoważną ilość albuminy wołowej. Następnie podawano wszystkim zwierzętom dootrzewnowej iniekcji $0,5 \text{ mCi } ^3\text{H}$ -tymidyny i je zabijano. TGF typu β wraz z EGF powodował istotne zwiększenie ilości całkowitego białka i DNA w komorach ran oraz wzrost włączania znakowanej tymidyny do DNA. Badanie histologiczne materiału pobranego z gojących się ran pochodzących z implantacji siateczek, w które wprowadzano TGF i EGF wykazało, pojawianie się nowych licznych komórek oraz młodych włókien kolagenowych, wchodzących w skład błony podstawnej. Nacieczenie komórkami zapalnymi w miejscach implantacji siateczek metalowych wskazywało na fizjologiczny proces gojenia się ran (10). Badania powyższe są pierwszą próbą praktycznego zastosowania czynnika TGF typu β jako środka farmakologicznego mogącego sprzyjać gojeniu się ran, poprzez zwiększoną proliferację fibroblastów i szybsze obrastanie tkanką łączną. Jest oczywiste, że niezbędne są dalsze pogłębione badania nad biologiczną rolą czynników TGF.

PÍSMIENICTWO

1. De Larco, J. E., Todaro, G. J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 4001—4005.
2. Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., Sporn, M. B., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**, 5339—5343.
3. Roberts, A. B., Frolik, C. A., Anzano, M. A., Sporn, M. B., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 2621—2626.
4. Todaro, G. J., Fryling, C., De Larco, J. E., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 5258—5262.
5. Marquardt, H., Todaro, G. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5220—5225.
6. Moses, H. L., Branum, E. L., Proper, J. A., Robinson, R. A., (1981), *Cancer Res.*, **41**, 2842—2848.
7. Frolik, C. A., Dart, L. L., Meyers, C. A., Smith, D. M., Lehman, S. R., Sporn, M. B., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 1833.
8. Tucker, R. F., Volkenant, M. E., Moses, H. L., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 1829.
9. Proper, J. A., Bjornson, C. L., Moses, H. L., (1982), *J. Cell. Physiol.*, **110**, 169—174.
10. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M., Ward, J. M., Sodek, J., (1983), *Science*, **219**, 1329—1331.
11. Childs, C. B., Proper, J. A., Tucker, R. F., Moses, H. L., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 5312—5316.
12. Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Sporn, M. B., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 1831.
13. Marquardt, H., Anzano, M. A., Roberts, A. B., Sporn, M. B., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 1903.

14. Anzano, M. A., Roberts, A. B., Sporn, M., De Larco, J. E., (1983), *Fed. Proc.*, **42**, 1829.
15. Roberts, A. B., Lamb, L. C., Newton, M., Sporn, M. B., De Larco, J. E., Todaro, G. J., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 3496—3498.
16. Anzano, M. A., Roberts, A. B., Lamb, L. C., Smith, J. M., Sporn, M. B., (1982), *Anal. Biochem.*, **125**, 217—224.

JAN FRONK *)

Krystalograficzne uszczegółowienie struktury peroksydazy glutationowej

Na podstawie rentgenowskiej analizy strukturalnej kryształów natywnej peroksydazy glutationowej z erytrocytów wołu i różnych jej pochodnych Ladenstein i wsp. skonstruowali model budowy cząsteczki enzymu przy rozdzielczości 0,28 nm (1). Dalsza matematyczna obróbka danych doświadczalnych pozwoliła tej samej grupie badaczy na krystalograficzne uszczegółowienie struktury i osiągnięcie rozdzielczości 0,2 nm (2).

W oparciu o te wyniki zaproponowano szczegółowy model budowy cząsteczki peroksydazy glutationowej, a także mechanizmu jej działania. Osiągnięta rozdzielczość pozwoliła nawet na ustalenie prawdopodobnej sekwencji aminokwasów enzymu; przeprowadzona klasycznymi metodami analiza sekwencji aminokwasów N-końcowego fragmentu cząsteczki peroksydazy glutationowej z wątroby szczura (3) potwierdziła dużą dokładność ustaleń opartych na wynikach krystalograficznych.

Peroksydaza glutationowa (oksydoreduktaza glutation:wodorotlenek, EC 1. 11. 1. 9) jest selenoenzymem katalizującym redukcję licznych wodoronadtlenków, w tym pochodnych lipidów. Dlatego przypisuje się jej udział w ochronie błon biologicznych i innych składników komórki przed toksycznym działaniem tlenu. Jedynym fizjologicznym donorem elektronów jest glutation.



Reakcja 1. Reakcja katalizowana przez peroksydazę glutationową. GSH — glutation zredukowany, GSSG — glutation utleniony.

Enzym z erytrocytów wołu jest białkiem o masie cząsteczkowej 84.000, złożonym z 4 identycznych podjednostek. Każda podjednostka zawiera jedną resztę selenocysteiny w pozycji 35, biorącą bezpośredni udział w katalizowanej przez peroksydazę reakcji. Nie wiadomo, czy selenocysteina powstaje posttranslacyjnie, w wyniku przyłączenia selenu do reszty dehydroalaninowej w białku, czy też włączana jest w czasie translacji.

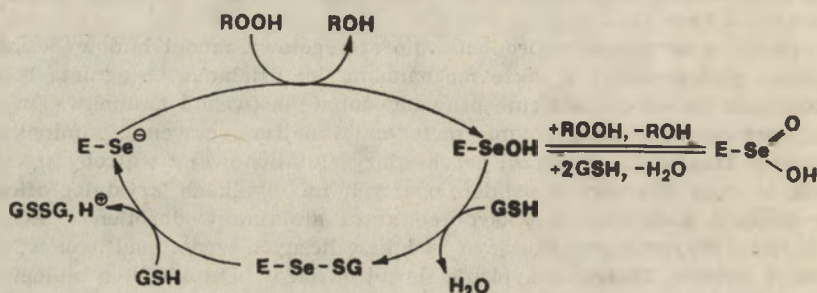
Podjednostka peroksydazy glutationowej zawiera 4 obszary o strukturze α i 4 β , stanowiące łącznie ponad 40% długości łańcucha polipeptydowego. Reszta Se-Cys-35 znajduje się w centrum stabilnego układu $\beta\alpha\beta$, charakterystycznego dla centrów aktywnych wielu innych enzymów. Podjednostki oddziałują ze sobą znacznymi obszarami. Dwie podjednostki tworzą dimer, dwa dimery tworzą natywną, tetrameryczną formę enzymu, o kształcie zbliżonym do spłaszczonego czworościanu. W oddziaływaniach w obrębie dimeru uczestniczy po 16 aminokwasów z każdej podjednostki; oprócz „oddziaływań hydrofobowych” tworzą się 4 wiązania wodorowe. W oddziaływaniach pomiędzy dimerami uczestniczy po 20 aminokwasów z każdej podjednostki, tworzy się 36 wiązań wodorowych; znaczna część tych oddziaływań zachodzi pomiędzy dwiema antyrównoległymi strukturami β .

*) Mgr, Zakład Biochemii Ogólnej, Instytut Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Żwirki i Wigury 93, 02-089, Warszawa.

Centra aktywne znajdują się w płytkich zagłębieniach na powierzchniach podjednostek, stykających się ze sobą w dimerze i są łatwo dostępne; miejsca te są silnie uwodnione—5 cząsteczek wody tworzy „łańcuch” łączący C-końcowe odcinki struktur β_1 i β_2 i N-końiec struktury α_1 ; związanie cząsteczki glutationu w centrum aktywnym usuwa z niego wodę. W wiązaniu glutationu w centrum aktywnym uczestniczą zapewne reszty Arg-167, Arg-40, Gln-130. Reszty Arg-167 i -40 tworzą wiązania jonowe odpowiednio z grupami COOH Glu i Gly, a reszta Gln-130 wiązanie wodorowe z grupą NH_2 Glu. Selenocysteina tworzy wiązanie selenosiarczkowe z glutationem.

Wydaje się, że związanie jednej cząsteczki glutationu przez podjednostkę w dimerze powoduje niewielką zmianę konformacyjną, uniemożliwiającą wiązanie glutationu przez drugą podjednostkę. Efektywnie więc tetrameryczna cząsteczka enzymu ma tylko 2 centra aktywne.

Mechanizm działania peroksydazy glutationowej jest typu ping-pong, z bardzo nietrwałymi kompleksami enzym-substrat, przechodzącymi natychmiast w pochodne enzymu.



Ryc. 1. Proponowany mechanizm redukcji wodoronadtlenków katalizowanej przez peroksydazę glutationową.

Omówiona tu praca pokazuje, jak wielu różnorodnych informacji o cząsteczce białka może dostarczyć interpretacja wyników rentgenowskiej analizy strukturalnej.

PIŚMIENICTWO

1. Ladenstein, R., Epp, O., Bartels, K., Jones, A., Huber, R., Wendel, W., (1979), *J. Mol. Biol.*, **134**, 199—218.
2. Epp, O., Ladenstein, R., Wendel, A., (1983), *Eur. J. Biochem.*, **133**, 51—69.
3. Condell, R. A., Tappel, A. L., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **709**, 304—309.

MINIREVIEWS

TERESA JAKUBOWICZ *)

Genetyczna regulacja wiązania wolnego azotu

Zdolność wiązania azotu atmosferycznego przez drobnoustroje jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie. Jest to złożony proces enzymatyczny, w którym azot cząsteczkowy ulega redukcji do amoniaku przy udziale nitrogenazy. Pod względem genetycznym proces ten został najlepiej poznany u wolnożyjącej bakterii *Klebsiella pneumoniae*. Geny odpowiedzialne za wiązanie azotu tworzą tzw. region *nif*. Region *nif* został zmapowany w bliskim sąsiedztwie operonu histydyny (*his*) na chromosomie *Klebsiella*. Wykazano, że jest on złożony z 17 genów zgrupowanych w 8 operonach podlegających skoordynowanej kontroli (1, 2).

Ustalono następującą kolejność genów operonów *nif*:

QB AL F M VSV XNE YKDH J

(Strzałkami oznaczono tu odrębne jednostki transkrypcyjne zgodnie z kierunkiem odczytywania).

Geny *nif K*, *nif D*, *nif H* są genami strukturalnymi trzech polipeptydowych komponentów nitrogenazy, kompleksu enzymatycznego, który pełni kluczową rolę w redukcji azotu cząsteczkowego. Pozostałe geny *nif* w większości biorą udział w „dojrzwianiu” poszczególnych składników nitrogenazy oraz syntezie niskocząsteczkowego kofaktora molibdenowego (Mo-Fe-Co), który znajduje się w centrum aktywnym enzymu. Geny *nif F* i *nif J* determinują białka uczestniczące w transporcie elektronów do nitrogenazy. Różne aspekty biologicznego wiązania azotu zostały ostatnio opisane w artykule przeglądowym zamieszczonym w Postęпах Mikrobiologii (3).

Ekspresja genów regionu *nif* jest ściśle uzależniona od stężenia związanego azotu. W obecności amoniaku wszystkie jednostki transkrypcyjne operonów *nif* ulegają represji. Przy braku NH_4^+ następuje derepresja syntezy nitrogenazy. Kontrola ekspresji genów operonów *nif* odbywa się poprzez dwa złożone systemy regulacyjne

W specyficznej regulacji operonów *nif* biorą udział produkty dwóch genów *nif L* i *nif A*. Geny te należą do wspólnego operonu *nif LA*. Produkt genu *nif A*, białko o charakterze zasadowym i masie cząsteczkowej 57 000, spełnia rolę aktywatora transkrypcji operonów *nif*. Rola produktu genu *nif L*, białka obojętnego o m.c. 50 000 jeszcze do niedawna nie była znana. Ostatnie badania z zastosowaniem technik mutagenazy oraz fuzji genów *nif* z genami *lac* z *E. coli* wykazały, że działa on jako specyficzny represor transkrypcji tych operonów (4).

Oprócz specyficznej kontroli poprzez produkty genów *nif L* i *nif A*, region *nif* podlega również wyższego rzędu regulacji powiązanej z ogólnym metabolizmem azotu w komórce (5). Do niedawna rolę nadrzędnego regulatora transkrypcji operonów związanych z asymilacją azotu przypisywano syntetazie glutaminowej (6). Syn-

*) Dr, Zakład Biologii Molekularnej UMCS, Instytut Mikrobiologii, 20-033 Lublin.

Przy wysokim stężeniu azotu związanego w podłożu, białka *ntr B* i *ntr C* działając w kompleksie, powodują represję transkrypcji genów operonu *nif LA*. W tych warunkach, represji ulegają również geny zaangażowane w asymilacji azotu np. operon histydyny (*hut*), proliny (*put*), syntetazy glutaminowej (*gln A*) (5).

Gdy stężenie amoniaku w podłożu spada, białka *ntr C* i *ntr A* aktywują transkrypcję operonu *nif LA*. Syntetyzowany w tych warunkach produkt genu *nif L* pozostaje w nieaktywnej formie. Natomiast białko genu *nif A* funkcjonuje jako aktywator transkrypcji operonów *nif* co w konsekwencji prowadzi do syntezy nitrogenazy i wiązania N₂. Należy podkreślić, że białko *nif A* spełnia rolę pozytywnego regulatora transkrypcji działając w kompleksie z białkiem *ntr A* (Ryc. 1). Ponadto ostatnie badania wykazały, że produkt genu *nif A* może wpływać na autogenną regulację własnego operonu *nif LA* (10). Oprócz tego stwierdzono, że białko *nif A*, może w określonych warunkach zastępować białko *ntr C* w regulacji transkrypcji operonów asymilacji azotu (9, 11).

Obecność efektorów represyjnych nitrogenazy jak tlen czy niektóre aminokwasy nie wpływa na poziom transkrypcji operonu *nif LA* (1). Ich obecność powoduje natomiast konformacyjne przekształcenie produktu genu *nif L* przeprowadzając go w formę aktywnego represora. Ta zmiana prowadzi z kolei do zahamowania transkrypcji operonów *nif* i zahamowania wiązania N₂. Mechanizm działania represora nie został wyjaśniony. Rozważa się kilka możliwości jego funkcjonowania. Być może zapobiega on transkrypcji poprzez interakcję z DNA, bądź też działa poprzez inaktywację produktu genu *nif A*.

Na zakończenie warto podkreślić, że system regulacyjny, w którym dwa geny należące do tego samego operonu kodują represor i aktywator, tak jak to ma miejsce w przypadku pary genów *ntr B* i *ntr C* oraz *nif L* i *nif A* jest zjawiskiem unikalnym w świecie bakterii. Ta wyjątkowa organizacja regulatorowych operonów *nif LA* i *ntr BC*, jak również wyraźne strukturalne i funkcjonalne podobieństwo produktów genów *ntr C* i *nif A* pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że operony *ntr BC* i *nif LA* posiadają wspólny ewolucyjny początek (9, 11).

PISMIENICTWO

1. Dixon (1982), Materiały zjazdowe z Letniej Szkoły Biologii Molekularnej, Spetsai, Grecja.
2. Kennedy Ch., Cannon F., Cannon M., Dixon R., Hill S., Jensen J., Kumar S., McLean P., Merrick M., Robson R., Postgate J., (1981), Current Perspectives in Nitrogen Fixation (146—156) wyd. Gibson A. H., Newton W. E., Australian Academy of Science.
3. Lorkiewicz Z., Skorupska A., (1982), *Postępy Mikrobiologii*, **21**, 7—32.
4. Merrick M., Hill S., Hennecke M., Hahn M., Dixon R., Kennedy C., (1982), *Molec. Gen. Genet.*, **185**, 75—81.
5. Merrick M., (1982), *Nature*, **297**, 362—363.
6. Streicher S. L., Shanmugan K. T., Ausubel F., Marandi C., Goldberg R. B., (1974), *J. Bacteriol.* **120**, 815—821.
7. Pahel G., Tyler B., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4544—4548.
8. McFarland N., McCarter L., Artz S., Kustu S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2135—2139.
9. Merrick M. J., (1983), *EMBO J.*, **2**, 39—44.
10. Drummond M., Clements J., Merrick M., Dixon R., (1983), *Nature*, **301**, 302—307.
11. Ow D. W., Ausubel F. M., (1983), *Nature*, **301**, 307—312.

MIROSLAWA BARCISZEWSKA *)

Ogólna metoda analizy sekwencji nukleotydów w transferowych kwasach rybonukleinowych

Spośród wszystkich rodzajów kwasów nukleinowych tematyka transferowych kwasów rybonukleinowych (tRNA) jest najwszechstronniej opracowywana. Składa się na to kilka przyczyn:

- tRNA odznaczają się najprostszą budową w tej klasie makrocząsteczek. Ich długość wynosi 63—93 nukleotydów (1).
- charakteryzują się wysoką zawartością zmodyfikowanych (rzadkich) nukleotydów (1, 2).
- znane są i dostępne różnorodne metody badania właściwości tRNA (3).
- spełniają określone i różnorodne funkcje biologiczne (4).

Zmodyfikowane nukleotydy znaleziono w wielu innych rodzajach kwasów nukleinowych (rybosomalne rRNA, 5S RNA, niskocząsteczkowe jądrowe RNA oraz DNA), jednak cząsteczki tRNA są pod tym względem unikalne, ponieważ zawierają wiele różnych modyfikacji (scharakteryzowano dotychczas ponad 60 rzadkich nukleotydów w tRNA (5)) oraz występują one w dużych ilościach (około 20% składu nukleotydogo). Właśnie obecność zmodyfikowanych nukleotydów jest czynnikiem decydującym przy określaniu sekwencji nukleotydowej w tRNA.

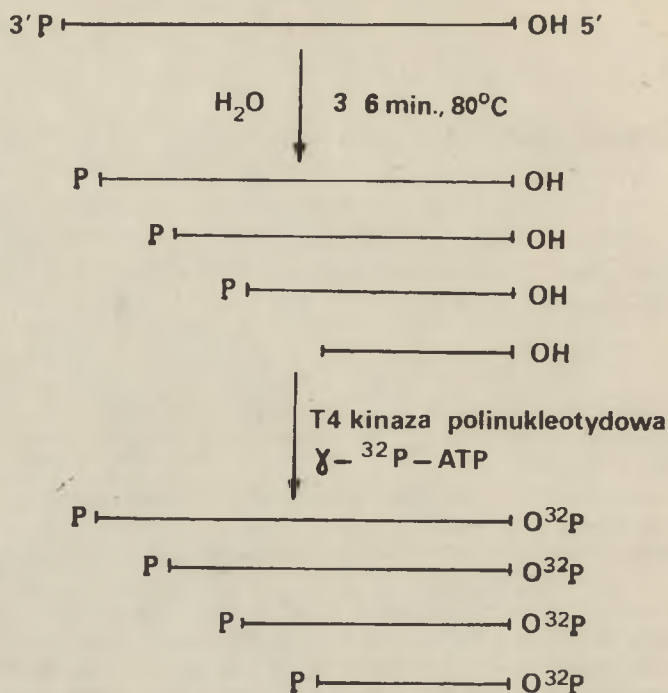
W ostatnich latach, począwszy od 1977 roku, który to okazał się przełomowym dla sekwencjonowania kwasów nukleinowych (6), pojawiły się nowe, szybkie techniki analizy pierwszorzędowej struktury kwasów rybonukleinowych. Polegają one na ograniczonej (częściowej) hydrolizie RNA przy pomocy specyficznych enzymów lub też na wykorzystaniu specyficznych odczynników chemicznych (23). Szerokie wykorzystanie enzymatycznego podejścia ograniczają następujące fakty:

- fragmenty struktury RNA posiadające kilka sąsiadujących par G—C są odporne na działanie enzymu, nawet w warunkach denaturujących (7).
- specyficzne enzymy hydrolityczne wykorzystywane do trawienia tRNA nie zawsze odróżniają zmodyfikowany nukleotyd od macierzystego a w szeregu przypadkach są nieaktywne.
- rybonukleazy nie hydrolizują wiązań fosforodwuestrowych sąsiadujących z nukleotydem mającym grupę metylową na węglu 2' rybozy.

Te trudności spowodowały opracowanie innego podejścia do analizy struktury tRNA, które jest powszechnie stosowane. Polega ono na chemicznej degradacji tRNA w bardzo łagodnych warunkach tak, że statystycznie mniej niż jedna cząsteczka kwasu rybonukleinowego jest rozrywana w jednym miejscu (ang. *single hits* (7)). W wyniku takiego procesu otrzymuje się 2 zestawy fragmentów (Ryc. 1):

- zestaw zawierający polinukleotydy rozciągające się od końca 5' kwasu nukleinowego (zawiera zwykle fosforylowany koniec 5') do dowolnego nukleotydu

*) Dr, Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12, 61-704, Poznań.



Ryc. 1. Schemat metody otrzymywania pełnego zestawu fragmentów tRNA opracowanej przez Stanley i Vassilenko (7). Fragmenty tRNA po hydrolizie (3—6 min.) mające grupę hydroksylową na końcu 5' poddaje się znakowaniu fosforem ³²P, a następnie rozdzielowi na żelu.

wewnątrz łańcucha RNA z grupą fosforanową na końcu 3' w postaci cyklicznego 2',3'fosforanu.

— zestaw zawierający fragmenty rozciągające się od dowolnego nukleotydu wewnątrz łańcucha mającego wolną grupę 5'hydroksylową do końca 3'.

Szekely i Sanger pokazali, że oligonukleotydy z wolną grupą 5'hydroksylową obecne w hydrolizacie kwasu nukleinowego, mogą być znakowane do wysokiej specyficznej aktywności przy pomocy kinazy polinukleotydowej z bakterii *Escherichia coli* po infekcji fagiem T4 (T4 kinaza) i (γ—³²P) ATP (8). Tę obserwację wykorzystano do znakowania fosforem ³²P oligonukleotydów z tRNA posiadających wolną grupę 5'hydroksylową. Otrzymanie pełnego zestawu znakowanych fragmentów jest podstawowym etapem określania sekwencji tRNA (tzn. dowolny fragment różni się od sąsiedniego obecnością lub brakiem pojedynczego nukleotydu na końcu 5').

Różne są techniki analizy takiego zbioru oligonukleotydów. Można wycinać kolejne pasma z żelu, wymywać dany fragment buforem i dalej analizować (7, 9) lub też bezpośrednio przenosić rozdzielone oligonukleotydy z żelu poliakryloamidowego na płytki z DEAE-celulozą (10) lub PEI celulozą (11), a następnie enzymatycznie hydrolizować oligonukleotydy in situ (na płytce) uwalniając 3',5'nukleozydodwufosforan (pNp) lub 5'monofosforan w zależności od zastosowanej nukleazy. Analiza ruchliwości 5'monofosforanu lub 3',5'dwufosforanu nukleozydu z końca 5' każdego fragmentu pozwala ustalić sekwencję nukleotydów w tRNA (10, 11).

Celem tego artykułu nie jest szczegółowe analizowanie wszystkich znanych podejść do rozwiązywania pierwszorzędowej struktury tRNA, ale przedstawienie ogólnej metody określania sekwencji tRNA. Metoda ta polega na:

- a. otrzymaniu częściowego (ograniczonego) hydrolizatu tRNA,
- b. rozdzieleniu znakowanego fosforem ^{32}P hydrolizatu na dwukierunkowej elektroforezie na żelu poliakryloamidowym,
- c. trawieniu nukleazą P_1 fragmentów oraz identyfikacji 5' monofosforanu nukleozydu oraz modyfikowanych dwunukleotydów przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej (TLC),
- d. określeniu końcowych nukleotydów w tRNA.

Takie podejście nadaje się do określenia sekwencji dowolnego tRNA. Zaletą takiego postępowania jest szybkie uzyskanie informacji o strukturze (już na dwukierunkowym żelu) a następnie ich potwierdzenie na kolejnych etapach. Stosując tę metodykę autor określił sekwencję tRNA^{Met} z zarodków pszenicy (12) oraz innych roślinnych tRNA (13). Podobną procedurę zastosowano przy określaniu sekwencji tRNA^{Val} *Bacillus subtilis* (14).

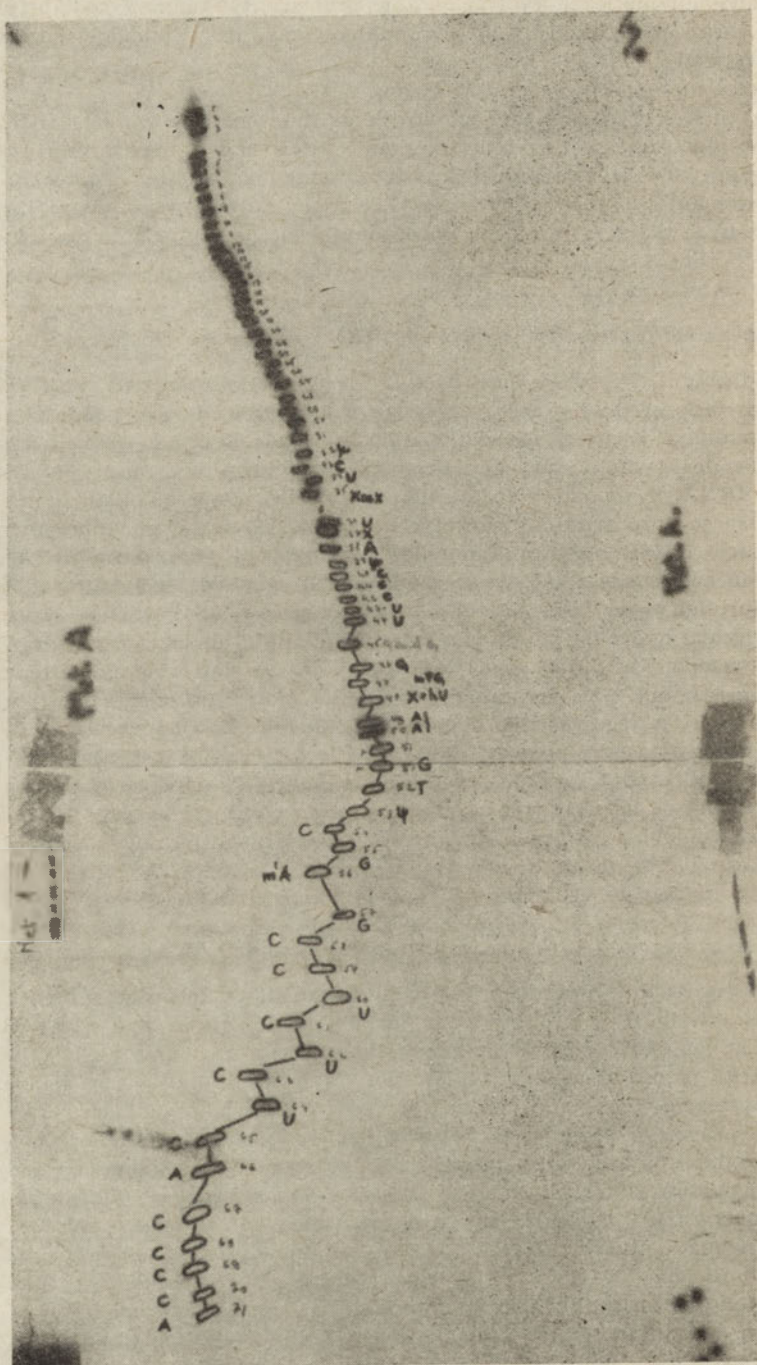
Etapy określania sekwencji tRNA:

1. Otrzymywanie częściowego hydrolizatu tRNA znaczonego fosforem ^{32}P

Specyficzny tRNA (1—5 μg ; 1 $\text{A}_{260} = 40 \mu\text{g}$) oczyszczony na żelu poliakryloamidowym bezpośrednio przed rozpoczęciem analizy struktury poddaje się hydrolizie formamidem, dwumetylosulfotlenkiem lub wodą. Warunki reakcji (czas i temperatura) należy ustalić tak, aby otrzymać częściowy hydrolizat (7). Mechanizm hydrolizy tRNA przy pomocy formamidu lub DMSO nie jest dokładnie znany. Wiadomo, że są to rozpuszczalniki aprotyczne wykorzystywane głównie jako czynniki denaturujące. DMSO stosowano również przy izolacji mieszaniny tRNA z bakterii (15). Można przypuszczać, że hydroliza tRNA zachodzi głównie pod wpływem grup wodorotlenowych (OH^-), a obecność formamidu lub DMSO powoduje zwiększenie szybkości hydrolizy dzięki znacznie niższej stałej dielektrycznej oraz większego od wody momentu dipolowego. Najczęściej stosuje się formamid w temperaturze 80°C przez 5 minut (12). Formamid lub DMSO można usunąć poprzez wytrącenie tRNA i produktów jego rozpadu etanolem (9, 10) lub przez odparowanie. Wydajność reakcji kinazowania przy pomocy kinazy T4 i (γ — ^{32}P) ATP jest niższa dla zmodyfikowanych nukleotydów znajdujących się na końcu 5' danego fragmentu niż dla podstawowych nukleotydów, ale wystarczająca do wykrycia każdego fragmentu (16). Mieszanina reakcyjna oprócz nadmiaru ATP zawiera glicerynę oraz enzym, co pogarsza warunki rozdzielenia. Usuwa się je przez sączenie na żelu Sephadex G-25. Stosowanie apyrazy do rozkładu ATP nie jest konieczne (9).

2. Rozdział hydrolizatu tRNA na żelu poliakryloamidowym w dwóch kierunkach

Celem tego etapu jest dobry rozdział fragmentów, ich elucja oraz częściowa analiza sekwencji (Ryc. 2). Otrzymany w poprzednim etapie hydrolizat tRNA rozdziela się na żelu 10% o pH 3.5 (pierwszy kierunek) a następnie na 12 i 18 lub 20% żelu o pH 8.3 (drugi kierunek) (17). W pierwszym kierunku na tzw. kwaśnym żelu rozdział następuje wg składu nukleotydowego. W takich warunkach reszty fosforanowe są praktycznie obojętne a istotny wpływ na ruchliwość oligonukleotydów ma wielkość stałej jonizacji (pK_a) puryn i pirymidyn a w szczególności zmodyfikowanych nukleotydów (18). Elektroforezę (300—500 V) prowadzi się tak długo aż błękit bromofenolowy (BB) przebędzie drogę 30 cm. Umożliwia to analizę sekwencji o długości do 70 nukleotydów. Elektroforeza w drugim kierunku odbywa się w pH 8.3 na płytach długich (90—100 cm). W tych warunkach oligonukleotydy układają się według wielkości co praktycznie pokrywa się z długością łańcucha; reszty fosforanowe mają decydujący wkład do całkowitego ładunku danego fragmentu (18). Przy napięciu 100—500 V elektroforezę prowadzi się do momentu osiągnięcia przez błękit BB końca płyty (najlepiej zatrzymać rozdział kiedy BB znajduje się 10 cm przed



Ryc. 2. Rozdział znakowanego fosforem ^{32}P hydrolizatu tRNA^{Met} zarodków pszenicy w dwóch kierunkach. I kierunek wykonano w 10% żelu o pH 3.5, natomiast II kierunek w żelach 12% (górna połowa żelu) i 18% (dolna połowa). Specyficzne ułożenie pasm umożliwia częściową interpretację sekwencji.

końcem płyty). Taki rozdział umożliwia analizę sekwencji o długości 35—100 jednostek nukleotydowych. Otrzymuje się na żelu wyraźnie oddzielone pasma w ilości odpowiadającej każdej długości oligonukleotydu (Ryc. 2). Dodatkowo z ich położenia można odczytywać sekwencję nukleotydów w sposób podobny jak w dwukierunkowym systemie elektroforeza-homochromatografia (16). Jeżeli żel jest technicznie poprawny to można bezbłędnie odczytać 50—60 nukleotydów. Każde pasmo po wycięciu i elucji z żelu (100% wydajności) analizuje się w systemie chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

3. Trawienie fragmentów nukleazą P_1 oraz identyfikacja 5' monofosforanów nukleotydów

Wykorzystanie nukleazy P_1 pozwala otrzymać nukleozydo—5' monofosforany, których ruchliwości chromatograficzne (R_f) są dobrze znane. Najistotniejsze jest, że każdy 5' mononukleotyd analizowany jest w dwóch układach chromatograficznych (patrz niżej). Jeżeli struktura tRNA nie jest zbyt skomplikowana (tzn. ma niewiele zmodyfikowanych nukleotydów) to w wyniku elektroforezy na żelu poliakryloamidowym oraz TLC w jednym kierunku można określić końcowy 5' nukleotyd każdego fragmentu, a w konsekwencji całą strukturę tRNA. Gdy w strukturze tRNA występują zmodyfikowane nukleotydy, wówczas należy stosować TLC w dwóch kierunkach i różnych systemach rozpuszczalników (9). Identyfikacja ich, właśnie na tym etapie ma dwie wyraźne korzyści:

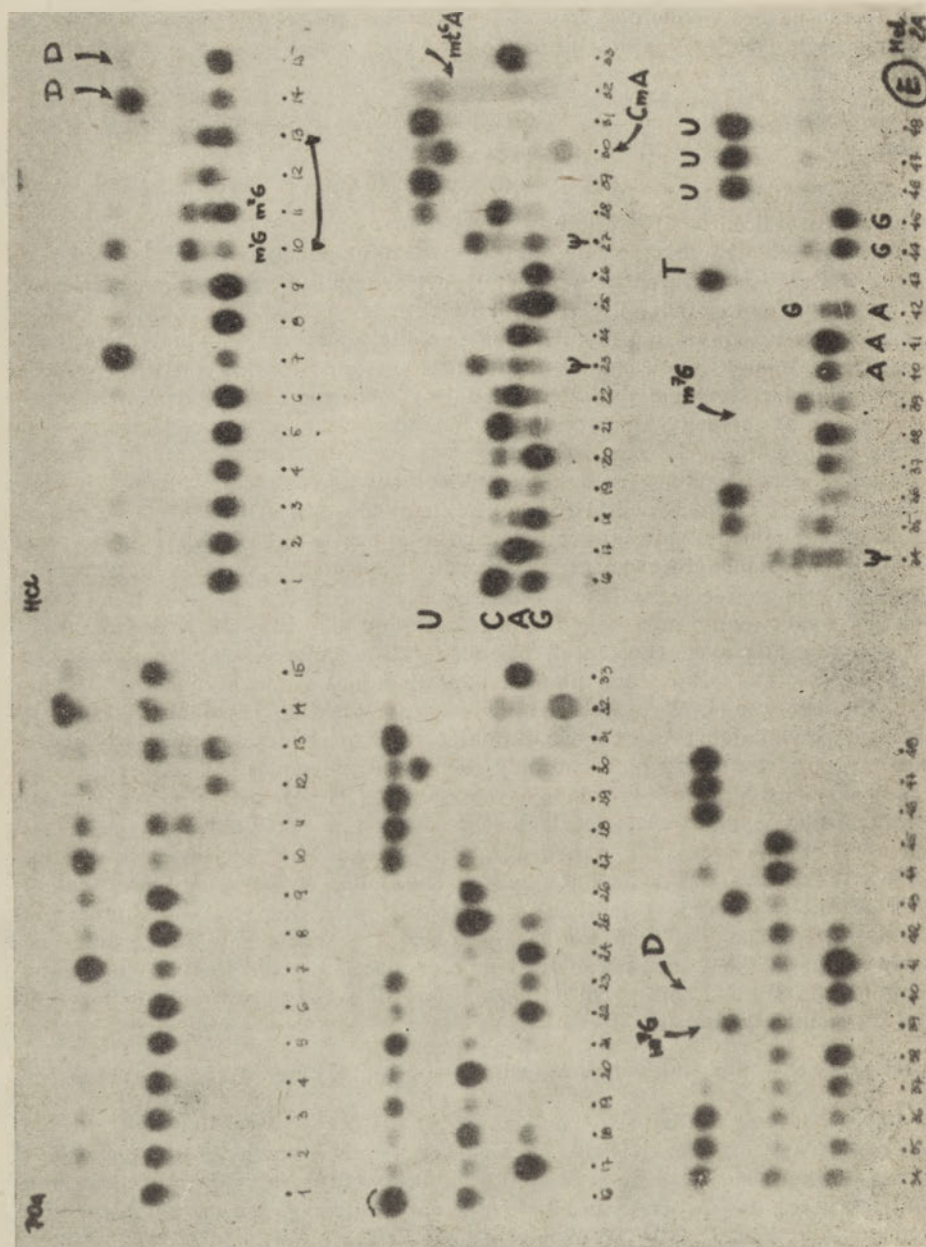
- plamka odpowiadająca rzadkiemu nukleotydowi jest lepiej widoczna ponieważ intensywności czterech podstawowych nukleotydów pU, pC, pA i pG są niższe aniżeli podczas analizy składu nukleotydowego całej cząsteczki tRNA.

- znalezienie zmodyfikowanego nukleotydu bezpośrednio w sekwencji świadczy, że jego obecność nie jest efektem zanieczyszczeń.

Jak już wspomniano, nukleozydo-5' monofosforany analizuje się w dwóch układach chromatograficznych (12). Jeżeli pasmo z żelu zostało wycięte dokładnie, to powinna pojawić się tylko jedna plamka odpowiadająca radioaktywnemu nukleozydo-5' monofosforanowi. W przeciwnym wypadku mamy do czynienia z kilkoma plamkami odpowiadającymi 5' końcowym nukleotydowi pochodzącym z sąsiadujących fragmentów, co jest również pomocne przy określaniu sekwencji (Ryc. 3). Intensywność radioaktywnych plam odpowiadających np. pm⁷G i pD jest szczególnie niska na skutek niskiej wydajności fosforylacji (9, 16). Jeżeli w sekwencji występuje modyfikacja rybozy na węglu 2' to hydroliza sąsiedniego wiązania internukleotydowego nie jest możliwa. Jak wiadomo alkaliczna hydroliza wymaga obecności wolnej grupy 2'OH, która zgodnie z mechanizmem reakcji potrzebna jest do utworzenia produktu pośredniego. Problem ten można rozwiązać wykorzystując ograniczone trawienie nukleazą P_1 . W ten sposób otrzymuje się dwunukleotyd [³²P] N_m¹ — N² oraz mononukleotyd [³²P] N_m¹. Nukleotyd N² można określić przez porównanie R_f z wzorcowymi dwunukleotydami (9).

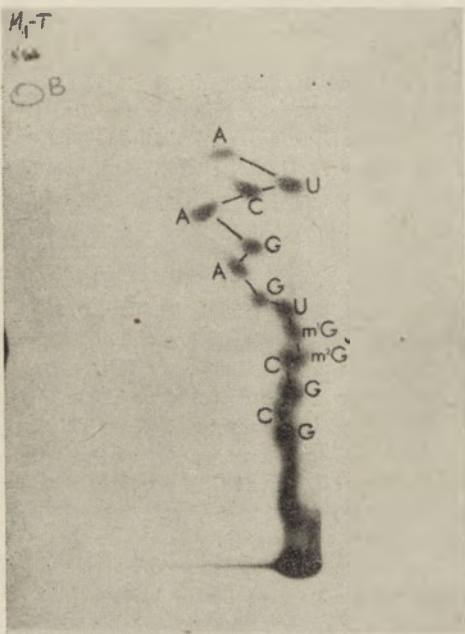
4. Określanie sekwencji nukleotydów metodą wędrującej plamki

Z dotychczasowej analizy sekwencji wiadomo już prawie wszystko o strukturze fragmentów i całej cząsteczki tRNA. W niektórych przypadkach informacje należy sprawdzić. Wykorzystuje się do tego celu technikę wędrującej plamki. Polega ona na elektroforetycznym rozdziale na bibule z octanu celulozy w pH 3.5 ograniczonego hydrolizatu (alkalicznego lub enzymatycznego) oraz na płytkach z DEAE celulozą techniką homochromatografii w drugim kierunku (16, 18). Zasada rozdziału na octanie celulozy jest podobna jak w przypadku kwaśnego żelu, gdyż całkowity ładunek danego fragmentu w pH 3.5 zależy od wielkości stałej jonizacji nukleotydów. W drugim kierunku rozdział następuje na płytce z DEAE celulozą. Wykorzystuje się tutaj



Ryc. 3. Analiza znakowanych końcowych 5' fosforanów mononukleotydów tRNA^{Mei} zarodków pszenicy w dwóch układach chromatograficznych (12): „HCl” i „PO₄”. Numery oznaczają kolejne pasma wycięte z żelu przedstawionego na Ryc. 2.

mieszaninę oligorybonukleotydów stanowiących hydrolizat drożdżowego RNA (tzw. *homomix*) a nie mieszaninę rozpuszczalników organicznych. Kiedy stężony roztwór „*homomixu*” porusza się po płytce, nukleotydy wypierają się nawzajem tworząc kilka frontów. Krótkie fragmenty posiadające mniejsze powinowactwo do wymiennika jonowego wypierane są przez dłuższe oligonukleotydy i poruszają się dalej (Ryc. 4). Radioaktywne nukleotydy przesuwają się różnymi frontami i rozdzielają się zgodnie z ich powinowactwem do DEAE celulozy, które w tych warunkach jest proporcjonalne do długości oligonukleotydu (18).



Ryc. 4. Analiza sekwencji nukleotydów jednego z fragmentów tRNA^{Met} nasion łubinu żółtego (13) metodą wędrującej plamki (homochromatografia). Fragment tRNA poddaje się ograniczonej hydrolizie przy pomocy wody a następnie rozdziela się w dwóch kierunkach: I kierunek elektroforeza na bibule z octanu celulozy (pH 3.5), II kierunek homochromatografia na płytkach z DEAE celulozą.

5. Analiza końcowych nukleotydów w tRNA

Końcowego 5' nukleotydu oraz końca 3'tRNA nie można określić bezpośrednio z analizy fragmentów po ograniczonym trawieniu formamidem. Należy zatem zaznaczyć oba końce tRNA, poddać tRNA hydrolizie chemicznej lub enzymatycznej i analizować je np. metodą wędrującej plamki. Koniec 3'tRNA można znakować przez:

- wbudowanie radioaktywnego fosforu przy pomocy nukleotydylotransferazy i (α — ^{32}P) ATP do zdegradowanego częściowo tRNA (19),
- dodanie [^{32}P] pCp do 3'końcowej adenozyiny w tRNA przy pomocy ligazy T4 (20),
- przyłączenie ^{32}P do końcowej adenozyiny w tRNA przy pomocy polimerazy poli (A) i (α — ^{32}P) ATP (22).

Koniec 5' można znakować dwoma metodami:

- przez fosforylację ^{32}P uprzednio pozbawionego 5'fosforanu tRNA działaniem alkalicznej fosfatazy (6),

— przez reakcję wymiany 5'fosforanu i (γ — ^{32}P) ATP w obecności ADP i kinazy T₄ (12, 21).

Odpowiednio znakowany tRNA na obu końcach można wykorzystać do określenia końcowych nukleotydów, a także do badań strukturalnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Barciszewski, J., Rafalski, A., (1981), *Atlas of Transfer Ribonucleic Acids and Modified Nucleosides*, PWN, Warszawa—Poznań.
2. Dirheimer, G., (1982), w: *Recent Results in Cancer Research*, Vol. 86, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 15—46.
3. Agris, P. F., (1980), *The Modified Nucleosides in tRNA. A Bibliography of Biochemical and Biophysical Studies from 1970—1979*, Adam Lis Wyd. New York.
4. Rich, A., RajBhandary, U. L., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860.
5. Nishimura, S., (1979), w: *Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition*, Schimmel, P. R., Soll, D., Abelson, J. N., Wyd. Cold Spring Harbor, 59—79.
6. Maxam, A. M., Gilbert, W., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560—564.
7. Stanley, J., Vassilenko, S., (1978), *Nature*, **274**, 87—89.
8. Szekely, M., Sanger, F., (1969), *J. Mol. Biol.*, **43**, 607—615.
9. Nishimura, S., Kuchini, Y., (1983), w: *RNA—DNA Sequencing Analysis*, Weismann, S. M., Wyd. Pareger Scientific, New York.
10. Tanaka, Y., Dyer, T. A., Brownlee, G. G., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1259—1272.
11. Gupta, R. C., Randerath, K., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3443—3458.
12. Barciszewska, M., Dirheimer, G., Keith, G., (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 1161—1168.
13. Barciszewska, M., dane nieopublikowane.
14. Murao, K., Hasegawa, T., Ishikura, H., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 715—718.
15. Gutcho, S., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **157**, 76—82.
16. Silberklang, M., Gillum, A. M., RajBhandary, U. L., (1979), *Methods in Enzymol.*, **59**, 58—109.
17. Lockard, R. K., Alzner-Deweerd, B., Heckmann, J., MacGee, J., Tabor, M., RajBhandary, U. L., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 37—56.
18. Mandeles, S., (1977), *Nucleic Acids Sequence Analysis*, Columbia University Press, Tłum. Rosyjskie, Wyd. Mir, 975.
19. Vlasov, V. V., Giege, R., Ebel, J. P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **119**, 51—59.
20. Keith, G., Pixa, G., Fix, C., Dirheimer, G., (1983), *Biochimie*, **65**, 661—672.
21. Keith, G., Informacja prywatna.
22. Winter, G., Brownlee, G. G., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3129—3139.
23. Peattie, D. A., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1760—1764.

ARTYKUŁY

MAGDALENA BOGUTA ^{*)}, ALEKSANDRA PUTRAMENT ^{**)}

Geny globinowe człowieka: ich budowa i układ w chromosomach

Human Globin Genes: Their Structure and Organization in Chromosomes

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Typy globin człowieka**
- III. Klonowanie genów globinowych**
- IV. Budowa genów globinowych**
- V. Układ genów globinowych w obrębie rodziny i ich ekspresja**
- VI. Talasemie**
 - VI-1. α talasemie**
 - VI-2. β talasemie**
- VII. Regulacja ekspresji genów globinowych**
- VIII. Ewolucja genów globinowych**

Contents

- I. Introduction**
- II. Types of human globins**
- III. Cloning of globin genes**
- IV. Structure of globin genes**
- V. Arrangement and expression of globin genes within a family**
- VI. Thalassemias**
 - VI-1. α thalassemias**
 - VI-2. β thalassemias**
- VII. Regulation of expression of globin genes**
- VIII. Evolution of globin genes**

I. Wstęp

W ostatnich kilku latach opracowano podejścia badawcze, których zastosowanie zaczyna przynosić zaskakująco ciekawe wyniki. Chodzi tu po

^{*)} Mgr; ^{**)} Prof. dr; Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: pz — pary zasad, kz — kilozasad; litery greckie oznaczają nazwy genów lub polipeptydów globinowych. Indeksy (litery arabskie) oznaczają skrót aminokwasu różnicującego polipeptydy tego samego typu.

pierwsze — o zastosowanie enzymów restrykcyjnych, które stało się podstawą inżynierii genetycznej, a także analizy fizycznej genomów lub ich fragmentów (1), po drugie zaś — sekwencjonowanie DNA (2).

Poniżej postaramy się opisać główne wyniki badań nad klonowaniem, analizą fizyczną i sekwencjonowaniem genów kodujących polipeptydy, które wchodzi w skład hemoglobiny. Dostarczają one zupełnie nowych danych na temat budowy genów i genomów eukariontów wyższych, zależności między strukturą odcinków chromosomów a ekspresją genów, obróbki pre-mRNA, a także ewolucji genów i genomów. Badania nad genami globinowymi człowieka pozwoliły już na zrozumienie podstaw molekularnych anemii dziedzicznej ogólnie objętej nazwą talasemii. Mogą więc one zainteresować lekarzy, jakkolwiek talasemia jest chorobą bardzo rzadko występującą wśród ludności zamieszkującej Europę Środkową.

Celem tego artykułu jest w zasadzie przedstawienie wyników badań, a nie metod, jakie w nich stosowano. Niektóre jednak metody przedstawimy w sposób skrótowy, gdyż są one mało znane większości polskich biologów.

II. Typy hemoglobiny człowieka

Cząsteczka hemoglobiny człowieka i innych kręgowców składa się z dwu polipeptydów typu alfa i dwu — typu beta. U człowieka polipeptydy alfa są złożone ze 141 reszt aminokwasów. Są to dzeta (ζ) i alfa (α). Polipeptydy typu beta, złożone ze 146 reszt aminokwasów, są to epsilon (ϵ), gamma (γ), delta (δ) i beta (β).

Zidentyfikowano następujące typy cząsteczek hemoglobiny ludzkiej: $\zeta_2\epsilon_2$ Gower I, $\alpha_2\epsilon_2$ Gower II, $\zeta_2\gamma_2$ Portland, $\alpha_2\gamma_2$ hemoglobina płodowa HbF, $\alpha_2\beta_2$ HbA i $\alpha_2\delta_2$ HbA₂. W pierwszych 8 tygodniach rozwoju w pęcherzyku żółtkowym embrionu syntetyzowana jest hemoglobina Gower I. Później głównym miejscem syntezy hemoglobiny stają się komórki wątroby. Towarzyszy temu przestawienie na syntezę polipeptydów α i γ . Powstaje więc głównie HbF, występują jednak także, choć w małych ilościach hemoglobiny Gower II i Portland. W końcowym okresie rozwoju płodowego synteza hemoglobiny w wątrobie ustaje, rozpoczyna się zaś jej synteza w szpiku kości płaskich. Jednocześnie spada gwałtownie synteza polipeptydów γ i rozpoczyna się synteza polipeptydów β i δ . W komórkach człowieka dorosłego ponad 97% hemoglobiny stanowi HbA, około 2,5% HbA₂. Występują ponadto niewielkie ilości HbF.

Różnice między polipeptydami typu α i β nie są wynikiem modyfikacji potranslacyjnej. Każdy typ polipeptydu kodowany jest przez odrębny gen. Zależnie więc od etapu rozwoju pojawiają się różnych typów hemoglobiny jest wynikiem włączania i wyłączania w rozwoju transkrypcji różnych genów (3, 4).

III. Klonowanie genów globinowych

Poniżej postaramy się przedstawić na przykładzie genów globinowych, w jaki sposób można wyizolować z organizmu eukariotycznego pojedynczy gen stanowiący w przybliżeniu 1×10^{-5} część genomu. Punktem wyjścia tego typu prac stał się globinowy mRNA. Hemoglobina syntetyzowana jest bowiem w wyspecjalizowanych komórkach — retikulocytach — gdzie dominującą klasą mRNA jest właśnie mRNA globinowy. Stwarza to możliwość względnie łatwego wyizolowania mRNA będącego transkryptem pojedynczego genu. Poprzez zastosowanie odwrotnej transkryptazy w obecności dezoksyrybonukleotydów otrzymać można odcinek DNA — tzw. cDNA — będący repliką mRNA danego genu. Taki cDNA można klonować w *E. coli* używając jako wektora plazmidu (1).

Jednym z pierwszych udanych eksperymentów było sklonowanie zsyntetyzowanego na matrycy mRNA, genu kodującego β globinę królika (5).

Namnożenie takiego zrekombinowanego z plazmidem cDNA stwarza możliwość uzyskania wielu informacji na temat struktury genu. Plazmid zawierający cDNA znakowany silnie ^{32}P służył także jako sonda molekularna w opisaney poniżej procedurze izolowania genów globinowych.

Pierwotnym celem wyodrębnienia i klonowania genów z genomów było otrzymanie i analiza nie tylko odcinków transkrybowanych lecz także bezpośrednio z nimi sąsiadujących odcinków nietranskrybowanych. Później okazało się ponadto, że liczne geny zawierają introny, których nie ma w cDNA.

Cały DNA człowieka poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi, dobierając warunki tak, aby nie wszystkie sekwencje rozpoznawane przez te enzymy były przecięte. Zachodziła bowiem obawa przecięcia poszukiwanych genów. Pocięty DNA wirowano w gradiencie sacharozy i wybierano fragmenty o długości około 20 kz. Do fragmentów dosyntetyzowano lepkie końce. Równolegle izolowano DNA z faga λ , które miały służyć jako wektory (7, 8).

Fragmenty DNA ludzkiego łączono z fragmentami DNA faga λ , po czym tak zrekombinowany DNA pakowano *in vitro* z fagowym białkiem płaszcza. Odtwarzano w ten sposób fagi zdolne do lizowania komórek bakteryjnych i zawierające losowe fragmenty genomu ludzkiego. Taka kolekcja odcinków genomu człowieka wbudowanych do genomów faga nazywana jest bankiem genów (*gene library*).

Następny etap stanowiła identyfikacja fagów przenoszących geny globinowe. Oszacowano, że poszukiwany gen mógłby się znaleźć w jednym klonie fagowym na 180 000. Komórki *E. coli* zakażano fagami przenoszącymi fragmenty DNA człowieka. Zakażone komórki wysiewano na tacki kawiarniane z pożywką agarową porośniętą wolnymi od faga komórkami *E. coli*. Wokół miejsc, gdzie znalazły się komórki zakażone fagiem zachodziła liza powodująca powstawanie łyseinek. Na powierzchnię szalek na-

kładano filtry nitrocelulozowe, przenosząc na nie m.in. fagi z łyśinek. Następnie filtry zdejmowano i traktowano NaOH w celu uwolnienia i denaturacji fagowego DNA. Wysuszone filtry zalewano roztworem zawierającym silnie radioaktywny zdenaturowany cDNA globinowy służący jako sonda molekularna. Po odmyciu wolnego cDNA filtry suszono i metodą autoradiografii określano miejsca, gdzie cDNA hybrydyzował z fagiem. Porównując miejsca zaczernione na kliszy z łyśinkami na tacy odnajdywano fagi, które przypuszczalnie przenosiły gen globinowy. Fagi te namnażano i ponownie selekcjonowano przez hybrydyzację fagowego DNA z sondą molekularną (1, 7, 8, 9). Wyodrębniony klon fagowy można było dalej namnażać, a sklonowany w nim gen globinowy służył jako materiał m.in. do sekwencjonowania.

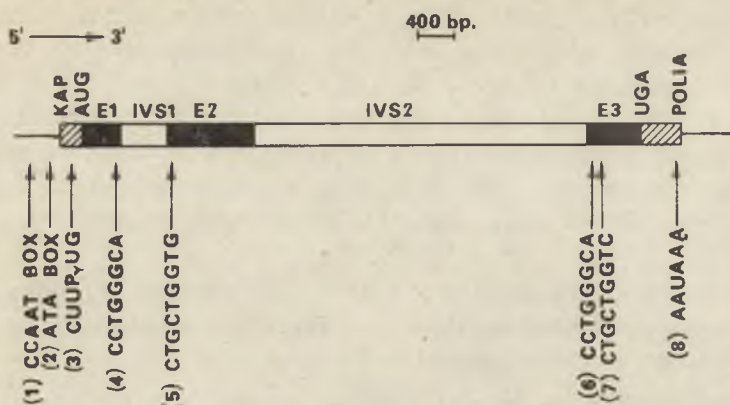
IV. Budowa genów globinowych

Prawie wszystkie geny globinowe człowieka zostały ostatnio zsekwenconowane. Okazuje się, że ich struktura ma następujące cechy wspólne: trzy eksony przedzielone są dwiema sekwencjami intronowymi (IVS1, IVS2).

Transkrypty genów globinowych, podobnie jak innych genów eukariotycznych zawierają niekodującą sekwencję 5' ograniczoną kapturkiem oraz sekwencję 3' zakończoną traktem poliA. Niekodująca sekwencja 5' zawiera zawsze układ CUUPyUG położony 7 nukleotydów w stronę 3' od kapturka (tj. między kapturkiem a kodonem inicjującym translację). Miejsce przyłączania poliA poprzedza charakterystyczna sekwencja AAUAAA odpowiedzialna, jak się uważa, za poliadenylację. Sekwencjonowano także nietranskrybowane odcinki DNA przylegające do transkrybowanych części genów globinowych. Od strony 5' w odległości około 30 nukleotydów od miejsca przyłączania kapturka znaleziono we wszystkich genach globinowych, podobnie jak w wielu innych genach eukariotycznych, sekwencję ATAAA (tzw. „ATA-box”) prawdopodobnie odpowiedzialną za inicjację transkrypcji. W odległości 70—90 nukleotydów znaleziono sekwencję CCAAT, której również przypisuje się udział w inicjacji transkrypcji. Występuje ona we wszystkich genach globinowych (10, 11, 12, 13) prócz genu δ . Być może jest to związane z obniżonym poziomem ekspresji genu δ w stosunku do genu β (12, 14) (Ryc. 1).

Wszystkie badane dotąd kręgowce mają po kilka genów kodujących polipeptydy typu α i β . Te grupy genów nazywane są rodzinami genów α i β . Na rodzinę genów typu α składają się ζ 1, $\psi\zeta$ *, $\psi\alpha$, α 1 i α 2. Geny α 1

*) Termin pseudogen (ψ , psi) wprowadzono dla oznaczenia takich sekwencji DNA, które są podobne do sekwencji DNA w genach działających, ale są na tyle zmienione, że nie zachodzi ich ekspresja fenotypowa (17, 18).



Ryc. 1. Budowa genu globinowego na przykładzie genu β . Sekwencje kodujące eksonów — czarne prostokąty, introny — białe prostokąty, niekodujące sekwencje 3' i 5' — zakreskowane prostokąty. Zaznaczono miejsca występowania charakterystycznych dla genów globinowych sekwencji opisanych w tekście: (1), (2) — odpowiedzialne prawdopodobnie za inicjację transkrypcji, (3) — odpowiedzialne za przyłączanie kapturka, (4), (5), (6), (7) — charakterystyczne sekwencje na złączach ekson-intron, (8) — sekwencja odpowiedzialna za poliadenylację.

i $\alpha 2$ kodują identyczne białka (15). W obu genach IVS1 ma długość 113 par zasad, IVS2 zaś liczy w $\alpha 1$ 141 a w $\alpha 2$ 150 par zasad. Oprócz 9-cio nukleotydowej insercji różnice sekwencji w IVS2 dotyczą poszczególnych par zasad, a sekwencje IVS1 w obu genach są identyczne. Pełną homologię wykazują także sekwencje niekodujące od strony 5' i eksony 1 genów $\alpha 1$ i $\alpha 2$, a eksony 2 różnią się tylko pojedynczymi parami zasad w trzech pozycjach kodonów. Natomiast niekodujące sekwencje od strony 3' wykazują różnice sięgające 20% (10, 16).

W genie $\psi\alpha$ są zarówno podstawienia zasad, jak i delecje. W sumie sekwencja DNA tego pseudogenu różni się od sekwencji genu $\alpha 2$ w 21,8% tj. wykazuje 79,2% homologii (19).

Jak się okazało, z dwu genów ζ kodujących hemoglobinę zarodkową typu α , tylko jeden, pierwotnie nazwany $\zeta 2$, a obecnie $\zeta 1$ jest działający, drugi zaś jest pseudogenem $\psi\zeta$ (18, 20). Sekwencje eksonowe obu genów ζ różnią się tylko trzema parami nukleotydów, lecz skutkiem jednego z podstawień jest zmiana kodonu szóstego w kodon terminacyjny. Tak zmutowany gen nie może sterować syntezą biologicznie aktywnego polipeptydu i dlatego uznany został za pseudogen. Sekwencje kodujące genów ζ i α wykazują około 65% homologii (20, 21), lecz introny różnią się i rozmiarem i strukturą. IVS1 genu $\zeta 1$, o długości 886 par nukleotydów, zawiera 12 razy powtórzoną sekwencję 14-nukleotydową, zaś w IVS2 liczącym 239 par nukleotydów jest 35 kopii charakterystycznej sekwencji pentanukleotydowej.

W intronach $\psi\zeta$ liczba powtórzeń tych samych sekwencji jest znacznie wyższa. Rola powtórzonych sekwencji nie jest znana (20).

W skład rodziny genów typu β wchodzi geny ϵ , G_γ , A_γ , $\psi\beta$, δ i β (ryc. 2B). Pseudogen $\psi\beta$ nie został jeszcze zsekwencjonowany. W pozostałych genach pierwszy intron, IVS1, znajduje się między 30 a 31 kodonem i liczy 122—130 par nukleotydów. Drugi intron, IVS2, jest między 104 a 105 kodonem i liczy 850—904 par nukleotydów. A więc we wszystkich tych genach eksony są jednakowo długie i wykazują dużą homologię, natomiast długość intronów waha się w pewnych granicach (11, 12, 13, 14, 22).

Poliptydy kodowane przez geny A_γ i G_γ różnią się tylko jednym aminokwasem (odpowiednio Ala i Gli). Natomiast poliptydy δ i β różnią się dziesięcioma aminokwasami (11, 14).

W poszczególnych parach genów typu β różnice sekwencji zasad dotyczą więc głównie intronów. Jak dotąd znana jest sekwencja zasad w jednym sklonowanym genie G_γ i dwu sklonowanych genach A_γ , pochodzących z dwóch homologicznych chromosomów. Okazało się, że różnice w sekwencji zasad IVS2 dwu allelicznych genów A_γ są większe niż w każdym z tych genów i genie G_γ (11).

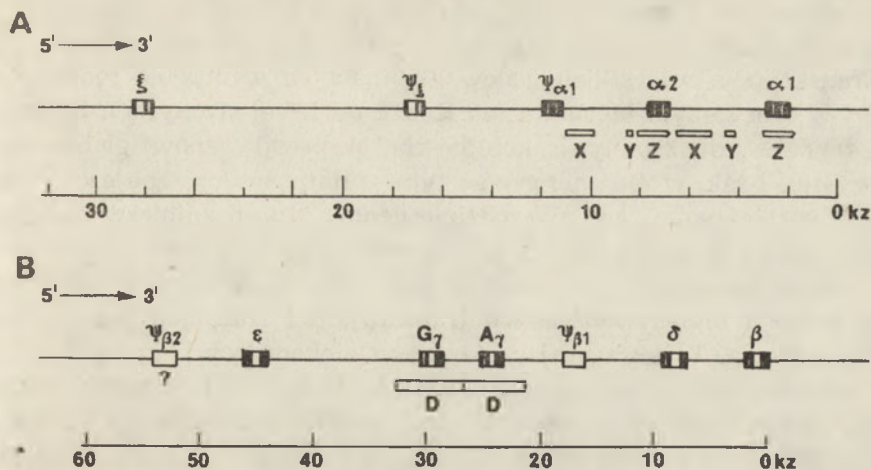
Badanie sekwencji złącz intron-ekson ujawniło dodatkową charakterystyczną cechę genów globinowych. Zawierają one ośmionukleotydową sekwencję (A) na 3' końcu eksonu 1 powtórzoną na 5' końcu eksonu 3 oraz dziewięcionukleotydową sekwencję (B) na 5' końcu eksonu 2 powtórzoną na początku eksonu 3 w stronę 3' za sekwencją (A).

Układ powtórzonych sekwencji przedstawiono na rysunku 1 (12).

V. Układ genów globinowych w obrębie rodziny i ich ekspresja

Rodzina genów typu α człowieka znajduje się w chromosomie 16 (23, 24). Są one rozmieszczone w odcinku DNA liczącym około 28 kz (Ryc. 2A). Geny $\alpha 2$ i $\alpha 1$ powstały w wyniku podwojenia fragmentu DNA liczącego blisko 4 kz. O tym, że nie tylko same geny $\alpha 2$ i $\alpha 1$, ale i sąsiadujące z nimi sekwencje wykazują dużą homologię świadczy fakt, że udało się odcinki DNA zhybrydyzować ze sobą. Okazało się, że każdy z powtórzonych fragmentów DNA zawiera po dwie „wstawki”. Są to sekwencje wynoszące po kilkaset par zasad, różne w każdym z powtórzonych fragmentów, ale wbudowane w te same miejsca. Powstanie genów $\alpha 2$, $\alpha 1$ i $\psi\alpha$ mogło być wynikiem tryplikacji, a gen $\psi\alpha$ znajduje się w trzeciej kopii takiego samego fragmentu DNA (15, 19, 25).

Wiadomo, że w rozwoju ewolucyjnym duplikacja genów α była wydarzeniem bardzo odległym. Ponieważ oba geny α mają identyczne sekwencje kodujące i wykazują wysoką homologię sekwencji intronowych zakłada się, że ich ewolucja przebiega łącznie. Mechanizmem zapewniającym taką zgraną (*concerted*; wg 16, 20, 25, 26) ewolucję byłaby rekombinacja zachodząca nie tylko między parami genów allelicznych, tj. znajdujących



Ryc. 2. Rodziny genów globinowych: (A) Rodzina genów globinowych typu α (15). Na rysunku zaznaczono położenie obszarów X, Y, Z będących częściami powtórzonej sekwencji przedzielonej „wstawkami” o różnej długości (25). (B) Rodzina genów globinowych typu β (12). Zaznaczono powtarzające się sekwencje D wskazujące na zasięg podwójonej sekwencji obejmującej geny γ (32).

się w tych samych miejscach chromosomów homologicznych $\alpha 1/\alpha 1$ i $\alpha 2/\alpha 2$, także między nieallelicznymi genami $\alpha 1/\alpha 2$. Za taką możliwością przemawiają dane pochodzące z badań nad talasemią, które omówimy później. Bardzo duże podobieństwo sekwencji kodujących genów ξ i $\psi\xi$ mogło być wynikiem łącznej ewolucji także tej pary genów (15, 20).

Rodzina genów typu β występuje w chromosomie 11 człowieka (27, 28) (Ryc. 2). Są one rozmieszczone w odcinku DNA liczącym około 51 kz (12, 29, 30). Wstępne badania sugerowały, że w skład tej rodziny wchodzi jeszcze jeden pseudogen β (na Ryc. 2 w kierunku 5' od genu ϵ), zaprzeczyły temu jednak późniejsze badania (31).

Zsekwencjonowano zawierający geny G_γ i A_γ fragment DNA o długości 11 kz. Okazało się, że zawiera on podwójną sekwencję o długości 5 kz. Geny G_γ i A_γ leżą w środkowych częściach podwójnych odcinków. Sekwencje zasad na prawo i lewo od powtórnego fragmentu wykazują 20—25% homologii. Sekwencje w odcinkach zduplikowanych, ale poza genami γ wykazują 80—85% homologii. Natomiast odcinki DNA rozpoczynające się około 400 par zasad w kierunku 5' od początku każdego z genów γ i kończące się blisko końca 3' IVS2 wykazują 98% homologii. Tu więc sytuacja jest klarowniejsza niż w przypadku genów α . Pierwotny gen γ globinowy uległ duplikacji wraz z sąsiadującymi z nim odcinkami DNA. Na podstawie różnic w sekwencjach zasad na tych odcinkach oszacowuje się, że duplikacja zaszła przed 34 mln lat. Natomiast ewolucja samych genów A_γ i G_γ przebiega łącznie dzięki zachodzącej co pewien

czas rekombinacji między nimi. Shen i wsp. (32) oszacowuje, że ostatnia rekombinacja między genami G_γ i A_γ zaszła przed milionem lat.

Transkrypcja wszystkich genów globinowych w obrębie rodziny zachodzi w tym samym kierunku (na Ryc. 2 od lewej strony, 5'). Kierunek transkrypcji jest zgodny z kolejnością ekspresji genów globinowych w rozwoju. I tak, w rodzinie genów typu α najpierw następuje ekspresja genu ζ , później zaś $\alpha 2$ i $\alpha 1$. W rodzinie genów typu β najpierw następuje ekspresja genu ϵ , później zaś G_γ i A_γ , a jeszcze później — δ i β .

Zależność między pozycjami par genów funkcjonujących w tym samym czasie i intensywnością ich transkrypcji i translacji jest bardziej skomplikowana. Wykorzystując różnice w niekodujących końcach 3' genów $\alpha 1$ i $\alpha 2$ (hybrydyzacja cDNA-mRNA, trawienie hybrydów nukleazą S1) oszacowano, że w erytroblastach mRNA pochodzące z genów $\alpha 1$ i $\alpha 2$ występują w proporcjach 1,5:1 (33) lub około 2,5:1 (34, 35). Względne ilości polipeptydów pochodzących z transkrypcji obu genów i translacji odpowiednich mRNA określono badając hemoglobinę osobnika zawierającego zmutowany gen $\alpha 2$: mutacja ta powodowała substytucję jednego aminokwasu, co modyfikowało ruchliwość elektroforetyczną polipeptydu. Okazało się, że mimo różnicy w liczbie cząsteczek mRNA pochodzących z genów $\alpha 1$ i $\alpha 2$, liczba polipeptydów pochodzących z obu genów jest taka sama. Autorzy (34) przypuszczają, że niekodujący fragment 3' mRNA może wpływać na wydajność translacji. Być może chodzi tu o stabilność mRNA.

Ponieważ polipeptydy kodowane przez geny G_γ i A_γ różnią się jednym aminokwasem, względnie łatwo było oszacować udział obu tych genów w produkcji polipeptydu γ . W rozwoju embrionalnym, po wyłączeniu genu ϵ proporcja polipeptydów G_γ i A_γ wynosi 7:3. Później, gdy rozpoczyna się ekspresja fenotypowa genów δ i β , następuje gwałtowne ograniczenie ekspresji genów γ . Towarzyszy temu zmiana proporcji polipeptydów G_γ : A_γ ; wynosi ona 2:3 (36).

Polipeptydy δ i β występują w proporcji 1:45 (4). Wydaje się, że gdyby gen δ przestał funkcjonować, nie miałoby to wyraźnego wpływu na poziom hemoglobiny. Gen δ jest więc „kandydatem” na pseudogen.

VI. Talasemie

W pewnym uproszczeniu można wyróżnić dwa typy anemii dziedzicznych spowodowanych zmianami w hemoglobinie. Do pierwszej zalicza się hemoglobinopatie. Są to wywołane mutacjami w odpowiednich genach podstawienia aminokwasów w polipeptydzie typu α lub β , przy zachowaniu normalnej proporcji 1:1 w ilości obu polipeptydów. Opisano kilkadziesiąt różnych typów podstawień aminokwasów. Podręcznikowym przykładem tego typu schorzeń jest anemia sierpowata.

Drugą grupę stanowią anemie ogólnie objęte nazwą talasemii (*thalassemia*). Ich wspólną cechą jest niedobór lub brak bądź polipeptydu α bądź typu β (3, 4, 5). Do niedawna molekularne podstawy talasemii nie były znane (37). Anemia była klasyfikowana jako α talasemia, gdy we krwi płodów występowała hemoglobina Barta (γ_4) a w późniejszym okresie rozwoju HbH a więc gdy stwierdzono niedobór polipeptydu α . Występowanie we krwi Hb α (α_4) klasyfikowano jako β talasemię. Hemoglobiny złożone z 4 identycznych polipeptydów łatwo ulegają denaturacji. Ich wysoki poziom w erytrocytach powoduje anemię hemolityczną (degradacja erytrocytów). Krańcowym przypadkiem talasemii jest zupełny brak polipeptydu typu α lub β . Są to odpowiednio α^0 i β^0 talasemie. W przypadkach mniej krańcowych polipeptyd α lub β jest syntetyzowany w mniejszej ilości. Są to odpowiednio α^+ i β^+ talasemie (3, 4, 5).

Jak wiemy, u człowieka zdrowego w każdym z dwu chromosomów homologicznych występują po dwa geny α i para genów δ i β . Gdy jeden z genów α nie funkcjonuje, organizm ma trzy kopie normalnych genów α i wobec tego występuje w nim lekki niedobór polipeptydu α , nie zawsze wykrywalny klinicznie. Gdy w jednym z chromosomów homologicznych oba geny α nie funkcjonują (np. nastąpiła delecja fragmentu DNA zawierającego je), taki heterozygotyczny organizm ma dwa normalne geny α , co powoduje wyraźny niedobór polipeptydu α i wyraźne, chociaż niegroźne dla życia objawy anemii. U osobników mających tylko jeden normalny gen α (np. w jednym z chromosomów homologicznych jest delecja obu genów α , w drugim zaś jednego), występuje anemia hemolityczna i powstaje w dużych ilościach hemoglobina Barta, (γ_4) zaś w okresie postnatalnym HbH.

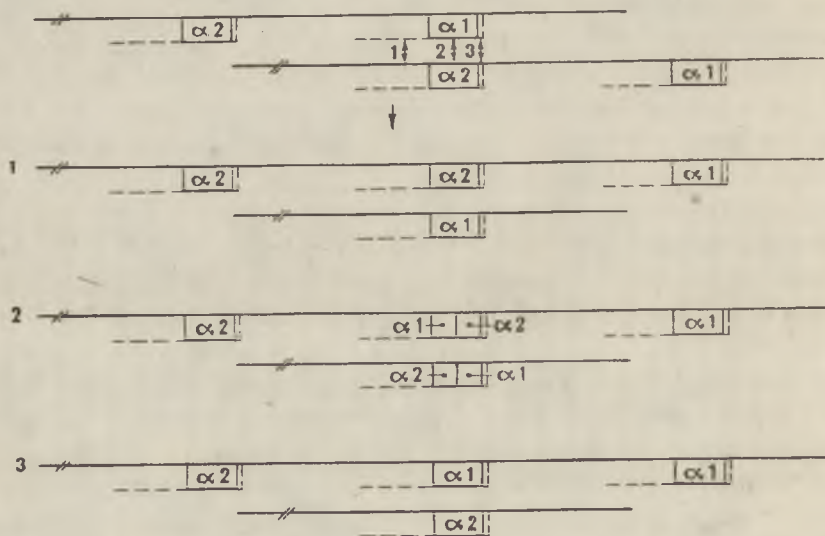
Homozygoty zupełnie pozbawione normalnych genów α umierają w okresie płodowym (*hydrops fetalis*). Poza hemoglobiną Barta wykrywa się w ich krwi hemoglobinę Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (38). Ponieważ większość polipeptydu typu β pochodzi z transkrypcji genu β , mutacje punktowe lub delecje obejmujące ten gen prowadzą do anomalii nawet wtedy, gdy w obu chromosomach homologicznych gen δ jest nie zmieniony. α^0 i β^0 talasemie występują wówczas, gdy w obu chromosomach homologicznych geny α lub β zupełnie nie działają. Natomiast α^+ i β^+ talasemie mogą występować bądź w heterozygotach opisanych wyżej, bądź w homozygotach mających takie mutacje w genach globinowych, które zmniejszają wydajność transkrypcji, powodują niestabilność mRNA itp.

W obszarze genów globinowych mogą zachodzić delecje o dużym zasięgu obejmujące geny β , δ , $\alpha\gamma$, γ lub ich części. Ich fenotypowym efektem są talasemie ($\delta\beta$) i $\gamma\delta\beta$ oraz zaburzenia objęte nazwą HPFH (*hereditary persistence of fetal hemoglobin*). W przypadku HPFH nie obserwuje się anemii, gdyż ekspresja genów trwa w ciągu całej ontogenezy i brak hemoglobin dorosłych HbA i HbA₂, wywołany utratą genów β i δ , kompensuje hemoglobina płodowa HbF (5).

Talasemie występują z dużą częstością w niektórych populacjach ludzi, np. wśród Greków cypryjskich, mieszkańców Sardynii, Arabii Saudyjskiej, w niektórych okolicach Indii, a także wśród Murzynów afrykańskich i amerykańskich. Przypuszcza się, że duża częstość α i β talasemii (do 15% populacji) ma związek z większą odpornością na *Plasmodium malariae* osobników mających łagodne postacie talasemii (stan heterozygotyczny), podobnie jak w przypadku heterozygot pod względem anemii sierpowatej (39). Jeżeli określony typ talasemii występuje w obrębie danej populacji z dużą częstością, może to wskazywać na pochodzenie powodującej go mutacji od wspólnego przodka. Jeśli natomiast określony typ talasemii występuje w zupełnie odrębnych populacjach (np. wśród Murzynów i Hindusów) sugeruje to, że jakieś właściwości genomu stwarzają predyspozycje do niezależnego powstawania tego właśnie typu talasemii.

VI-1. α talasemie

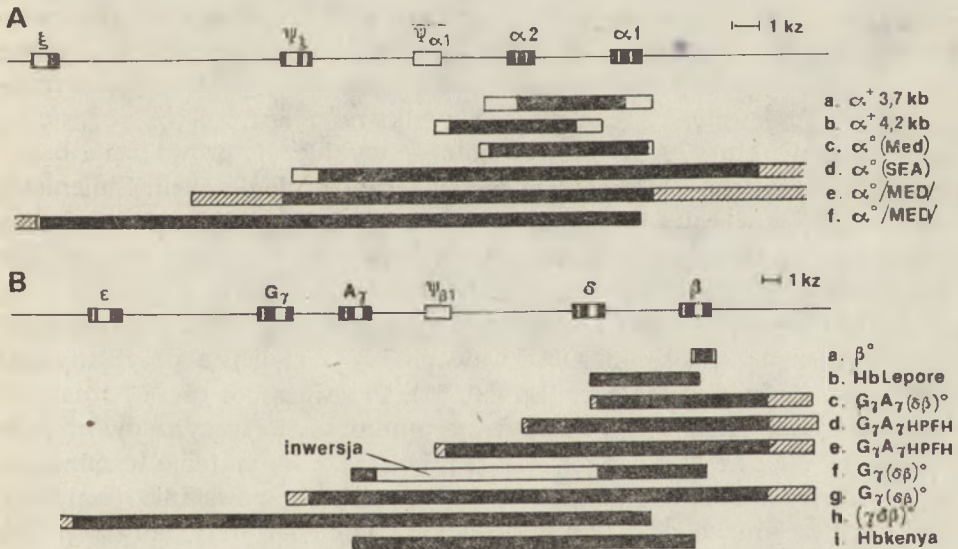
Z punktu widzenia podstaw molekularnych można wyróżnić 2 typy α talasemii. Do pierwszego zalicza się utratę fragmentów DNA, drugi zaś



Ryc. 3. Nierówny crossing over między genami $\alpha 2$ i $\alpha 1$. Oba geny są częściami podwojonych fragmentów DNA na rysunku zaznaczonych linią kreskowaną. Crossing over może zajść między homologicznymi fragmentami poza genami $\alpha 1$ i $\alpha 2$ w kierunku 5' (1) i wówczas powstanie chromosom mający dwa geny $\alpha 2$ i jeden $\alpha 1$ oraz chromosom mający jedynie gen $\alpha 1$. Jeśli crossing over zajdzie w obrębie genów $\alpha 2$ i $\alpha 1$, powstanie chromosom z tryplikacją przy czym środkowy gen będzie miał część 5' pochodzącą z $\alpha 1$, 3' zaś z $\alpha 2$. Drugi chromosom będzie miał pojedynczy gen α : jego część 5' będzie z $\alpha 2$, 3' zaś z $\alpha 1$ (2). Jeśli wreszcie crossing over zajdzie poza genami α w miejscu 3, chromosom z tryplikacją będzie miał jeden gen $\alpha 2$ i dwa $\alpha 1$; chromosom z delecją będzie miał gen $\alpha 1$ (33).

jest wynikiem mutacji punktowych w genach α . Mogą być utracone: jeden z dwu genów α , oba te geny, a nawet większe fragmenty DNA przenoszącego rodziny genów globinowych (Ryc. 4A; 38, 40, 41). Najczęściej spotykanym typem α^+ talasemii jest utrata jednego z dwu genów α wraz z fragmentem DNA liczącym 3,7 kz lub 4,2 kz. Zakłada się, że pierwszy z tych przypadków jest wynikiem nierównego *crossing over* między największymi z powtórzonych sekwencji DNA (ryc. 3). Zależnie od tego, w którym miejscu zaszła wymiana odcinków DNA, w genomie może pozostać gen $\alpha 1$, $\alpha 2$, lub gen zrekombinowany, mający część 5' genu $\alpha 2$ i 3' genu $\alpha 1$. Utrata jednego z genów α wraz z 4,2 kz fragmentem DNA też mogłaby być wynikiem nierównego *crossing over* (5, 33). Mechanizm utraty większych fragmentów DNA nie jest znany.

Następujące dane wskazują, że utrata odcinka DNA wynoszącego 3,7 kz jest wynikiem nierównego *crossing over*. Jak widać na ryc. 3, nierówny *crossing over* powinien powodować powstawanie chromosomów z jedną kopią genu α oraz odwrotnych produktów takiej samej wymiany, mających trzy kopie tego genu. Wykryto kilka tego rodzaju przypadków (5, 40). Osobniki mające w jednym chromosomie normalne dwie kopie genu α , w drugim zaś trzy kopie nie mają zaburzeń hematologicznych mimo zwiększonej dawki genów α . Jak się wydaje, w populacjach goryli często występują osobniki mające zarówno pojedyncze kopie genów α jak i potrójne (26). Dane te wskazują, że rekombinacja między nieallelicznymi



Ryc. 4. Utrata DNA powodująca α (A) i β (B) talasemie. Brakujące odcinki zaznaczono na czarno. Obszary niezaczernione wyznaczają granice, między którymi normalnie występuje utracony odcinek DNA. W przypadku, gdy granice utraconego odcinka nie zostały ściśle określone, maksymalny ich zasięg oznaczono jako obszar zakresowany.

genami α globiny rzeczywiście zachodzi. Skoro zachodzi pojedynczy cross-ing over, można oczekiwać zachodzenia także podwójnego crossing over oraz rekombinacji niewzajemnej (konwersji genu). Oba te typy wymiany DNA między anieallelicznymi genami umożliwiałyby ich zgraną ewolucję.

Mniej liczne są przypadki α talasemii spowodowanych przez małe delecje oraz mutacje punktowe. Ich molekularne podstawy są podobne do różnych typów β talasemii (5, 43, 42, 44), które szczegółowo omówimy dalej. Na uwagę zasługuje jeden z przypadków α talasemii spowodowanej mutacją punktową. W jej wyniku nastąpiła substytucja Leu \rightarrow Pro w pozycji 125 polipeptydu α . Ta końcowa część polipeptydu (kodowana przez ekson 3) jest odpowiedzialna za tworzenie dimerów $\alpha_1\beta_1$, które są pierwszym etapem powstawania tetrameru $\alpha_2\beta_2$. W wyniku substytucji Leu \rightarrow \rightarrow Pro utrudnione jest powstawanie dimeru, powstają natomiast tetramery β_4 , (HbH) i na tej podstawie zaklasyfikowano ten przypadek jako α talasemię (35). A więc wyróżnianie talasemii od innych genetycznie uwarunkowanych wad hemoglobiny jest w istocie względne.

VI-2. Talasemie β ; mechanizmy wycinania intronów

Gen β -globiny występuje w chromosomie tylko w pojedynczej kopii. Można więc wiązać pojedynczą zmianę w DNA — co daje się obecnie precyzyjnie określić dzięki opanowaniu techniki klonowania i sekwencjonowania genów — z efektem fenotypowym wywołanym przez tę zmianę i obserwowanym na poziomie białka lub mRNA. Istnieje teoretyczna możliwość, że obserwowany fenotyp jest wynikiem zmian w DNA w sąsiedztwie genu struktury. Aby tę ewentualność wykluczyć, prowadzono badania ekspresji allelu β talasemii w systemach heterologicznych. Zmieniony gen β -globiny wprowadzano do komórek innego organizmu i porównywano wywołane w ten sposób zmiany fenotypowe na poziomie mRNA ze zmianami w komórce macierzystej (45, 46, 47, 48, 49).

Molekularne podstawy większości β -talasemii są odmienne od omówionych przyczyn α -talasemii. Obserwowano tylko nieliczne przykłady delecji prowadzących do talasemii β (50, 51). Przeważająca część poznanych talasemii wywołana jest przez mutacje punktowe. Przyczyną dwóch opisanych niezależnie przypadków talasemii okazały się mutacje terminacyjne w 17 i 39 kodonie mRNA, co uniemożliwiało powstanie β globiny (52, 53). Przekonano się o tym sekwencjonując cDNA otrzymany z mRNA komórek talasemicznych. W jednym przypadku wykazano, że mutacja terminacyjna podlega supresji w układzie *in vitro*: gdy do mieszanki inkubacyjnej zawierającej mRNA z komórek talasemicznych dodawano supresorowy tRNA z drożdży, powstawał normalny polipeptyd globinowy (54).

Znaleziono także przypadek β^0 talasemii, która spowodowana była utratą dwóch nukleotydów w kodonie na ósmy aminokwas β globiny. Na skutek delecji nastąpiła zmiana fazy odczytu, a w konsekwencji powstał kodon terminacyjny (53).

Bardzo ciekawe są przykłady talasemii β wywołanych przez mutacje punktowe lub małe delecje, które prowadzą do anormalnej obróbki mRNA. W takich przypadkach albo dojrzały mRNA jest nietrwały (55) lub tak zmieniony, że globina w ogóle nie jest produkowana (fenotyp β^0), (56, 57, 58, 59, 60), albo normalny mRNA może powstawać w mniejszej ilości, ewentualnie obok mRNA zmienionego (fenotyp β^+) (45, 47, 61). Aby poznać mechanizmy zmieniające obróbkę mRNA omówimy szczegółowo kilka przykładów.

W jednym z przypadków β^+ talasemii wykazano, że w komórkach szpiku kostnego pacjenta gromadził się defektywny prekursor mRNA (62). Znakowano go pulsowo i hybrydyzowano ze znanymi, znakowanymi fragmentami cDNA α i β globiny. Oznaczano w ten sposób ilościowo stosunek $\text{mRNA}_\alpha:\text{mRNA}_\beta$. W zdrowej komórce stosunek ten równy jest jedności, gdyż ilości α i β globiny są równe. W komórkach z talasemią β ilość mRNA_α przewyższała znacznie ilość mRNA_β , co wskazywało na jego gromadzenie. Stosując określone fragmenty restrykcyjne cDNA $_\beta$ zmapowano orientacyjnie dany mRNA_β i stwierdzono, że był on nienormalnie długi i zawierał fragmenty intronów. Można przypuszczać, że był to produkt przejściowy obróbki pre-mRNA.

W większości przypadków talasemii stwierdzono jednak, że jeśli powstawał defektywny mRNA_β to był on niestabilny i ulegał degradacji przez enzymy komórkowe lub nie był transportowany z jądra do cytoplazmy (45, 46, 55, 62). Opisano przypadek β^0 talasemii, gdzie mRNA powstawał, podlegał normalnej obróbce i był poliadenylowany, lecz z niewiadomych przyczyn wykazywał niestabilność (55). Degradację tego mRNA badano znakując go pulsowo i hamując transkrypcję przez dodanie aktynomycyny. Próbkę mRNA przed i po dodaniu aktynomycyny analizowano przez hybrydyzację ze znanymi, znakowanymi fragmentami cDNA. Różnice między mRNA ze zdrowych komórek i mRNA z komórek pacjenta są niewykrywalne.

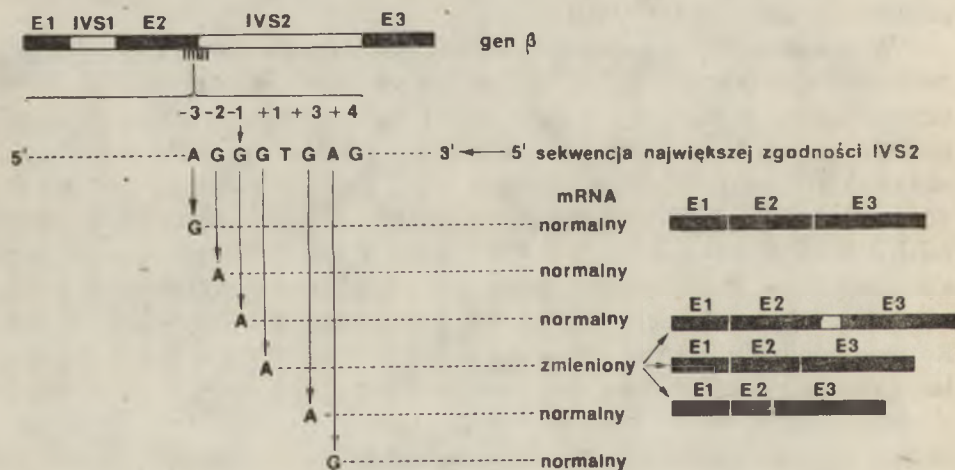
Stwierdzono, że po zahamowaniu transkrypcji intensywność prążka odpowiadającego mRNA z komórek dotkniętych talasemią β^0 malała, co było dowodem na jego degradację.

Opracowanie techniki sekwencjonowania DNA umożliwiło określenie pojedynczych zmian nukleotydów w genie β , które powodowały defekty w obróbce mRNA i fenotyp β -talasemii. Wyniki te można traktować jako wstęp do szerokiego i zupełnie nie poznanego tematu regulacji ekspresji genów u organizmów wyższych.

Dyskutowany jest obecnie mechanizm wycinania sekwencji intronowych z pre-mRNA czyli tzw. składania. Poznano już sekwencje kilku-

dziesięciu intronów. Przy ich porównaniu (63) okazało się, że złącza intronu i eksonu mają zawsze te same sekwencje, tzw. sekwencje największej zgodności co można przedstawić następująco:

ekson 5'(C/A) AG↓ GT (G/A) AGT ----- sekwencja intronowa ----- (C/T)_nN (T/C) AG↓ G3'ekson. Strzałki oznaczają miejsca wycinania na granicy intronów z eksonami. Przypuszcza się, że za wycinanie intronów odpowiedzialny jest specyficzny kompleks rybonukleoproteidowy, który prawdopodobnie przesuwają się po nici mRNA od końca 5' do końca 3', przy czym tzw. U1 RNA będący jego składnikiem umożliwia rozpoznanie i dopasowanie początkowej i końcowej sekwencji intronu, co warunkuje jego wycięcie (64, 65, 66). Wyniki prac nad molekularnym podłożem β talasemii tworzą jeden z modelowych układów do badania obróbki mRNA u eukariontów wyższych. Opisano kilka przykładów β^+ talasemii spowodowanych pojedynczą substytucją G \rightarrow A wewnątrz intronu 1 (ISV1) genu β na 21 nukleotydów przed jego 3' końcem (47, 61). Podstawienie to generowało nowe miejsce 3' cięcia i składania IVS1, które okazywało się bardziej efektywne niż zmienione miejsce pierwotne. Powstawało więc 80—90% defektywnego mRNA oraz 10—20% właściwego mRNA _{β} . Defektywny mRNA analizowano poprzez mapowanie endonukleazą S1 i sekwencjonowanie komplementarnego cDNA. Stwierdzono, że wskutek wykorzystania nowego miejsca cięcia i składania zawierał on 19-to nukleotydową wstaw-



Ryc. 5. Kierowana mutageneza poszczególnych nukleotydów na złączu eksonu 2 i intronu 2 genu β -globiny. Tylko zamiana zasad w pozycji +1 powoduje utratę aktywności sekwencji największej zgodności jako miejsca wycinania intronu. Ujawniają się w tym wypadku trzy inne miejsca cięcia i składania, jedno wewnątrz IVS2, a dwa wewnątrz eksonu 2 (E2). Zidentyfikowano w tym przypadku trzy rodzaje mRNA. Wykorzystanie miejsca cięcia i składania wewnątrz IVS2 daje mRNA dłuższy od normalnego o wstawkę sekwencji z 5' końca IVS2. Jeżeli wycinanie odbywa się z udziałem sekwencji wewnątrz E2, to powstałe mRNA są krótsze od normalnego.

kę z końca 3' IVS1, która powodowała przesunięcie fazy odczytu uniemożliwiając syntezę białka. Zaburzenie w wycinaniu IVS1 wpływało też hamująco na wycinanie drugiego intronu (IVS2).

Szczegółowo badano efekty mutacji punktowych w sekwencji na styku eksonu 2 i IVS2 genu β (5, 49, 67). Stosując metodę kierowanej mutagenazy uzyskano kolekcję sklonowanych genów z pojedynczymi podstawieniami zasad na złączu 5'IVS2 (rys. 5).

Ekspresję zmienionych w ten sposób genów β badano w komórkach HeLa. Stwierdzono, że mutacje w pozycjach -1, -2, -3 (tj. w ostatnim tryplecie eksonu 2) oraz +3, +4 względem miejsca cięcia nie miały wpływu na strukturę, ilość oraz trwałość mRNA _{β} . Mutacje te nie powodowały więc fenotypu talasemii. Natomiast efektem mutacji G \rightarrow A w pozycji +1 (w pierwszej zasadzie IVS2) była całkowita inaktywacja złącza 5', a w konsekwencji odpowiednik fenotypu β^0 talasemii. Jak się okazało, gdy właściwe złącze 5' ulegało inaktywacji, przecinanie pre-mRNA zachodziło w innych miejscach o sekwencjach podobnych do sekwencji 5' największej zgodności. Stwierdzono bowiem, że produktami transkrypcji genu, w którym wywołano podstawienie zasad w pozycji +1 IVS2 były 3 rodzaje mRNA o różnych długościach. Aby zlokalizować te zastępcze miejsca wycinania zsyntetyzowano cDNA na matrycach tych trzech rodzajów mRNA. Stwierdzono, że jedno z nowych zastępczych miejsc wycinania znajduje się w pozycji +4 IVS2 i wykorzystywane jest w 30%. Dwa pozostałe miejsca wycinania o wydajnościach 20 i 50% zlokalizowano w eksonie 2 odpowiednio na 52 i 136 nukleotydów przed jego 3' końcem. Sekwencja jednego z tych miejsc była TAA⁺GCTAG, czyli wycięty w tym miejscu fragment nie zaczynał się od GT, jak to przewidują przyjmowane do tej pory reguły (68).

Mimo to cięcie i składanie mRNA zachodziło. Co dziwniejsze, analiza sekwencji drugiego eksonu wykazała, że w odległości 91 nukleotydów przed jego 3' końcem, czyli pomiędzy dwoma wykorzystywanymi alternatywnie miejscami cięcia i składania jest dodatkowa sekwencja największej zgodności. Zupełnie nie wiadomo, dlaczego sekwencja ta jest nieaktywna jako miejsce wycinania nawet w zmutowanym genie β . Być może ma na to wpływ drugo- lub trzecio-rzędowa struktura RNA lub jeszcze inne, trudne do przewidzenia czynniki.

Wpływ wykorzystania zastępczych miejsc cięcia i składania na ekspresję genu badano na przykładzie genu β^E globiny, w którym zaszła mutacja GAG \rightarrow AAG powodująca podstawienie Glu \rightarrow Lys w 26 kodonie genu β (48). Gen β^E sklonowano i badano jego ekspresję w komórkach HeLa. Jak się okazało, mRNA genu β^E był w 5–8% defektywny. A zatem mutacja punktowa w kodonie 26, a więc odległa o 4 kodony od końca eksonu 1, powodowała powstanie zastępczego miejsca cięcia i składania IVS1. W ten sposób mutacje eksonowe mogą mieć wpływ na obróbkę mRNA, a w konsekwencji zmieniać poziom ekspresji genu.

Pośród wielu przebadanych dotychczas przypadków β^0 i β^+ talasemii zidentyfikowano dotychczas tylko jedną mutację, która miała wpływ na transkrypcję genu β . Jedynym takim przykładem jest pojedyncze podstawienie $C \rightarrow G$ na 87 nukleotydów w kierunku 5' przed miejscem przyłączenia kapturka. Mutacja ta zaszła prawdopodobnie w miejscu odpowiedzialnym za inicjację transkrypcji (69).

Analiza sumaryczna opisywanych dotychczas przypadków β talasemii prowadzi do innych ciekawych wniosków. W genie i obszarze otaczającym ten gen stwierdzono pewne różnice w liczbie i rozmieszczeniu miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Są różne „ciche” substytucje zasad, nie dające efektów fenotypowych. Sklasyfikowano je na określone haplotypy.

W populacji śródziemnomorskiej wyróżniono 9 takich haplotypów. Nowym spostrzeżeniem okazało się sprzężenie określonych typów talasemii z określonymi haplotypami. W przybliżeniu można więc powiedzieć, że określona sekwencja zasad w genie stwarza predyspozycję do ściśle określonych mutacji wywołujących talasemię (69).

Odmianą grupą defektów molekularnych w obszarze genów grupy β jest utrata fragmentów DNA o różnej długości. Jednym z powodów β^0 talasemii była utrata DNA obejmująca 3' część intronu II genu β , ekson 3 oraz część sekwencji niekodującej od strony 3' genu β . Jej zasięg oszacowano na około 600 nukleotydów na podstawie analizy heterodupleksów fragmentów DNA genów z komórek zdrowych z odpowiednimi fragmentami z komórek talasemicznych metodą mikroskopii elektronowej (50, 51) (ryc. 4b). Niektóre formy HPFH i talasemie są skutkiem utraty większych fragmentów DNA. W przeważającej większości przypadków brak produkcji δ i β globin kompensują G_γ lub A_γ i A_γ globiny — w zależności od tego talasemie tej grupy klasyfikuje się na $G_\gamma(\delta\beta)^0$ lub $G_\gamma A_\gamma(\delta\beta)^0$.

Badanie związku między długością utraconych fragmentów DNA a poziomem ekspresji genów grupy β pozwala na wskazanie obszarów odpowiedzialnych za regulację produkcji globin. Chodzi tu głównie o γ -globinę, główny składnik hemoglobiny płodowej (HbF) produkowany w wieku dorosłym na minimalnym poziomie ($< 1\%$). Molekularny mechanizm „wyłączania” genów γ nie jest dotychczas poznany.

$G_\gamma A_\gamma(\beta\delta)^0$ talasemie wywołane są utratą fragmentu DNA od części 5'IVS2 genu δ do nieznanego dokładnie miejsca w kierunku 3' od genu β (Ryc. 4B) (70). Chociaż globiny δ i β nie są w tym wypadku produkowane, anemia nie jest tak ostra jak w przypadku talasemii β^0 , gdyż poziom HbF jest podwyższony do 5—20%. W przypadku talasemii Lepore (71) (ryc. 4B), gdzie utracona jest sekwencja od intronu 2 genu δ do intronu 2 genu β , poziom HbF stanowi 1—5% normalnej ilości hemoglobiny. Porównanie poziomu γ globiny w obu tych przypadkach sugeruje częściową odpowiedzialność sekwencji w DNA położonych po stronie 3' genu za regulację ekspresji genów γ .

Dwa różne przypadki HPFH były spowodowane utratą fragmentów DNA obejmujących całe geny δ i β (72); w jednym przypadku utracona była m.in. część sekwencji Alu położona między genami δ i γ , w drugim przypadku od strony 5' utracony fragment był o 5 kZ dłuższy. Na tej podstawie przypuszcza się, że właśnie dzięki utracie wspomnianej sekwencji Alu, u pacjentów w okresie postnatalnym nie następuje „wyłączanie” genów γ i γ . Dzięki temu brak produkcji HbA i HbA₂ kompensowany jest przez HbF. Nie wiadomo, jak długie odcinki DNA w kierunku 3' od genu β utracone są u pacjentów mających HPFH. Wiadomo jednak, że w obszarze położonym po stronie 3' genu β znajduje się także sekwencja Alu, która *in vitro* może służyć jako promotor długiego (2,3 kZ) transkryptu o nieznanej funkcji (73). Nie wiadomo, czy *in vivo* zachodzi transkrypcja tego odcinka, ale można i ten proces wiązać z regulacją ekspresji genów globinowych.

Zidentyfikowano 2 rodzaje defektów molekularnych wywołujących ten sam fenotyp $\gamma(\delta\beta)$ talasemii. Jednym z nich jest inwersja obszaru położonego między genami γ a δ , połączona z utratą końców odwróconego odcinka (Ryc. 4B) (74). Innym przypadkiem talasemii $\gamma(\delta\beta)$ jest utrata całego obszaru obejmującego geny γ , δ i β (ryc. 4B) (75).

Sekwencja Alu między genami γ i δ jest w pierwszym przypadku obecna w formie odwróconej, w drugim utracona, a mimo to produkcja γ -globiny nie zachodzi. Widocznie istnienie tylko jednego genu γ (gdyż γ jest w obu tych przypadkach utracony) nie może kompensować braku δ i β globin.

Ciekawym przypadkiem jest utrata DNA powodująca $(\gamma\delta\beta)^0$ talasemie (Ryc. 4B). Utracone są geny γ , γ i δ , gen β zaś pozostał, a mimo to β -globina nie powstaje (76). Wskazuje to na udział utraconych sekwencji DNA w regulacji ekspresji genu β .

Na podkreślenie zasługuje fakt, że chociaż geny należące do rodziny β są transkrybowane niezależnie, ich ekspresja zależy od budowy całego odcinka DNA, w którym są one zlokalizowane. Świadczy o tym fakt, że utrata fragmentów tego odcinka wywołuje zmianę ekspresji genów, które w tym odcinku pozostały, nie wpływa natomiast na ekspresję genów β globinowych znajdujących się w chromosomie homologicznym.

VII. Regulacja ekspresji genów globinowych

Informacje z tego zakresu, bardzo jeszcze niekompletne, pochodzą z trzech typów danych. Pierwszy z nich — to analiza składu hemoglobiny we krwi pacjentów chorych na talasemię. Z reguły przy niedolecyjnych talasemiach synteza polipeptydów wchodzących w skład hemoglobiny embrionalnych (tj. polipeptydów ζ oraz ϵ i γ) ustaje lub gwałtownie zmniejsza się w normalnych okresach rozwoju. Natomiast w przypadkach

talasemii delecyjnych często, chociaż nie zawsze ekspresja genów funkcjonujących w rozwoju embrionalnym trwa dłużej. Embriony mające α^0 talasemię spowodowaną niektórymi delecjami żyją dłużej niż 8 tygodni, a w ich krwi znajduje się pewna ilość hemoglobiny Portland ($\zeta_2\gamma_2$), co wskazuje, że ekspresja genu ζ trwa w nich dłużej niż normalnie (5, 38). Nie jest jasne, czy w rozwoju płodowym heterozygot mających tylko jedną kopię genu α dłużej trwa synteza polipeptydu ζ . Jak już wspomniano, w delecyjnych $\delta\beta$ talasemiach oraz w przypadku HPFH obserwuje się często zwiększoną zawartość HbF.

Jak się wydaje, o tym, czy synteza hemoglobiny płodowej ustanie w określonym etapie rozwoju, czy też będzie trwała dłużej, decyduje nie poziom aktywnej hemoglobiny, tylko struktura fragmentu DNA zawierającego rodzinę genów globinowych. Nie stwierdzono, by geny ζ i ϵ funkcjonowały w okresie postnatalnym (3). W zasadzie do tego typu danych należą próby wszczepienia do zarodków owiec erytroblastów z osobników dorosłych. W płodach obserwowano syntezę hemoglobiny płodowej z własnych gemonów płodów oraz hemoglobiny „dorosłej” z wszczepionych komórek. Nie nastąpiło więc odróżnicowanie komórek „dorosłych” (77).

Drugi typ danych — to zależność ekspresji genów od poziomu metylacji DNA. Jak sugerują wstępne dane, silna metylacja genu uniemożliwia jego ekspresję (78). Geny γ globinowe są słabiej zmetylowane w płodzie, a silniej — w okresie postnatalnym. Przeprowadzono eksperyment polegający na podawaniu pacjentom z β talasemią 5-azacytozyny, która przeszkadza w metylowaniu DNA. Po tygodniu stwierdzono we krwi pacjentów wzrost zawartości HbF. Wyższy poziom HbF utrzymywał się przez następnych 6 tygodni. Nie wykryto we krwi pacjentów polipeptydu ϵ , chociaż kodujące go geny też były słabiej zmetylowane po traktowaniu 5-azacytozyną (79). Warto podkreślić, że jeśli jest prosta zależność między stopniem metylacji genów i ich ekspresją, inne czynniki na pewno odgrywają nadrzędną rolę w tym względzie: w hodowanych *in vitro* fibroblastach człowieka stopień metylacji genów γ wahał się znacznie w cyklu hodowli. W fibroblastach nie zachodzi synteza globiny, metylacja więc genów globinowych nie wpływa na ich ekspresję w tych komórkach (80).

Trzeci typ danych — to analiza ekspresji sklonowanych genów globinowych. Bodaj optymalnym układem do tego typu badań są komórki nerki mały transformowane wirusem SV40 i dzięki temu produkujące wirusowy antygen T niezbędny do replikacji wirusowego DNA (komórki COS). Geny globinowe klonowane są w plazmidzie zawierającym fragment genomu wirusa SV40, który odpowiedzialny jest za inicjację replikacji wirusowego DNA (SV-ORI). Jak się oszacowuje, 10—20% komórek COS pobiera na drodze transfekcji plazmidy zawierające SV-ORI. W ciągu następnych 48 godz. liczba kopii plazmidu w komórkach COS dochodzi do 40 000. Z komórek takich można izolować mRNA globinowy i poddać go szczegółowej analizie.

Stwierdzono przede wszystkim, że mRNA globinowy izolowany z komórek COS jest taki sam, jak mRNA z erytroblastów. A więc transkrypcja sklonowanych genów i obróbka transkryptów zachodzą poprawnie mimo, że własne geny globinowe komórek COS nie są transkrybowane (81, 82).

W genomach co najmniej trzech wirusów zwierzęcych zidentyfikowano sekwencje liczące 72 par zasad (SV40, MSV) lub 68 par zasad (BKV), niezbędne do ekspresji pewnych genów wirusowych. W trzech wymienionych wirusach te sekwencje, nazywane aktywatorami transkrypcji (*activators*: wg 83), mają różną kolejność zasad, ale aktywator pochodzący z MSV umożliwia transkrypcję genów SV40, nie działa więc specyficznie (83). Jak się okazało, intensywność transkrypcji genu $\alpha 1$ zależy wyłącznie od sekwencji zasad normalnie występujących przed miejscem, od którego powinna zaczynać się transkrypcja. Natomiast transkrypcja genu β zachodzi z bardzo małą wydajnością, gdy w plazmidzie nie ma wirusowego aktywatora. Dobudowanie go do plazmidu powoduje 100-krotne zwiększenie intensywności transkrypcji. Dotyczy to zarówno sklonowanego genu β globiny człowieka (81, 82), jak i królika (84, 85).

Sekwencja CCAAT, znajdująca się 67—77 przed miejscem inicjacji transkrypcji (jest to miejsce przyłączania kapturka do mRNA), potrzebna jest do normalnej wydajności transkrypcji genu $\alpha 1$. Natomiast sekwencja ATA, znajdująca się 24—32 pz przed miejscem przyłączania kapturka, potrzebna jest przede wszystkim do tego, by transkrypcja rozpoczęła się we właściwym miejscu. Gdy w plazmidzie sekwencja ATA jest wycięta, transkrypcja zaczyna się w różnych miejscach, często oddalonych o kilkadziesiąt par zasad od normalnego miejsca jej inicjacji (81, 82, 84, 85).

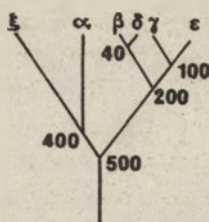
VIII. Ewolucja genów globinowych

Od przeszło 30 lat prowadzone są badania nad konformacją monomerów hemoglobiny i spokrewnionej z nią mioglobiny. Konformacja tych białek jest bardzo podobna, co wskazuje na ich pokrewieństwo. Obserwuje się także pewne różnice, które pozwalają dany polipeptyd zaklasyfikować jako hemoglobinę typu α czy β , lub też mioglobinę. Wątpliwości w tym zakresie mogą bowiem występować przy badaniu globin pochodzących np. z mięczaków (86).

Ustalono sekwencje aminokwasów globin w różnych grupach zwierząt, od mięczaków do ssaków i ptaków. Znane są również dziesiątki substytucji różnych aminokwasów w polipeptydzie α lub β hemoglobiny człowieka powodujące silne ograniczenie lub utratę jej aktywności (37).

Cząsteczka mioglobiny ma 8 segmentów helikalnych i 6 niehelikalnych. Tworzą one hydrofobowe „gniazdko”, w którym umiejscowiony jest hem połączony z dwiema resztkami histydyny wchodzącymi w skład poli-

peptydu. Białka tego rodzaju występują w różnych grupach zwierząt, m.in. w owadach (*Chironomus* — ochotek), a także w brodawkach roślin motylkowych zawierających bakterie *Rhizobium*. Przypuszcza się, że organizmy istniejące na ziemi już przed 1,500 miliardami lat miały białka



Ryc. 6. Drzewo ewolucyjne rodziny genów globinowych. Początki różnicowania się poszczególnych genów podano w milionach lat.

Tabela 1

Ewolucja globin na tle ewolucji zwierząt*

Era geologiczna	Epoka	Początek przed mln lat	Wydarzenia ewolucyjne
Kenozoiczna (czwartorzęd)	Holocen	0,11	Homo erectus, ostatnia konwersja genów $\alpha\gamma$ i $\beta\gamma$ (32)
	Pleistocen	1,0	
Kenozoiczna (trzeciorzęd)	Pliocen	13,0	Dywergencja polipeptydu α człowieka: orangutanga (26) Dywergencja: Australopithecus, małpy czelkowskie
	Miocen	25	Powstają Hominidae
	Oligocen	36	Powstają Anthropoidae; duplikacja genów γ (32)
	Eocen	58	Powstają zwierzęta owadożerne, których potomkami były Anthropoidae
	Paleocen	63	
Mezozoiczna	Kreda	135	Powstają pierwotne ssaki, ptaki i gady
	Jura	181	Z Synapsida powstają gady ssakopodobne
Paleozoiczna	Trias	230	Z Diapsida powstają prątniki i prątniki
	Perm	280	Z Cotylosaurus powstają Synapsida, Anapsida i Diapsida; dywergencja na pierwotne gady i płazy; duplikacja genów α (25)
	Karbon	320	Dywergencja na α i β globiny
	Ordowik	420	
Proterozoiczna	Kambr	500	
		600—1600	Prywitywne rośliny wodne, pierwotniaki, robaki, mięczaki; z protoglobiny, powstają mioglobina i hemoglobina

* (wg. 86)

oddechowe o tego rodzaju budowie. Różnicowanie się tego białka prowadzące do powstania mioglobiny i hemoglobiny rozpoczęło się przed miliardem lat. Pierwotny typ hemoglobiny, występujący dziś w ewolucyjnie bardzo starej grupie ryb bezszczękowych (minogi) funkcjonuje w postaci monomeru tworzącego dimer po utlenowaniu (86). Procesy ewolucyjne prowadzące do powstania α i β globin rozpoczęły się przed 500 milionami lat. Znacznie późniejszy jest początek różnicowania poszczególnych typów α i β globin (Ryc. 6, tab. 1).

Ewolucja genów globinowych podlega ostrej selekcji. W warunkach naturalnych osobniki mające funkcjonalnie niesprawną hemoglobinę nie dożywają do dojrzałości płciowej, a więc nie wydają potomstwa. Jak się wydaje, addycje i delecje w kodujących częściach genów utrzymują się w populacjach rzadko. Polipeptyd α ma 141 reszt aminokwasów we wszystkich zbadanych gatunkach ssaków, u kur, a także u trzaski i żmii. Polipeptyd β ma 146 reszt aminokwasów we wszystkich wymienionych grupach organizmów z wyjątkiem krów i owiec mających polipeptyd liczący 145 reszt aminokwasów. Substytucje aminokwasów zachodzą z częstością o wiele większą. Na przykład polipeptydy α człowieka i konia różnią się 17 aminokwasami, człowieka zaś i kangura — aż 27 aminokwasami.

Porównanie polipeptydu α człowieka i mięczaka *Anadara traperia* pozwoliło na stwierdzenie aż 109 różnic: są to substytucje aminokwasów, a także addycje i delecje. W hemoglobinach różnych organizmów miały więc miejsce liczne podstawienia aminokwasów nie prowadzące do inaktywacji tych białek (86).

Zastanówmy się nad pytaniem, co nowego wnosi do badań nad ewolucją sekwencjonowanie genów globinowych i analiza restrykcyjna segmentów DNA zawierających te geny. Otrzymane wyniki konfrontowane są z danymi paleozoologicznymi. Jest oczywiste, że różnicowanie się z prąoglobiny polipeptydów pochodnych, tj. mioglobiny oraz globin typu α i β musiało być poprzedzone duplikacjami genów wyjściowych. Jak wynika z analizy rodzin genów globinowych, duplikacje tych genów nie są zjawiskiem rzadkim. Poszczególne kopie zduplikowanych genów mogą funkcjonować z niejednakową wydajnością (np. δ i β człowieka). Mutacje powodujące inaktywację genów transkrybowanych wydajnie są w stanie homozygotycznym letalne (np. α^0 i β^0 talasemie). Natomiast mutacje w genach transkrybowanych z małą wydajnością nie muszą być letalne (np. gen ψ). Powstają w ten sposób geny nie funkcjonujące, pseudogeny, ψ . Dobór naturalny, jak wiadomo, działa na fenotypy organizmów. Nie znamy ani mechanizmów naturalnych powodujących nielosowe zachodzenie mutacji (nielosowe jest przeżywanie form zmutowanych, gdy mutacja zmienia fenotypowe cechy organizmów), ani mechanizmów, które prowadziłyby do selektywnej eliminacji nieaktywnych genów z genomów. Pseudogeny byłyby więc zabytkiem ewolucyjnym. W rodzinach genów

globinowych człowieka znaleziono aż trzy pseudogeny (17), można więc przypuszczać, że ogólna liczba pseudogenów jest w naszym genomie olbrzymia. Warto podkreślić, że pseudogeny są doskonałym materiałem do oceny częstości mutacji bez działania presji selektywnej, tj. bez eliminowania z populacji osobników mających mutacje obniżające szanse przeżycia.

Poza człowiekiem, badane są geny globinowe gryzoni (królik, mysz), owiec, kóz, a także kur i żab (*Xenopus laevis*). *X. laevis* ma geny α i β globinowe w tych samych segmentach DNA (88). Pozostałe organizmy mają rodziny genów typu α i β w różnych chromosomach (25, 89—92). Wynika z tego, że albo translokacja prowadząca do rozdzielenia genów α i β globinowych zaszła zanim z *Cotylosaurus* powstały *Synapsida* i *Diapsida* (Tabela 1), albo też translokacje zachodziły w praprzodkach obecnych ptaków i ssaków niezależnie.

We wszystkich wymienionych wyżej organizmach embriony (i kijanki) mają hemoglobiny o innym powinowactwie do tlenu niż hemoglobiny występujące w okresie postnatalnym (i w żabach dorosłych). Ma to wyraźny charakter przystosowawczy: embrion nie ma kontaktu z tlenem atmosferycznym; kijanka ma skrzela i czerpie tlen rozpuszczony w wodzie, podczas gdy żaba dorosła ma płuca i korzysta z tlenu atmosferycznego. Nie jest jak dotąd jasne, czemu niektóre ssaki mają dwa typy hemoglobiny płodowej.

Budowa odcinków DNA przenoszących rodziny genów globinowych jest u wszystkich poznanych dotąd ssaków podobna: transkrypcja wszystkich genów w ramach rodziny zachodzi w tym samym kierunku; geny mieszczące się od strony 5' ulegają ekspresji we wcześniejszych etapach ontogenezy, geny zaś rozpoczynające funkcjonowanie później znajdują się od strony 3'. Wynikałoby z tego, że zasada regulacji funkcjonowania genów globinowych w rozwoju nie ulega istotnym zmianom od ery mezozoicznej, jakkolwiek liczba genów wchodzących w skład rodziny ulegała zmianom. Np. rodzina genów typu β myszy składa się co najmniej z 7 genów aktywnych i jednego pseudogenu (90). Natomiast kury mają układ genów β globinowych 5' — ρ — β^H — β — ϵ — 3'; ρ i ϵ kodują globinę płodową, a więc geny znajdujące się w środku rodziny ulegają ekspresji później niż geny leżące na krańcach (92).

Zgraną ewolucję genów kodujących α globiny obserwuje się zarówno u człowieka, jak u małych człokształtnych (15, 25, 26) oraz u kóz (91). Na razie nie wiadomo, czy łączna ewolucja genów α i γ (20, 32) globinowych jest zjawiskiem charakterystycznym tylko dla człowieka.

Sekwencje zasad w genach kodujących embrionalną globinę człowieka ζ i embrionalną globinę kur π wykazują 21% różnic, natomiast sekwencje zasad w genach ζ i α globiny człowieka wynoszą 38%. Wynika z tego, że różnicowanie się globin na embrionalne i postembrionalne rozpoczęło się

wcześniej niż różnicowanie w kierunku ptaków i ssaków, którego początek miał miejsce przed 300 mln lat (20).

Warto na zakończenie zasygnalizować następujący problem. Badania genetyczne nad lokalizacją genów w chromosomach rozpoczęto przed 70 laty. Opracowano mapy genetyczne szeregu organizmów i z reguły oprócz standardowego (tj. najczęściej występującego) układu genów w chromosomach znaleziono osobniki mające inwersje i translokacje. W ostatnich latach stwierdzono ponadto, że geny mogą być przenoszone w różne miejsca chromosomów za pośrednictwem transpozonów, założenie więc, że translokacja powodująca rozdzielenie rodzin genów α i β globinowych zaszła tylko raz, u wspólnego przodka obecnych ptaków i ssaków może być błędne. Oszacowywanie, jak dawno temu rozpoczęła się dywergencja par genów jest ewidentnie obciążone dużym błędem. Można ją obliczać bądź na podstawie częstości substytucji aminokwasów, bądź mutacji cichych (tj. substytucji zasad zmieniających jedne kodony w inne, synonimowe). Przy pierwszym sposobie liczenia dywergencja genów α i $\psi\alpha$ trwałaby 220 mln lat, przy drugim zaś — 60 mln lat (19).

Ponadto, ponieważ pary genów mogą ewoluować łącznie, dywergencja danej pary genów może rozpocząć się znacznie później niż duplikacja, w wyniku której ta para genów powstała.

Zaakceptowano do druku 20.09.1983 r.

PIŚMIENICTWO

1. Gajewski W., Węgleński P., (1980), Inżynieria genetyczna, PWN, Warszawa.
2. Maxam A. M., Gilbert W., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560—564.
3. Bank A., Mears J. G., Ramirez F., (1980), *Science*, **207**, 486—493.
4. Weatherall D. J., Clegg, J. B., (1979), *Cell*, **16**, 467—479.
5. Weatherall D. J., Clegg, J. B., (1982), *Cell*, **29**, 7—9.
6. Maniatis T., Kee S. G., Efstratiadis A., Kafatos F. C., (1976), *Cell*, **8**, 163—182.
7. Blattner F. R., Blechl A. E., Denniston-Thompson K., Faber H. E., Richards J. E., Slightom J. L., Tucker P. W., Smithies O., (1978), *Science*, **202**, 1279—1284.
8. Maniatis T., Hardison R. C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Kee S. G., Efstratiadis A., (1978), *Cell*, **15**, 687—701.
9. Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T., (1978), *Cell*, **15**, 1157—1174.
10. Liebhaver S. A., Goossens M. J., Kan Y. W., (1980), *Proc. Natl. Sci. USA*, **77**, 7054—7058.
11. Slightom J., Blechl A., Smithies O., (1980), *Cell*, **21**, 627—638.
12. Efstratiadis A., Posakony J. W., Maniatis T., Lawn R. M., O'Connell C., Spritz R. A., DeRiel J. K., Forget B. G., Weissman S. M., Slightom J. L., Blechl A. E., Smithies O., Baralle F. E., Shoulders C. C., Proudfoot N. J., (1980), *Cell*, **21**, 653—668.
13. Lawn R. M., Efstratiadis A., O'Connell C., Maniatis T., (1980), *Cell*, **21**, 647—651.

14. Spritz R. A., DeRiel J. K., Forget B. G., Weissman S. M., (1980), *Cell*, **21**, 639—646.
15. Lauer L., Shen C. K. J., Maniatis T., (1980), *Cell*, **20**, 119—130.
16. Michelson A. M., Orkin S. M., (1980), *Cell*, **22**, 371—377.
17. Little P. F. R., (1982), *Cell*, **28**, 683—684.
18. Jacq C., Miller J. R., Brownlee G., (1977), *Cell*, **12**, 109—120.
19. Proudfoot N. J., Maniatis T., (1980), *Cell*, **21**, 537—544.
20. Proudfoot N. J., Gil A., Maniatis T., (1982), *Cell*, **31**, 553—563.
21. Clegg J. B., Gagnon J., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6076—6080.
22. Barralle F. E., Shoulders C. C., Proudfoot N. J., (1980), *Cell*, **21**, 621—626.
23. Barton P., Malcolm S., Murphy C., Ferguson-Smith M. A., (1982), *J. Molec. Biol.*, **156**, 269—278.
24. Deisseroth A., Nienhuis A., Turner P., Velez R., Anderson W. F., Lawrence J., Ceagan R., Kucherlapati R., (1977), *Cell*, **12**, 205—218.
25. Liebhaver S., Goossens M., Wai Kan Y., (1981), *Nature*, **290**, 26—29.
26. Zimmer E. A., Martin S. L., Beverley S. M., Kan Y. W., Wilson A. C., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2158—2162.
27. Jeffreys A. J., Craig I. W., Francke U., (1979), *Nature*, **281**, 606—608.
28. Lebo R. U., Carrano A. U., Burkhardt-Shultz K., Dozy A. M., Yu L.-C., Kan Y. W., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5804—5808.
29. Proudfoot N. J., Baralle F. E., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5435—5439.
30. Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T., (1979), *Cell*, **15**, 1157—1174.
31. Shen S. O., Smithies O., (1982), *Nucl. Acids Res.*, **10**, 7809—7818.
32. Shen S. O., Slightom J. L., Smithies O., (1981), *Cell*, **26**, 191—203.
33. Orkin S. H., Goff S. C., (1981), *Cell*, **24**, 345—351.
34. Liebhaver S. A., Kan Y. W., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11852—11855.
35. Goossens M., Lee K. Y., Liebhaver S. A., Kan Y. W., (1982), *Nature*, **296**, 864—865.
36. Comi P., Giglioni B., Ottolenghi S., Gianni A. M., Polli E., Barba P., Covelli A., Migliaccio G., Conderelli M., Peschle C., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 362—365.
37. Stamatoyannopoulos G., (1972), *Annual Rev. Genet.*, **6**, 47—70.
38. Orkin S. H., Lazarus H., Altay C., Gurgey A., Weatherall D. J., Nathan D. G., (1979), *Cell*, **17**, 33—42.
39. Motalenti G., (1965), *Genetics Today. Proc. XI. Int. Congress of Genetics*, tom 3, str. 965—972. Pergamon Press.
40. Goossens M., Dozy A. M., Embury S. H., Zachariades Z., Hadjiminias M. G., Stamatoyannopoulos G., Kan Y. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 518—521.
41. Pressley L., Higgs D. R., Aldridge B., Metaxaton-Mavromati A., Clegg J. B., Weatherall D. J., (1980), *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4889—4898.
42. Orkin S. M., Goff S. C., Hetchman R. L., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5041—5045.
43. Higgs D. R., Pressley L., Aldridge B., Clegg J. B., Weatherall D. J., Cao A., Hadjiminias M. G., Kattamis C., Metaxaton-Mavromati A., Rachmilewitz E. A., Sophocleous T., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5833—5837.

44. Felber B. K., Orkin S. H., Mamer D. H., (1982), *Cell*, **29**, 895—902.
45. Fukumaki Y., Ghosh P. K., Benz E. J., Reddy J. V. B., Lebowitz P., Forget B. G., Weissman S. M., (1982), *Cell*, **28**, 585—593.
46. Treisman R. R., Proudfoot N. J., Shander M., Maniatis T., (1982), *Cell*, **29**, 903—911.
47. Busslinger M., Moschonas N., Flavell R., (1981), *Cell*, **27**, 289—298.
48. Orkin S. H., Kazazian H. H., Antonarkis S. E., Ostrer H., Goff S. C., Sexton J. P., (1982), *Nature*, **300**, 768—769.
49. Wieringa B., Meyer F., Reiser J., Weissmann C., (1983), *Nature*, **301**, 38—43.
50. Orkin S. H., Old J. M., Weatherall D. J., Nathan D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2400—2404.
51. Orkin S. H., Kolodner R., Michelson A., Husson R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3558—3562.
52. Chang J. C., Kan Y. W., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2886—2889.
53. Orkin S. H., Goff S. C. J., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 9782—9784.
54. Chang J. C., Temple G., Trecartin R., Kan Y. W., (1979), *Nature*, **281**, 602—603.
55. Maguat L., Kimiburgh A., Rachmilewitz E., Ross J., (1981), *Cell*, **27**, 543—553.
56. Ramirez F., O'Connell, Marks P. K., Bank A., Musumeci S., Shiliro G., Pizzarelli G., Russo G., Luppis B., Ganbino R., (1976), *Nature*, **263**, 471—475.
57. Comi P., Giglioni B., Barbarano L., Ottolenghi S., Williamson R., Novakova M., Masera G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 612—622.
58. Ottolenghi S., Comi P., Giglioni B., Williamson R., Vulb G., Conconi F., (1977), *Nature*, **266**, 231—236.
59. Temple G., Chang J., Kan Y. W., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3047—3051.
60. Kan Y. W., Holland J. P., Dozy A. M., Varmus H. E., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 5142—5144.
61. Spritz R., Jagadeeswaran P., Prabhara V., Choudary P., Biro P., Elder J., DeRiel J. K., Manley J. L., Gefter M. L., Forget B. G., Weissman S. M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2455—2459.
62. Kantor J. A., Turner P. H., Nienhuis A. W., (1980), *Cell*, **21**, 149—159.
63. Sharp P. A., (1981), *Cell*, **23**, 643—626.
64. Fronk J., (1982), *Post. Biochem.*, **28**, 3—24.
65. Rogers J., Wall R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1877—1879.
66. Lerner M., Boyle J., Mount S., Wolin S., Steiz J., (1980), *Nature*, **283**, 220—224.
67. Baird M., Driscoll C., Shreiner H., Sciarrata G., Sansone G., Niazi G., Ramirez F., Bank A., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4218—4221.
68. Breatnach R., Chambon P., (1981), *Annual Rev. Biochem.*, **50**, 349—383.
69. Orkin S. H., Kazazian H. H., Antonarakis S. E., Goff S. C., Boehm C. D., Sexton J. P., Waber P. G., Giardina P. J., (1982), *Nature*, **296**, 627—631.
70. Bernards R., Kooter J. M., Flavell R. A., (1979), *Gene*, **6**, 265—280.
71. Ottolenghi S., Giglioni B., Comi P., Gianni A. M., Polli E., Acquaye C. T. A., Oldham J. H., Maseta G., (1979), *Nature*, **278**, 654—656.

72. Jagadeeswaran P., Tuan D., Forget B. G., Weissman S. M., (1982), *Nature*, **296**, 469—470.
73. Manley J., Colozzo M., (1983), *Nature*, **300**, 376—379.
74. Jones R.W., Old J.M., Trent R.J., Clegg J.B., Weatherall D.J., (1981), *Nature*, **291**, 39—44.
75. Fritzch E. F., Lawn R. M., Maniatis T., (1979), *Nature*, **279**, 598—603.
76. Van der Ploeg L. H. T., Konings A., Oort H., Roos D., Bernini L., Flavell R. A., (1980), *Nature*, **283**, 637—642.
77. Zajani E. D., Lim G., McGlave P. B., Clapp J. F., Mann L. I., Norwood T. H., Stamatoyannopoulos G., (1982), *Nature*, **295**, 244—246.
78. Felensfeld G., McGhee J., (1982), *Nature*, **296**, 602—603.
79. Orkin S. M., (1983), *Nature*, **301**, 108—109.
80. Shmookler R. J., Goldstein S., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3949—3953.
81. Humpries R. K., Ley T., Turner P., Moulton A. D., Nienhuis A. W., (1982), *Cell*, **30**, 173—183.
82. Mellon P., Parker V., Gluzman Y., Maniatis T., (1981), *Cell*, **27**, 279—288.
83. Levinson B., Khoury G., Wande Woude G., Gruss P., (1982), *Nature*, **295**, 568—572.
84. Banerji J., Rusconi S., Schaffner W., (1981), *Cell*, **27**, 299—308.
85. Grosfeld G. C., de Boer E., Shewmacher C. K., Flavell R. A., (1982), *Nature*, **295**, 120—126.
86. Thompson E. O. P., (1980) w: *The Evolution of Protein Structure and Function*, red. Sigman, D. S., Brazier M. A. B., str. 267—298, Academic Press, New York.
87. Ohno S., (1970), *Evolution by gene duplication*, str. 1—160. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
88. Hosbach H., Wyler T., Weber R., (1983), *Cell*, **32**, 45—53.
89. Leder A., Swan D., Ruddle F., O'Eustachio P., Leder P., (1981), *Nature*, **293**, 196—200.
90. Jahn C. L., Huthison III C. A., Phillips S. J., Weaver S., Haigwood N. L., Voliva C. F., Edgell M. H., (1980), *Cell*, **21**, 159—168.
91. Shon E. A., Wernhe S. M., Lingrel J. B., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 6825—6835.
92. Villeponteau B., Landes G. M., Pankrotz M. J., Martinson H. G., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 11015—11023.
93. Czeluśniak J., Goodman M., Hewett-Emmett D., Weiss M. L., Venta P. J., Tashian R. E., (1982), *Nature*, **298**, 297—300.

JADWIGA JARUZELSKA ^{*)}, RYSZARD SŁOMSKI ^{**)}

Geny niskocząsteczkowych jądrowych RNA

Genes Coding for Small Nuclear RNAs

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. Liczebność genów snRNA**
- III. Struktura genów snRNA**
- IV. Pseudogeny snRNA**
- V. Transkrypcja genów snRNA**
- VI. Analogie pomiędzy sekwencjami genów snRNA a rodzinami średniopowtarzających się sekwencji w genomach ssaków**
- VII. Rozmieszczenie genów snRNA w genomie**
- VIII. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Number of snRNA genes**
- III. Structure of snRNA genes**
- IV. Pseudogenes of snRNA**
- V. Transcription of snRNA genes**
- VI. Analogies between sequences of snRNA genes and middle repetitive sequence families in mammalian genomes**
- VII. Arrangement of snRNA genes**
- VIII. Final remarks**

Wykaz stosowanych skrótów: snRNA — niskocząsteczkowe jądrowe RNA, snRNP — cząstki rybonukleoproteinowe zawierające niskocząsteczkowe jądrowe RNA, AMV — wirus ptasiej mieloblastozy, pre-U1 snRNA — pierwotny transkrypt U1 snRNA.

I. Wprowadzenie

W jądrach komórek zwierzęcych poza dawno poznaczonymi rRNA, tRNA i mRNA występuje również kilkanaście innych rodzajów RNA o niskim ciężarze cząsteczkowym. Ze względu na unikalne lub przeważające wystę-

^{*)} Dr J. Jaruzelska, ^{**)} doc. dr hab. R. Słomski, Zakład Genetyki Człowieka, PAN, 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 30/36.

powanie w jądrze komórkowym lub w jąderku nazwano je niskocząsteczkowymi jądrowymi RNA (*small nuclear RNA* — snRNA). Stała sedymentacji tej grupy RNA wynosi 4.5-8S (1). W nukleoplazmie wyróżniono: 7-3, U2, U1, U4, U5, U6, La4.5, La4.5I, zaś w jąderku 8A, 8B, 7-1, 7-2, U3 i 5.4 snRNA, według rosnącej ruchliwości elektroforetycznej (2).

Interesującą podgrupę snRNA stanowią UsnRNA (U1 do U6). Wielkość UsnRNA wynosi 100—300 nukleotydów, a ich wspólne cechy to: wysoka zawartość urydyny, trwałość metaboliczna, struktura 5' cap zawierająca potrójnie metylowaną guaninę, dość znaczne modyfikacje wewnątrz cząsteczki (2), występowanie w kompleksach ze specyficznymi białkami (snRNP) (3, 4). Z surowic chorych na *Systemic lupus erythematosus* wyizolowano przeciwciała anti-snRNP, precypitujące wyżej wymienione kompleksy w zależności od ich komponent białkowych (3). Powszechność występowania UsnRNA oraz znaczna konserwatywność w ewolucji przemawiają za ich ważnymi funkcjami w komórce. Zainteresowanie UsnRNA wzrosło znacznie kiedy przed kilku laty, w oparciu o znaczną liczbę przekonywujących danych, sformułowano hipotezę o ich udziale w wycinaniu sekwencji wtrąconych z pre-mRNA (4, 5, 6).

Dotychczasowe badania snRNA były skupione przede wszystkim na ich biochemicznej charakterystyce. W ostatnich latach ukazały się artykuły przeglądowe o snRNA, a wśród nich artykuł Jaruzelskiej i Słomskiego w *Postęпах Biochemii* (7), omawiający metabolizm i funkcje biologiczne snRNA. Obecnie dużo uwagi poświęca się strukturze i organizacji genów snRNA. Jeśli nawet funkcja UsnRNA w wycinaniu sekwencji wtrąconych zostanie ostatecznie potwierdzona, trudno założyć, że wszystkie UsnRNA pełnią tę funkcję. Mimo bowiem charakterystycznych cech wspólnych, poszczególne UsnRNA różnią się znacznie między sobą. Podstawową różnicę stanowi sekwencja, a w następstwie struktura przestrzenna, mająca decydujące znaczenie dla funkcji cząsteczki. Stąd nie jest wykluczone, że np. koncepcje dotyczące udziału niektórych snRNA w regulacji ekspresji genu na poziomie transkrypcji zostaną całkowicie udokumentowane (8, 9). Liczba i poziom doniesień o kodowaniu snRNA skłaniają do podsumowania wiedzy w tym zakresie.

II. Liczebność genów snRNA

Z dotychczas wykonanych badań liczebności genów poszczególnych snRNA wynika, że geny te należą do grupy średnio powtarzających się sekwencji w komórkach eukariotycznych. Pierwotnie, dane o liczebności genów snRNA uzyskano na podstawie hybrydyzacji snRNA z komórek nerki chomika z wysokocząsteczkowym DNA unieruchomionym na nitrocelulozowym filtrze. W Tabeli 1 przedstawiono liczebność genów niektórych snRNA z różnych organizmów.

Tabela 1

Liczebność genów niektórych snRNA

Organizm	RNA	Liczba genów	Piśmiennictwo
<i>Dictyostelium discoideum</i>	D2 snRNA (odpowiednik U3 eukariota)	5	10
<i>Drosophila melanogaster</i>	U2 U3 U4 U6	3 7 7 1—3	11
Kura	U1	12	12
Mysz	U1	75	13
Chomik	7SL RNA U1 U3 5S RNA 45S rRNA	1100 1000 800 920 95	14
Człowiek	U1 U2 U6	125 30 200	15 16 17
Komórki HeLa	7SK RNA	3000	18

Na podstawie heterogenności sekwencji U5 snRNA komórek HeLa i komórek mózgu szczura wykazano wielogenowe kodowanie tego RNA. Mutacje, które wystąpiły w genach kodujących U5 snRNA występujący aktualnie w komórce, musiały być na tyle mało istotne, że geny te pozostały nadal aktywne. Dla porównania warto wspomnieć, że w puli U5 snRNA kurczęcia nie stwierdzono heterogenności sekwencji (9).

Obecnie, dzięki rozwojowi metod klonowania i sekwencjonowania DNA, określenie liczby genów snRNA jest bardziej precyzyjne. Dzięki tym metodom łatwiej odróżnić gen wykazujący wysoką komplementarność w stosunku do użytej sondy hybrydyzacyjnej od genu, który w toku ewolucji uległ tak znacznym przemianom strukturalnym, że tworzy stosunkowo labilny hybryd. Taki zmieniony gen zwany jest potocznie pseudogenem i nie jest aktywny transkrypcyjnie. W nowszych pracach stosowano warunki umożliwiające hybrydyzację jedynie wysoko komplementarnych sekwencji. W wyniku tego, w niektórych badaniach uzyskiwano znacznie niższe liczby kopii genów snRNA.

Jak wynika z Tabeli 1, najwięcej dotychczas opublikowanych prac dotyczy kodowania U1 snRNA, przy czym dane o liczebności genów U1

snRNA u ssaków nie są jednoznaczne. Wynik zależy zarówno od źródła DNA jak i od podejścia eksperymentatora. Można przyjąć, że liczba kopii genu U1 snRNA ssaków wynosi 20—30 w haploidalnym genomie (20—22). Stwierdzono ponadto istotny wzrost liczby sekwencji komplementarnych do 7SK RNA w ludzkim genomie w porównaniu z genomem gryzoni. Podstawą do takiego wniosku był wynik hybrydyzacji 7SK RNA, w której z ludzkim DNA genomowym uzyskano smugę po wykonaniu autoradiografii, natomiast w przypadku gryzoni i ptaków wyraźne prążki (23).

III. Struktura genów snRNA

W ostatnich kilku latach obok danych dotyczących liczby genów snRNA pojawiły się dane dotyczące struktury zarówno części kodującej genów snRNA jak i sekwencji flankujących 5' i 3'.

Danych dotyczących wielkości jednostek transkrypcyjnych U1 i U2 snRNA z komórek HeLa przysporzyły badania wrażliwości syntezy U1 i U2 snRNA na promieniowanie UV. Powstawanie dimerów pirymidyn w DNA, wywołane przez promieniowanie UV, powoduje przedwczesną terminację transkrypcji. Prawdopodobieństwo spowodowania ubytku na skutek działania promieni UV w danym regionie DNA zależy od długości tego regionu. Stąd, tą metodą można oznaczyć długość jednostki transkrypcyjnej, w tym odległość pomiędzy promotorem a właściwym genem. Przy użyciu powyższej metody wielkość jednostek transkrypcyjnych U1 i U2 snRNA określono na około 5 kilobaz (24).

Ostateczne rozstrzygnięcie, czy wyizolowana sekwencja DNA zawiera gen, czy też pseudogen danego snRNA, nasuwa spore trudności. Pomocne w tym względzie może być przeprowadzenie transkrypcji *in vitro* wyizolowanego fragmentu DNA. Na podstawie porównania sekwencji trzech wyizolowanych genów U1 snRNA — myszy, szczura i człowieka, wykazano rozbieżności sekwencji jedynie w sześciu pozycjach. Ponadto gen mysiego U1A snRNA zawarty we fragmencie restrykcyjnym BglII był komplementarny w regionie kodującym do szczurzego U1A snRNA w 96.5%, a do ludzkiego U1 snRNA w 95%. Zmiany sekwencji we wszystkich sześciu pozycjach dotyczyły fragmentów cząsteczki U1A snRNA nie zaangażowanych bezpośrednio w dojrzwianiu mRNA. Nie dowodzi to jednak, że sekwencja komplementarna do U1A snRNA we fragmencie restrykcyjnym BglII odpowiada genowi U1A snRNA, który jest transkrypcyjnie aktywny *in vivo*. Wykazano również niewielkie zróżnicowanie sekwencji w klonach cDNA U1 snRNA kurczęcia (12, 13), przy czym jeden z klonów zawierał prawdopodobnie prawdziwy gen U1 snRNA. Był on bowiem prawie idealnie kolinearny z U1 snRNA kurczęcia i różnił się jedynie brakiem reszty cytydyny w pozycji 98 i 101 oraz zawartością dwóch nadliczbowych reszt tymidyny na końcu 3' (12). Sklonowano 7 loci U1 snRNA (HSD1-7)

pewnego typu komórek HeLa, z których tylko jeden zawierał sekwencję w pełni komplementarną do ludzkiego U1 snRNA (21, 22). Przeprowadzając restrykcyjną analizę regionów flankujących 5' w siedmiu klonach (HSD) U1 snRNA wykazano, że były one w znacznym stopniu konserwatywne. Mianowicie sekwencje pierwszych 105 nukleotydów w sześciu klonach były identyczne z wyjątkiem jednego, który był różny w pozycji -9. Nie stwierdzono sekwencji TATA ani wewnątrz 105-nukleotydowych sekwencji ani w typowej pozycji, tzn. w odległości około -10 par zasad od miejsca inicjacji, ani w żadnym innym miejscu badanych regionów. Ponadto sekwencje sąsiadujące bezpośrednio z miejscem inicjacji (ang. *cap site*) przypominały odpowiadające im lokalizacją sekwencje w regionach inicjacji innych jednostek transkrypcyjnych transkrybowanych przez polimerazę II. Na podstawie podobieństwa miejsc restrykcyjnych w obrębie loci HSD U1 snRNA sugerowano, że odleglejsze sekwencje w kierunku końca 5' były również konserwatywne (22). Przypuszcza się, że wszystkie 7 loci HSD U1 snRNA zawierają aktywne transkrypcyjnie geny. Stosując restryktazy, które dość gęsto przecinały DNA w sąsiedztwie loci U1 snRNA, stwierdzono znaczne podobieństwo sekwencji flankujących 5' również innych loci U1 snRNA poza HSD1-7 (22). Natomiast sekwencje flankujące 5' w klonach zawierających sekwencję komplementarną do U1 snRNA myszy, kurczęcia (12), *Drosophila* (25) i człowieka (22, 26) nie były w stosunku do siebie homologiczne. Wyjątek stanowiła kilkunukleotydowa sekwencja bezpośrednio sąsiadująca z końcem 5' genu U1 snRNA. Ponadto w klonach U1 snRNA myszy i kurczęcia w regionach flankujących 5' występowały sekwencje GTGC. W jednym z klonów U1 snRNA kurczęcia wykazano obecność aż trzech takich sekwencji, z których jedna była częścią oktanukleotydowej sekwencji GCTGGTGG (sekwencja „chi”) pierwotnie wykrytej w regionach mysiego genomu zaangażowanych w przełączaniu klas immunoglobulin (27). Takiej sekwencji nie stwierdzono jednak w aktywnym genie U1 snRNA człowieka (22, 26). W locus U1 snRNA kurczęcia, w którym kodowany jest prawdopodobnie aktywny transkrypcyjnie gen, nie stwierdzono obecności sekwencji TATA, podobnie jak nie stwierdzono jej w loci U1 snRNA człowieka. Nie jest wykluczone, że sekwencja TATA występuje, ale w znacznej odległości od miejsca inicjacji. Brak jednak przekonujących danych na ten temat (12).

Z kolei w wyizolowanych pięciu klonach DNA *Dictyostelium discoideum*, zawierających po jednej sekwencji komplementarnej do D2 (U3) snRNA wykazano brak konserwatywności w regionach flankujących koniec 5'. W jednym z tych loci w wyniku analizy sekwencji wykazano w pozycji -53 -35 sekwencję TATAAATA przypominającą sekwencję TATA. Jeżeli jednak założyć, że *cap site* jest w tym wypadku miejscem inicjacji transkrypcji, sekwencja TATA jest położoną 15—30 pz dalej w kierunku końca 5', niż opisano to dla innych jednostek transkrypcyjnych (10, 28, 29).

W kilku klonach zawierających loci U2 snRNA człowieka, sekwencje flankujące 5' nie były konserwatywne, podobnie jak w loci U3 snRNA *Dictyostelium* (16) oraz w loci U6 snRNA mysich komórek wątroby (30). W jednym z klonów U6 snRNA mysich komórek wątroby w regionie flankującym koniec 5' wykryto sekwencję TATAAAT w odległości 31 pz od miejsca inicjacji transkrypcji. Ponadto sekwencja kodująca U6 snRNA zawarta w tym locus była ograniczona sekwencjami „direct repeats” — CACCCTAAC w pozycjach -69 i 129 oraz TTTCATAT w pozycjach -124 i 163, co sugeruje, że sekwencja kodująca U6 snRNA jest ruchoma (30).

W klonie zawierającym locus U1 snRNA myszy, w obrębie sekwencji flankującej koniec 3' i 5' wykazano dwa ciągi sekwencji o długości 14 pz w orientacji „direct repeat”. Jedynie w dwóch pozycjach powyższych sekwencji istniała niezgodność. Sekwencja „direct repeat” została również wykryta w klonie ludzkiego DNA U1—101, zawierającym pseudogen U1 snRNA (13, 31).

IV. Pseudogeny snRNA

Z wcześniejszych badań wynikało, że liczba genów poszczególnych snRNA była bardzo wysoka — około 1000 kopii danego typu snRNA na haploidalny genom — w porównaniu z ilością tego snRNA w jądrze komórki. snRNA stanowią jedynie około 3—5% całkowitego komórkowego RNA (32). Stąd sugerowano, że większość genów snRNA w ogóle nie ulega transkrypcji lub jedynie w niewielkim stopniu, np. w porównaniu z genami rRNA. Stwierdzono ponadto, że termiczna stabilność uzyskiwanych hybrydów snRNA:DNA była znacznie niższa, niż należało oczekiwać w przypadku silnie komplementarnych hybrydów rRNA:DNA (14).

Zjawisko to zostało wyjaśnione dzięki analizie sekwencji loci różnych typów snRNA, szczególnie UsnRNA, pochodzących głównie z komórek ssaków. W wyizolowanych 24 klonach RNA z komórek ludzkiego łożyska, z których każdy zawierał jedną sekwencję komplementarną do U1, U2 lub U3 snRNA komórek HeLa, wykazano, że większość, a być może wszystkie 24 klony, reprezentowały geny zmienione w stosunku do wymienionych snRNA. Stąd uznano je za pseudogeny. Z wyjątkiem dwóch klonów nie były one zdolne do tworzenia hybrydów snRNA:DNA, które chroniłyby snRNA na całej długości przed działaniem RNazą T1, przy zastosowaniu łagodnych warunków trawienia. Tak znacznych różnic w sekwencji między genem a jego transkryptem nie oczekiwano nawet w heterologicznym porównaniu szczurzego U2 snRNA z ludzkim genomowym klonem zawierającym locus U2 snRNA. Jest to tym bardziej zaskakujące, że szczurzy i ludzki U2 snRNA wydają się nierozróżnialne na podstawie elektroforetycznej analizy produktów trawienia RNazą T1 (*finger print*) i na podstawie drugorzędowej analizy dwunukleotydów T1 po powtórным trawieniu trzustkową RNazą A. Po zsekwencjonowaniu

dwóch loci U1 i U2 snRNA z komórek ludzkiego łożyska, które po wstępnej analizie wykazywały najsilniejszą komplementarność w stosunku do użytych sond hybrydizacyjnych przekonano się, że i one reprezentowały pseudogeny snRNA (20). Z tego samego źródła uzyskano 200 klonów zawierających sekwencje komplementarne do U6 snRNA komórek HeLa, które w przeważającej części były również pseudogenami U6 snRNA (17). Z DNA komórek wątroby myszy wyizolowano trzy klony zawierające pseudogeny U6 snRNA. Stwierdzono w tym wypadku różnice w sekwencji w stosunku do U6 snRNA w 7—9 pozycjach, przy czym sekwencje flankujące tych pseudogenów były bogate w adenozyne i znacznie różniły się od sekwencji flankujących otaczających prawdziwy gen (30).

Znaczna dysproporcja w liczbie genów w stosunku do ich pseudogenów jest jak dotychczas unikalną cechą snRNA. Nasuwa się więc pytanie, jaki mechanizm decyduje o powstaniu tak znacznej liczby pseudogenów u ssaków. Weiner i współpracow. z Uniwersytetu w Yale wysunęli interesującą koncepcję, w myśl której pseudogeny snRNA powstawałyby przez integrację odwrotnych transkryptów snRNA w innych miejscach genomu (20). Jednocześnie zakłada się, że cząsteczka snRNA ulegająca odwrotnej transkrypcji stanowiłaby swój własny starter („*self primed RNA*”). Podobną hipotezę próbuje się uzasadnić dla pseudogenów białek. Udowodnienie przedstawionej hipotezy wiąże się z koniecznością odpowiedzi na trzy zasadnicze pytania:

1. Skąd pochodzi aktywność odwrotnej transkrypcji
2. Co jest źródłem startera do odwrotnej transkrypcji
3. Jaki jest mechanizm integracji cDNA do genomu

Weiner i współpracownicy wykazali, że ludzki U3 i szczurzy U3A snRNA (216 nukleotydów) funkcjonują *in vitro* jako startery i równocześnie matryce do syntezy 74-nukleotydowego cDNA w obecności odwrotnej transkryptazy wirusa ptasiej mieloblastozy (AMV). Odwrotny transkrypt był komplementarny do 1/3 od końca 5' cząsteczki U3 snRNA, co wykazano przez analizę sekwencji U3 cDNA. Z analizy sekwencji startera RNA kowalentnie związanego ze znakowanym U3 cDNA wynikało, że koniec 3' U3 snRNA służył jako starter do syntezy U3 cDNA. Struktura uzyskanych odwrotnych transkryptów startera i miejsca inicjacji jest zgodna z przyjmowaną drugorzędową strukturą U3 snRNA. W cząsteczce U3 snRNA koniec 3' jest zlokalizowany w dwuniciowym ramieniu bezpośrednio sąsiadującym z wewnętrznym regionem jednoniciowym. W stosunku do kilku pseudogenów U3 snRNA wykazano, że zawierają 69—70 nukleotydową sekwencję U3 snRNA od końca 5', przy braku w ogóle dalszej części genu U3 snRNA. Ze względu na to, że wyżej wspomniane pseudogeny U3 snRNA człowieka odpowiadają U3 cDNA syntetyzowanemu *in vitro* przez odwrotną transkryptazę AMV zaproponowano, że synteza kowalentnego hybrydu U3 snRNA:cDNA jest pierwszym etapem w procesie powstawania pseudogenu U3 snRNA z flankującymi sekwencjami „*direct*

repeat". Hybryd snRNA:cDNA, względnie sam cDNA mógłby być bezpośrednio wykorzystany w procesie insercji. Ze względu na to, że sekwencje „*direct repeat*” otaczające dwa różne pseudogeny U3 snRNA są różne oraz na to, że pseudogen U3.7 występował w pojedynczej kopii w ludzkim genomie, mogłoby się wydawać, że hybryd snRNA:cDNA lub cDNA ulega przypadkowej insercji. Jednak sekwencje flankujące czterech ludzkich pseudogenów U3 snRNA były bogate w adenozyne, co wskazuje na pewne preferencje w ich integracji. Prawdopodobnie przed lub podczas integracji 4—5 nukleotydów ulega odcięciu (33). Obecnie zakłada się, że kluczową rolę w insercji pełnią topoizomerazy (31, 34, 35, 36, 37, 38, 39).

Większość z około 1000 wcześniej oznaczonych pseudogenów U1 snRNA wydaje się pochodzić bezpośrednio ze 100 prawdziwych genów U1 snRNA na drodze genetycznego dryftu (20, 22), podczas gdy inne pseudogeny U1 snRNA (21) U2 snRNA, pseudogeny U3 i U4 snRNA (37) powstawały prawdopodobnie przez insercję cDNA w nowe miejsca w chromosomach. Z powyższych danych możnaby wnioskować, że jedynie snRNA nadają się do odwrotnej transkrypcji z uwagi na ich lokalizację w jądrze komórki, występowanie w znacznej ilości w porównaniu z innymi rodzajami RNA oraz odpowiednią strukturę drugorzędową. Według nowszych danych również geny kodujące mRNA mogłyby ulegać odwrotnej transkrypcji (33). W przeciwieństwie do UsnRNA, nie jest wyjaśnione źródło startera odwrotnej transkrypcji mRNA. Obecność endogennych sekwencji retrowirusowych w genomach ptaków i gryzoni (38) oraz w genomach naczelnych (39, 40) sugeruje, że odwrotna transkryptaza jest obecna w normalnych komórkach. Przykładowo, odwrotną transkrypcję wykazano w większości tkanek ludzkiego łożyska (41). Ponadto, w DNA ludzkiego mózgu wykryto sekwencje przypominające sekwencje retrowirusów (42). Nie można wykluczyć, że odwrotna transkrypcja stanowi drugorzędową aktywność znanych komórkowych polimeraz DNA. Wykazano bowiem, że ludzkie polimerazy DNA beta i gamma kopiuja syntetyczny poli(A) przy zastosowaniu starterów oligo(dT), a ludzka polimeraza alfa powoduje wydłużanie startera RNA na podstawie matrycy DNA (43). Nie udało się dotychczas przeprowadzić odwrotnej transkrypcji U3 snRNA przy pomocy tej polimerazy.

Odwrotna transkrypcja komórkowego RNA mogłaby też występować podczas zakażenia wirusem komórek linii zarodkowej (44, 45, 46, 47).

Obecnie nie wiadomo, jakie znaczenie dla komórki ma wytwarzanie pseudogenów drogą odwrotnej transkrypcji. Wydaje się, że może to być mechanizm konwersji informacji zawartej w RNA w potencjalną informację genetyczną. Duplikację genów od dawna uważa się za ważny etap w powstawaniu informacji genetycznej dla nowych funkcji komórkowych. W przypadku pseudogenów UsnRNA i mRNA powstały nowy materiał genetyczny byłby jednak wybrakowany, ponieważ sygnały regulacji znaj-

dują się poza strukturalną częścią genu. Stąd musiałby on ulec najpierw rekombinacji z aktywnym locus (48).

V. Transkrypcja genów snRNA

Wykazano, że transkrypcja genów UsnRNA odbywa się przy udziale polimerazy II (2, 21, 22), natomiast 4.5 S i 7 S RNA przy udziale polimerazy III (2). Jedynie w układzie *in vitro* udało się przeprowadzić przy udziale polimerazy I transkrypcję niskocząsteczkowych RNA o sekwencji różnej od U1 i U2 snRNA (49).

Uzyskano już pewne dane o strukturze jednostki transkrypcyjnej UsnRNA, a w szczególności U1 snRNA. Przeprowadzając transkrypcję *in vitro* klonów HSD1-7 DNA komórek HeLa potwierdzono pogląd o istnieniu pierwotnych transkryptów U1 snRNA, znacznie przedłużonych w kierunku końca 5' (24). Istnieje natomiast niezgodność poglądów co do długości dodatkowej sekwencji. Niezgodność ta mogłaby okazać się pozorna gdyby stwierdzono, że jednostki transkrypcyjne U1 snRNA nie są transkrybowane w myśl hipotezy „cap-promotor” (29, 50). Znaczy to, że reszta adenozyiny ulegająca zwykle posttranskrypcyjnym modyfikacjom (synteza cap), nie byłaby pierwszym nukleotydem ulegającym transkrypcji, a znajdowałaby się wewnątrz pierwotnego transkryptu. Niedojrzały U1 snRNA byłby wtedy przepisywany wraz z długim segmentem leżącym w kierunku końca 5' od regionu odpowiadającego dojrzałej cząsteczce U1 snRNA, z którego powstawałby krótki pre-U1 oraz RNA o nieznanej funkcji z przedłużającego fragmentu od końca 5'. W następstwie dochodziłoby do odcięcia jeszcze kilku nadliczbowych nukleotydów od końca 5' pre-U1 oraz syntezy cap. Taki mechanizm jest możliwy do przyjęcia, ponieważ ^{2,2,7}mG jest spotykana jedynie w snRNA, stąd synteza tego typu struktury cap mogłaby odbywać się w inny sposób niż synteza cap w mRNA. Z kolei wykazano, że sekwencje występujące wokół miejsca cap (ang. cap site) w loci U1 snRNA są bardzo podobne do występujących w tym miejscu w mRNA. Wykazano, że transkrypcja *in vitro* siedmiu klonów HSD U1 snRNA we wszystkich siedmiu przypadkach rozpoczynała się w pozycji -183 (22). Od tego samego miejsca rozpoczynała się transkrypcja *in vitro* dwóch innych genów ludzkiego U1 snRNA. Powyższy wynik uzyskano zarówno przeprowadzając transkrypcję *in vitro* w ekstraktach z komórek HeLa, jak i *in vivo* w oocytach *Xenopus laevis* (15). W żadnym z przedstawionych przypadków nie stwierdzono obecności sekwencji TATA w pobliżu pozycji -183 (15, 22). W pozycji -215 zlokalizowano natomiast sekwencję TATGTAGA sugerując, że odpowiadała ona sekwencji TATA występującej w przypadku genów strukturalnych w pozycji -30 (15, 51). Tym niemniej już wcześniej stwierdzono, że istnieją jednostki transkrybowane przez polimerazę II, w których nie występują sekwencje TATA (52, 53).

Przeprowadzono transkrypcję fragmentu restrykcyjnego ludzkiego DNA (592 pz) zawierającego gen U1 snRNA w oocytach *Xenopus* i stwierdzono, że jeżeli sekwencja między pozycjami -106 do -393 ulegnie delecji, matryca przestaje być aktywna. Natomiast jest ona nadal aktywna, jeżeli sekwencja między pozycjami -106 do -6 ulegnie delecji. Na tej podstawie wykazano, że nieco mniej niż 400 pz regionu flankującego koniec 5' jest niezbędnych do transkrypcji U1 snRNA w oocytach. W ten sposób została podkreślona rola sekwencji występujących daleko od miejsca *cap* w kierunku końca 5' w ewentualnym wzmacnianiu lub modulowaniu wydajności transkrypcji lub w dojrzewaniu. Wykazano, że podczas transkrypcji genów U1 snRNA w ekstraktach komórek HeLa powstawał transkrypt U1 snRNA dłuższy od transkryptu uzyskanego w oocytach *Xenopus*. Oznacza to, że specyficzne czynniki transkrypcji i dojrzewania są niezbędne do syntezy dojrzałej cząsteczki U1 snRNA. Ekstrakty komórkowe użyte do transkrypcji *in vivo* genów U1 snRNA zawierały sporo snRNP co stwierdzono przez precypitację tych snRNP swoistymi surowicami (3). W przeciwieństwie do tego, transkrypty syntetyzowane *in vitro* nie były specyficznie precypitowane przez surowicę. Oznacza to, że nie występowały one w dojrzałych snRNP. Nie wyjaśniono dotychczas, czy ten brak łączenia w kompletne snRNP był związany z obecnością nadliczbowych sekwencji na końcu 5' U1 snRNA syntetyzowanego *in vitro* (15).

Nie wiadomo do tej pory czy nukleotyd na końcu 3' pre U1 odpowiada nukleotydowi występującemu na końcu 3' dojrzałej cząsteczki U1 snRNA. Dane z transkrypcji *in vitro* przemawiają za tym, że w regionie flankującym koniec 3' dotychczas zsekwencjonowanych loci U1 snRNA istnieje kilka potencjalnych miejsc terminacji dla polimerazy II (22).

Sygnały terminacji transkrypcji u eukariota są znacznie mniej poznane niż sygnały inicjacji. Dotyczy to również jednostek transkrypcyjnych snRNA. Wykazano, że struktura regionów flankujących koniec 3' w przypadku 7 klonowanych loci HSD U1 snRNA komórek HeLa nie była konserwatywna dalej niż do pozycji 50. Pełną konserwatywność wykazano jedynie na przestrzeni pierwszych 19 pz. Sekwencja AAUAAA-poli(A), występująca zwykle w regionach flankujących koniec 3' w jednostkach transkrybowanych przez polimerazę II (54) w tym wypadku nie występowała. Stwierdzono natomiast liczne zespoły reszt T mających istotne znaczenie w terminacji transkrypcji katalizowanej przez polimerazę III (55) i polimerazę II (56, 57).

VI. Analogie pomiędzy sekwencjami snRNA a rodzinami średniopowtarzających się sekwencji w genomach ssaków

W nowszych badaniach struktury i organizacji genów UsnRNA oraz 4.5 i 7S RNA wykryto pokrewieństwo sekwencji tych RNA oraz bliskość

występowania i położenia z sekwencjami AluI ludzkich komórek i z sekwencjami B1, które są odpowiednikami AluI u gryzoni.

Sekwencje AluI stanowią około 3% ludzkiego genomu; są w nim rozproszone i powtórzone około 300 000 razy. Długość tych sekwencji wynosi około 300 pz a ich nazwa pochodzi od występujących w nich specyficznych miejsc dla restryktazy AluI (58). W genomie myszy ekwiwalentne sekwencje B1 mają długość około 135 pz i są powtórzone w genomie myszy około 100 000 razy (59).

W układzie *in vitro* sekwencje AluI i B1 są transkrybowane przez polimerazę III (59) i prawdopodobnie przez polimerazę II (36, 60).

Sekwencje AluI są nieprecyzyjnymi dimerami występującymi w tej samej orientacji, czyli tworzącymi sekwencje „*direct repeats*”, przy czym monomery mają długość około 130 pz, a insert występujący wewnątrz drugiego monomeru (czyli bliżej końca 3') około 31 pz. Na końcu pierwszego monomeru występuje region bogaty w adenozyne.

Wydaje się, że sekwencje AluI i B1 pochodzą od wspólnego, dość dobrze zachowanego w ewolucji genu. Stwierdzono ponadto, że w sekwencjach AluI zawarte są regiony bogate w guanozyne, homologiczne do sekwencji znajdującej się w sąsiedztwie miejsca „*ori*” wirusów papova. Niewykluczone, że są one zaangażowane w cyklu replikacji wirusów lub komórkowego DNA (36). Wykazano ponadto, że około 25% hnRNA komórek ssaków zawiera sekwencje komplementarne do sekwencji AluI i można je wyizolować w formie dwuniciowego RNA (61, 62). W komórkach ssaków sekwencje należące do rodziny AluI lub B1 występują w kierunku końca 5' w tej samej orientacji co jednostki transkrybowane przez polimerazę II (20). Rozproszenie sekwencji AluI w genomie można zobrażować jako kolejne ich wycinanie i insercję w innym miejscu genomu, przez mechanizm polegający na niehomologicznej rekombinacji. Za mobilnością sekwencji AluI przemawia fakt, że występują one w postaci małych pozachromosomalnych, dwuniciowych, kolistych DNA (60).

Sekwencje AluI występują również w miejscach blisko regionów podatnych na delecję, np. w pobliżu genów globinowych. Sekwencje AluI są zwykle otoczone przez sekwencje „*direct repeat*” o długości 7–20 pz, różniących się między sobą. Przez analogię z sekwencjami „*direct repeat*” w transpozonach bakterii, sekwencjami IS i mobilnymi elementami DNA eukariota, sekwencje „*direct repeat*” występujące w sąsiedztwie AluI mogłyby powstawać przez duplikację DNA w miejscach, w których dochodzi do insercji sekwencji AluI w chromosomalny DNA. Jeżeliby tak było, sekwencje AluI byłyby mobilnymi elementami DNA (36).

Niezależnie w kilku laboratoriach wykazano obecność sekwencji AluI w sąsiedztwie genów lub pseudogenów snRNA. W przypadku pięciu klonów zawierających loci U1 snRNA człowieka sekwencja AluI występowała w odległości około 200–1000 pz od końca 3' sekwencji kodującej (22). Z kolei inni autorzy wykazali obecność sekwencji AluI poza końcem 5

pseudogenów U1 snRNA człowieka, podobnie jak w przypadku genów beta i gamma globin człowieka (63, 64). Wykryto również obecność struktur podobnych do AluI w sekwencjach otaczających pseudogeny U1, U2 i U3 snRNA (17, 31), przy czym sugerowano, że pseudogeny tych snRNA mogły ulec rozproszeniu w genomie w podobny sposób jak AluI. Są one bowiem tak jak sekwencje AluI otoczone przez analogiczne sekwencje „*direct repeat*” o długości 20 pz (36). Opisano palindromowe, łącznikowe sekwencje AluI, otaczające ludzki pseudogen U6 snRNA, przy czym sekwencja AluI sąsiadująca z końcem 5' pseudogenu występowała w tej samej orientacji co pseudogen (20).

Jeszcze bliższy związek z sekwencjami AluI i B1 wykazano dla 4.5 i 7S RNA. Po pierwsze dlatego, że są one transkrybowane przez polimerazę III (18). Wykazano, że 7SL RNA zawiera region homologiczny do sekwencji AluI w części bliskiej końca 5' cząsteczki. Przedstawiono trzy niezależne interpretacje tej homologii sekwencji:

1. 7S RNA wywodzi się ze złożonej sekwencji DNA, w której krótki fragment AluI jest połączony z inną sekwencją powtórzoną w genomie.

2. Jedynie koniec 5' 7SL RNA był wystarczająco podobny do sekwencji AluI by tworzyć trwały hybryd, podczas gdy dalsza część cząsteczki 7SL RNA stała się w ewolucji mniej podobna do AluI. To spowodowało „ewolucyjny przymus” na końcu 5' genów 7SL RNA i mogłoby mieć związek z funkcją 7SL RNA.

3. Różnicowanie sekwencji AluI w toku ewolucji z powstaniem w konsekwencji podgrup sekwencji AluI. Wyizolowana sekwencja genomowa 7SL może reprezentować inną podgrupę AluI, niż dotychczas zsekwencjonowane, różniące się jako całość od dimerycznej struktury (65). Długość 7SL RNA (około 300 nukleotydów), taka sama jak znanej sekwencji DNA — AluI oraz polidispersyjne rozmieszczenie w ludzkim genomie sekwencji komplementarnych do niej, podbudowuje tę hipotezę (65).

Zsekwencjonowano 7SL cDNA człowieka, uzyskany na matrycy ludzkiego 7SL RNA poliadenylowanego *in vitro*. Zsyntetyzowany cDNA zawierał trzy charakterystyczne regiony: 90 pz od końca 5' i 50 pz od końca 5' wykazywały bliską homologię z drugą częścią dimeru AluI, czyli z monomerem bliższym końca 3' (65). Natomiast centralna część cząsteczki cDNA nie wykazywała homologii z sekwencją AluI, choć istniało podobieństwo w wysokiej zawartości par GC. Poza tym na granicy centralnej sekwencji i sekwencji bliżej końca 5' i 3' homologicznymi do drugiego monomeru AluI znajdują się sekwencje „*direct repeat*” o długości 6 pz. Sformułowano dwie hipotezy powstawania takiej struktury:

1. 7SL RNA pochodzi z typowego dimeru AluI, w którym regiony o długości 100 pz na końcu 5' i 50 pz na końcu 3' cząsteczki były silnie konserwatywne, podczas gdy centralna część sekwencji uległa istotnym zmianom. Fakt, że 7SL RNA ma tę samą długość co dimer AluI, mógłby

podtrzymywać tę hipotezę. Wysoka zawartość GC w DNA AluI (65%) została zachowana w zmutowanej, centralnej części 7SL RNA w 62%.

2. Struktura 7SL RNA jest następstwem insercji sekwencji niepodobnej do AluI. Przemawia za tym obecność dwóch krótkich sekwencji „direct repeat” w 7SL RNA, w miejscu łączenia między sekwencją centralną a bocznymi. Z przedstawionych danych trudno jednak spekulować o mechanizmie insercji. Sekwencje „direct terminal repeat”, sąsiadujące z rozproszonymi sekwencjami powtórzonymi, były opisane dla sekwencji AluI (67, 68, 69, 70), dla niektórych pseudogenów mRNA (31) oraz dla pseudogenu histonu H4 w *Notophthalmus viridescens* (71). Obecnie wykazano występowanie sekwencji „direct repeat” sąsiadujących z pewną liczbą takich wtrąconych sekwencji, co w dalszym ciągu podbudowuje hipotezę, że rozprzestrzenianie się sekwencji DNA mogło być spowodowane ruchomym charakterem tych sekwencji (31, 66). Również 7S RNA z wątrobiaka Novikoffa jest pokrewny z ludzkimi sekwencjami AluI. Geny 7S RNA z wątrobiaka Novikoffa są również bogate w GC (63%). Natomiast nie stwierdzono w obrębie 7S RNA długich, powtarzalnych sekwencji lub sekwencji „inverted repeat”. Najdłuższa sekwencja „inverted repeat” GCCAG występowała na końcu 5' w pozycji 26-30 i na końcu 3' w pozycji 281-285. Stwierdzono tam również krótkie sekwencje G₄, G₅, C₄, A₄, jednak ich znaczenie nie jest znane. Regiony 7S homologiczne do AluI były odporne na trawienie nukleazami S1 i T1. 90-nukleotydowy koniec 5' 7S RNA był w 70% homologiczny do sekwencji AluI, jak również 45-nukleotydowy koniec 3' był homologiczny do AluI. Ze względu na to, że druga połowa 300-nukleotydowej sekwencji AluI jest przybliżonym powtórzeniem końca 5' sekwencji AluI, jedna cząsteczka AluI mogłaby teoretycznie hybrydyzować z dwoma cząsteczkami 7S RNA. Nie jest jednak wiadomo, czy tego typu interakcje mają fizjologiczne znaczenie (72).

Stwierdzono również pokrewieństwo 4.5S RNA chomika chińskiego z sekwencjami AluI chomika. 4.5S RNA chomika zawierał 96-nukleotydowy region na końcu 3' w 65% homologiczny do ekwiwalentów AluI gryzoni oraz 50-nukleotydową sekwencję na końcu 3', w której wykazano 88% homologii do ekwiwalentów AluI gryzoni. Stąd 4.5S DNA może być uważany za element rodziny AluI, mimo pewnych różnic w sekwencji. Przypuszczalnie dlatego właśnie 4.5S RNA hybrydyzuje z hnRNA zawierającym sekwencje AluI (36, 70, 73). Inni autorzy stwierdzili, że 4.5S RNA występujący u gryzoni był homologiczny do 120-nukleotydowego końca 5' monomeru AluI (66, 70, 74) jak również, że 4.5S RNA był homologiczny do sekwencji AluI szczura (36).

VII. Rozmieszczenie genów snRNA w genomach ssaków

Jedną z charakterystycznych cech genów snRNA jest ich rozproszenie w genomie (20, 33). Przykładowo każdy z 15 klonów mysiego DNA zawie-

rał tylko jedną sekwencję kodującą U1 snRNA. Podobny wynik uzyskano w przypadku genów U1 snRNA kurczęcia (12), człowieka (20) i U2 snRNA człowieka (75) oraz ludzkiego i mysiego U6 snRNA (17, 30). Równocześnie, żaden z uzyskanych klonów nie hybrydyzował z pozostałymi snRNA (13). Identyczny wynik uzyskano w przypadku siedmiu klonów HSD DNA komórek HeLa (22) zawierających loci U1 snRNA oraz w przypadku genów D2 (U3) snRNA *Dictyostelium* (10). Z nowszych badań wynika, że reguła nietandemowego rozmieszczenia genów snRNA nie jest bezwzględna. Mianowicie stwierdzono hybrydyzację sond U1 i U2 snRNA z tym samym klonem DNA szczura (76). Zbliżone wyniki uzyskano stosując hybrydyzację 7S cDNA z fragmentami restrykcyjnymi DNA myszy, szczura, ptaka i komórek HeLa. Stwierdzono, że geny 7S są prawdopodobnie również ułożone w tandem. Wykazano, że tandemy miały jednak charakter rozproszony, przynajmniej w genomie myszy.

Stwierdzono, że geny snRNA linii komórek chińskiego chomika i linii komórek kangura występowały odpowiednio w dwóch i w trzech największych chromosomach (77). Stosując hybrydyzację *in situ* U2, U3, U4 i U6 snRNA znakowanych ¹²⁵J ze śliniankowymi chromosomami *Drosophila* wykazano, że poszczególne snRNA hybrydyzowały z odrębnymi regionami genomu (11).

VIII. Uwagi końcowe

Mimo, że wiedza na temat struktury i organizacji genów snRNA znacznie się poszerzyła, nadal dotyczy ona przede wszystkim U1 snRNA. Jest to zrozumiałe, gdyż zainteresowanie tym snRNA było już wcześniej bardzo duże, ze względu na prawdopodobny udział w dojrzewaniu pre-mRNA. Można oczekiwać, że w niedalekiej przyszłości zostanie bardziej precyzyjnie określona jednostka transkrypcyjna snRNA. Interesujące byłoby również wykazanie, czy jednostki transkrypcyjne serii U snRNA są zbudowane według jednego schematu. Jeżeli byłoby tak rzeczywiście, można by spekulować o istnieniu nadrzędnego mechanizmu regulującego transkrypcję snRNA zaangażowanych w pokrewnych procesach metabolicznych.

Zaakceptowano do druku 25.09.1983 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Reddy R., Busch H., (1981), *The Cell Nucleus*, Ro-Choi T. S., Busch H., 3, 261—306, New York Academic Press.
2. Busch H., Reddy R., Rothblum L., Choi Y. G., (1982), *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 617—654.
3. Lerner M. R., Steitz J. A., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5495—5499.

4. Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. M., Steitz J. A., (1980), *Nature*, **283**, 220—224.
5. Rogers J., Wall R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1877—1879.
6. Ohshima Y., Itoh M., Okada M., Miyata T., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4471—4474.
7. Jaruzelska J., Slomski R., (1982), *Post. Bioch.*, **28**, 25—43.
8. Kanehisha T., Kitazume Y., Ikuta K., Tanaka Y., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **475**, 501—513.
9. Kanehisha T., Kitazume Y., Matsui M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **479**, 265—278.
10. Wise J. A., Weiner A. M., (1980), *Cell*, **22**, 109—118.
11. Saluz H. P., Schmidt T., Dudler R., Altwegg M., Stumm-Zollinger E., Kubli E., Chen P. S., (1983), *Nucl. Acid Res.*, **11**, 77—90.
12. Roop D. R., Kristo P., Stumph W. E., Tsai M. J., O'Malley B. W., (1981), *Cell*, **23**, 671—680.
13. Piechaczyk M., Lelay Taha M. N., Sri-Widada J., Brunel C., Liautard J. P., Jeanteur P., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 4627—4640.
14. Engberg J., Hellung-Larsen P., Frederiksen S., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 265—278.
15. Murphy J. T., Burgess R. R., (1982), *Cell*, **29**, 265—274.
16. Westin G., Monstein H. J., Zabielski J., Philipson L., Petersson U., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 6323—6338.
17. Hayashi K., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 3379—3388.
18. Ullu E., Melli M., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 2209—2223.
19. Krol A., Galinaro H., Lazar E., Jacob M., Branlant C., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 769—787.
20. Denison R. A., Van Arsdell S. W., Bernstein L. B., Weiner A. M., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 810—814.
21. Manser T., Gesteland R. F., (1981), *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 117—125.
22. Manser T., Gesteland R. F., (1982), *Cell*, **29**, 257—264.
23. Balmain A., Krumlauf R., Vas J. K., Birnie G., (1982), *Nucl. Acid Res.*, **10**, 4255—4277.
24. Eliceiri G. L., (1975), *Nature*, **275**, 80—81.
25. Mounts S., Stetz J., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 6351—6368.
26. Murphy J. T., Burgess R. R., Dahlberg J. E., Lund Z., (1982), *Cell*, **29**, 265—274.
27. Kenter A., Brishstein B., (1981), *Nature*, **293**, 402—404.
28. Cannon F., O'Hare K., Perrin F., Le Pennenc J. P., Benoist C., Cochet M., Breathnach R., Royal A., Garapin A., Cami B., Chambon P., (1979), *Nature*, **78**, 428—434.
29. Salditt-Georgieff M., Harpold M., Chen-Kiang S., Darnell J. E., (1980), *Cell*, **19**, 69—78.
30. Ohshima Y., Okada M., Tani T., Itoh Y., Itoh M., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 5145—5158.
31. Van Arsdell S. W., Denison R. A., Bernstein L. B., Weiner A. M., Manser T., Gesteland R. F., (1981), *Cell*, **26**, 11—18.
32. Hellung-Larsen P., Frederiksen P., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 290—307.
33. Bernstein L. B., Mount S. M., Weiner A. M., (1983), *Cell*, **32**, 461—472.
34. Lewin R., (1983), *Science*, **219**, 1052—1054.
35. Gellert M., (1981), *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 879—910.
36. Schmid C. W., Jelinek W. R., (1982), *Science*, **216**, 1065—1070.

37. Hammarström K., Westin P., Pettersson U., (1982), *EMBO J.*, **1**, 737—739.
38. Bishop J. M., (1978), *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 35—88.
39. Rabin H., Benton C. V., Tainsky M. A., Rice N. R., Gilden R. V., (1979), *Science*, **204**, 841—842.
40. Sherwin S. A., Todaro G. J., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 5041—5045.
41. Nelson J. A., Levy J. A., Leong J. C., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1670—1674.
42. Martin M. A., Bryan T., Rasheed S., Khan A. S., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4892—4896.
43. Allaudeen H. S., (1978), *Phar. Ther.*, **A2**, 447—476.
44. Hollis G. F., Hieter P. A., McBride O. W., Swan D., Leder P., (1982), *Nature*, **296**, 321—325.
45. Battey J., Max E. E., McBride O. W., Swan D., Leder P., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5956—5960.
46. Ikawa J., Ross J., Leder P., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1154—1158.
47. Linial M., Medeiros E., Hayward W. S., (1978), *Cell*, **15**, 1371—1381.
48. Sharp P. A., (1983), *Nature*, **301**, 471—472.
49. Reichel R., Monstein H. J., Jansen H. W., Philipson L., Bencke B. J., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3106—3110.
50. Ziff E. B., Evans R. M., (1978), *Cell*, **15**, 1463—1475.
51. Goldberg M., (1979), *Ph.D. thesis*, Stanford University, Stanford, California.
52. Fiers W., Contreras R., Haegeman G., Rogiers R., Van de Vorde A., Van Heuverswyn H., Van Heuverswyn H., Van Henneweghe J., Volckaert G., Ysebaert M., (1978), *Nature*, **273**, 113—120.
53. Backer C. C., Herisse J., Courtois G., Galibert F., Ziff E., (1979), *Cell*, **18**, 569—580.
54. Proudfoot N. J., Brownlee G. G., (1976), *Nature*, **263**, 211—214.
55. Korn L. J., Brown D. D., (1978), *Cell*, **15**, 1145—1156.
56. Lai E. C., Stein J. P., Catterall J. F., Woo S. L. C., Mace M. L., Means A. R., O'Malley B. W., (1979), *Cell*, **18**, 829—842.
57. Hentschel C., Irminger J. C., Bucher P., Birnstiel M. L., (1980), *Nature*, **285**, 147—151.
58. Rubin C. M., Houck C. M., Deininger P. L., Friedmann F., Schmid C. W., (1980), *Nature*, **284**, 373—374.
59. Krayev A. S., Kramerov D. A., Skryabin K. G., Ryskov A. P., Baev A. A., Georgiev G. P., (1980), *Nucl. Ac. Res.*, **8**, 1201—1215.
60. Calabretta D., Robberson D. L., Barrera-Saldana M. A., Lambrou T. P., Saunders G. F., (1982), *Nature*, **296**, 219—225.
61. Jelinek W., Evans R., Wilson M., Salditt-Georgiev M., Darnell J. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2776—2783.
62. Kramerov D. A., Grigoryan A. A., Ryskov A. P., Georgiev G. P., (1979), *Nucl. Ac. Res.*, **6**, 697—713.
63. Duncan C., Biro P. A., Choudary P. V., Elder J. T., Wang R. C., Forget B. G., de Riel J. K., Weissman S. M., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5095—5099.
64. Jelinek W. R., Tommey T. P., Leinwond L., Duncan C. H., Biro P. A., Choudary P. V., Weissman S. M., Rubin C. M., Houch

- C. M., Deininger P. L., Schmid C. W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1398—1402.
65. Deininger P. L., Jolly D. J., Rubin C. M., Friedmann T., Schmid C. W., (1981), *J. Mol. Biol.*, **151**, 17—33.
66. Ullu E., Murphy S., Melli M., (1982), *Cell*, **29**, 195—202.
67. Baralee F. E., Shoulders C. C., Goodbourn S., Jeffreys A., Proudfoot N. J., (1980), *Nucl. Ac. Res.*, **8**, 4393—4399.
68. Bell G. I., Pictet R., Rutter W. J., (1980), *Nucl. Ac. Res.*, **8**, 4091—4095.
69. Duncan C. H., Jagadeeswaran P., Wang R. C. C., Weissman S., (1981), *Gene*, **13**, 185—190.
70. Haynes S. R., Toomey R. P., Leiwand L., Jelinek W. P., (1981), *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 573—583.
71. Stephenson E. C., Erba H. P., Gall J. P., (1981), *Cell*, **24**, 639—647.
72. Li W. Y., Reddy R., Henning D., Epstein P., Busch H., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 5136—5142.
73. Jelinek W. R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2679—2683.
74. Harada F., Kato N., (1980), *Nucl. Acid. Res.*, **8**, 1273—1285.
75. Weistin G., Monstein H. J., Zabielski J., Philipson L., Pettersson U., (1981), *Nucl. Acid Res.*, **9**, 6323—6338.
76. Alonso A., Krieg L., Winter H., Sekeris C. E., (1980), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **16**, 148—155.
77. Blin N., Stöhr M., Hutter K. J., Alonso A., Goerttler K., (1982), *Chromosoma*, **85**, 723—733.

JERZY CIESIOŁKA *) i WŁODZIMIERZ J. KRZYŻOSIAK **)

Dynamiczne aspekty struktury cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe}

Dynamic Aspects of the Structure of the Yeast tRNA^{Phe} Molecule

Spis treści

- I. Struktura drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach**
 - I-1. Wiązania wodorowe**
 - I-2. Asocjacja warstwowa zasad**
 - I-3. Energia konformacyjna cząsteczki**
 - I-4. Oddziaływania z jonami metali, poliaminami**
 - I-5. Oddziaływania między cząsteczkami tRNA**
- II. Struktura drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze**
 - II-1. Jądrowy rezonans magnetyczny**
 - II-1-1. Protonowy rezonans magnetyczny**
 - II-1-2. Rezonans magnetyczny atomów fosforu ³¹P**
 - II-2. Chemiczna modyfikacja**
- III. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Yeast tRNA structure in crystalline state**
 - I-1. Hydrogen bonding**
 - I-2. Base stacking**
 - I-3. Conformational energy**
 - I-4. Interactions with metal ions and polyamines**
 - I-5. tRNA-tRNA intermolecular interactions**
- II. Yeast tRNA^{Phe} structure in solution**
 - II-1. Nuclear magnetic resonance**
 - II-1-1. Proton magnetic resonance**
 - II-1-2. ³¹P magnetic resonance**
 - II-2. Chemical modification**
- III. Final remarks**

Wykaz stosowanych skrótów:

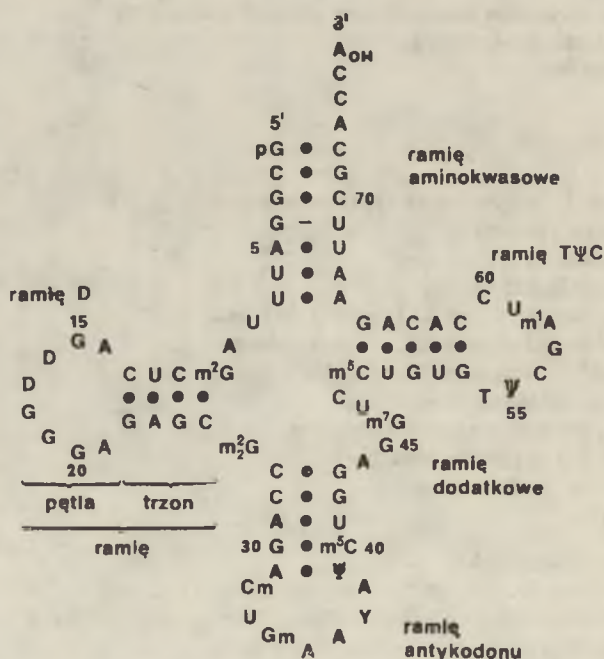
m¹A — 1-metyloadenozyna, m⁵C — 5-metylocytydina, m²G — N²-metyloguanozyna, m²G — N²,N²-dwumetyloguanozyna, m⁷G — 7-metyloguanozyna, D — dwuhydrourydina, — T — rybotymidyna, Ψ — pseudourydina.

*) dr, **) dr hab.; Zakład Chemii Bioorganicznej PAN, 61-704 Poznań, ul. No-skowskiego 12/14.

Celem tego opracowania jest próba udzielenia odpowiedzi na pytanie w jakim stopniu siły utrzymujące statyczną strukturę cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, wpływają na strukturę cząsteczki i jej dynamikę w roztworze. W związku z tym, strukturę cząsteczki w kryształach dyskutowano nie w kontekście prezentacji poszczególnych fragmentów strukturalnych cząsteczki, charakteru i funkcji jednostkowych oddziaływań, a raczej w kontekście poszczególnych rodzajów oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych. Dyskusję struktury drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze oparto na informacjach, których dostarczają techniki NMR i chemicznej modyfikacji, pozwalające wnikać w szereg detali struktury przestrzennej cząsteczki jednocześnie, stwarzając tym samym możliwości monitorowania struktury całej cząsteczki.

I. Struktura drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach

Cząsteczka transferowego kwasu rybonukleinowego z drożdży, specyficznego dla fenyloalaniny (tRNA^{Phe}), złożona jest z 76 nukleotydów. Ich uszeregowanie w łańcuchu polinukleotydowym (struktura pierwszorzędowa) określone zostało przez Raj Bhandary'ego i wsp. (1) w 1968 roku i było ono zgodne ze wspólnym dla ogromnej większości dotychczas



Ryc. 1. Pierwszorzędowa struktura tRNA z drożdży przedstawiona w postaci liścia koniczyny.

poznanych sekwencji tRNA diagramem liścia koniczyny zaproponowanym po raz pierwszy przez Holley'a i wsp. (2). Ten dwuwymiarowy schemat drugorzędowej struktury cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} przedstawiony na Ryc. 1 wynika ze zdolności tworzenia się wewnątrzcząsteczkowych par zasad według reguł Watsona-Cricka.

Pierwsze wyniki badań struktury przestrzennej (trzeciorzędowej) cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach przedstawili Rich, Kim i wsp. (3) oraz Klug i wsp. (4) w 1974 roku. Podana przez nich struktura różniła się zasadniczo od proponowanych wcześniej przestrzennych modeli cząsteczki tRNA (5). Po kolejnych uściśleniach struktury formy ortorombowej kryształu (6—12), a później i jednoskośnej (13—18), w roku 1978 przedstawione zostały cztery modele cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe}. Modele te skonstruowane zostały na podstawie analizy rentgenostrukturalnej, przeprowadzonej przez cztery grupy badawcze:

	rozdziel- czość	współcz. rozbieżn.	forma kryształu
A. Rich i wsp. (8) MIT *)	2,5 Å	0,20	ortorombowa
S. H. Kim i wsp. (12) DUK *)	2,7 Å	0,198	ortorombowa
A. Klug i wsp. (16) MRC *)	2,5 Å	0,21	jednoskośna
M. Sundaralingam i wsp. (18) MSN *)	2,5 Å	0,276	jednoskośna

Okazało się, że pomimo niewielkich różnic (mogących być wynikiem różnego sposobu upakowania cząsteczek w kryształach, bądź różnego sposobu interpretowania map gęstości elektronowej) rozwiązane struktury są zasadniczo zgodne.

Cząsteczka drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, ma ogólny kształt litery „L”.

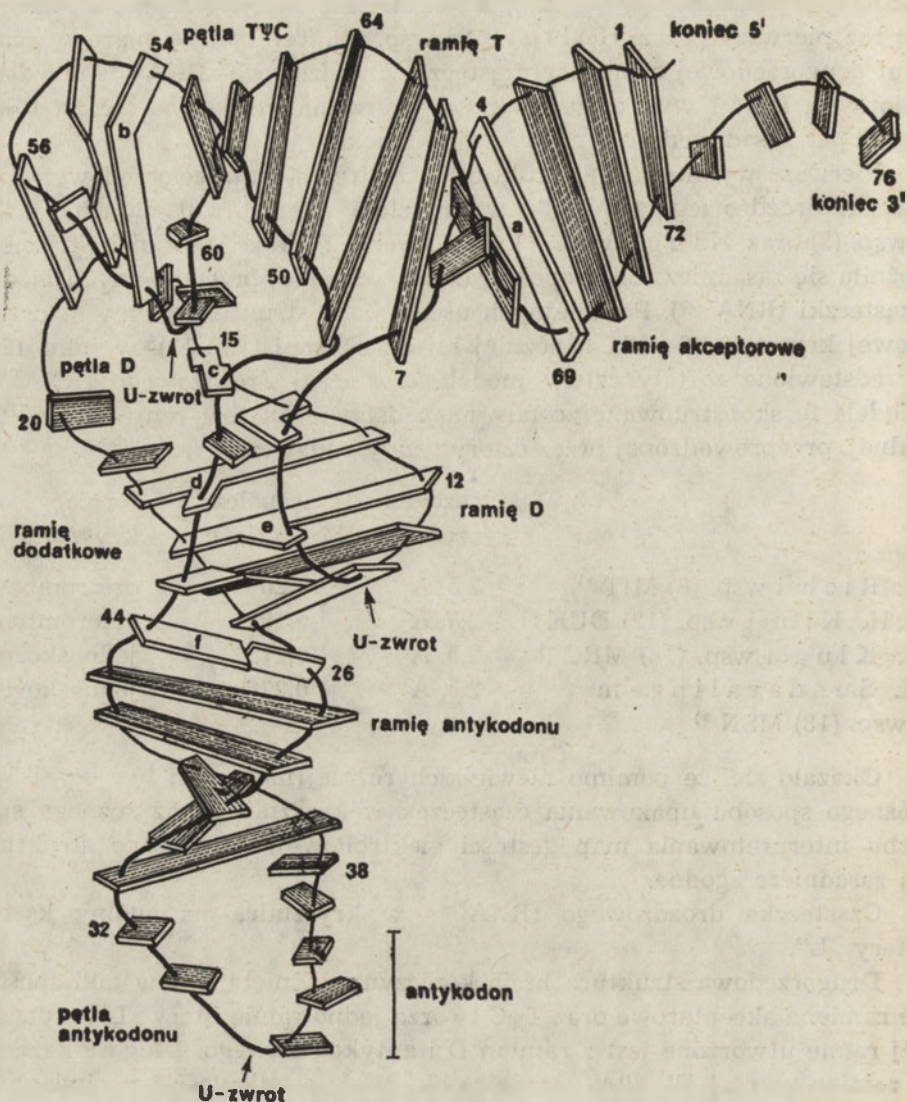
Drugorzędowa struktura liścia koniczyny zwinięta jest w taki sposób, że ramiona akceptorowe oraz TψC tworzą jedno ramię litery „L”, a drugie jej ramię utworzone jest z ramion D i antykodonowego. Długość każdego z ramion wynosi ok. 60 Å, średnica ok. 20 Å, a odległość przeciwnych końców litery „L” ok. 80 Å. Ramiona mają strukturę prawoskrętnego podwójnego heliksu. Kąt między osiami ramion akceptorowego i TψC wynosi ok. 15°, między osiami ramion D i antykodonowego ok. 25°, a między dwoma ramionami litery „L” wynosi ok. 90°. Helikalne regiony ramion akceptorowego, TψC i antykodonowego są bardzo podobne do typowej formy RNA-A (11 zasad/skręt), natomiast odbiega od tej struktury heliks ramienia D (10 zasad/skręt) i antykodonu (7—8 zasad/skręt). Ponadto

*) MIT — Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA

DUK — Duke University, Durham, North Carolina, USA

MRC — Medical Research Council, Cambridge, W. Brytania

MSN — University of Wisconsin, Madison, USA



Ryc. 2. Schemat struktury trzeciorzędowej tRNA^{Phe} z drożdży (19).

pary zasad nachylone są względem osi podwójnego heliksu pod kątem ok. 20° i odsunięte od niego na zewnątrz, co w konsekwencji powoduje, że tzw. głęboka bruzda, charakterystyczna dla podwójnego heliksu RNA jest w tRNA wyjątkowo głęboka, a tzw. wąska bruzda wyjątkowo płytka.

Na przedstawione na Ryc. 2 przestrzenne ukształtowanie się cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} wpływa szereg wewnątrz- i międzycząsteczkowych oddziaływań. W niniejszym opracowaniu przedstawione będą główne wy-

mienione niżej oddziaływania oraz przedyskutowana zostanie ich rola w organizacji i stabilizacji struktury cząsteczki tRNA^{Phe}.

Oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe:

- wiązania wodorowe
- asocjacja warstwowa zasad
- energia konformacyjna cząsteczki

Oddziaływania międzycząsteczkowe:

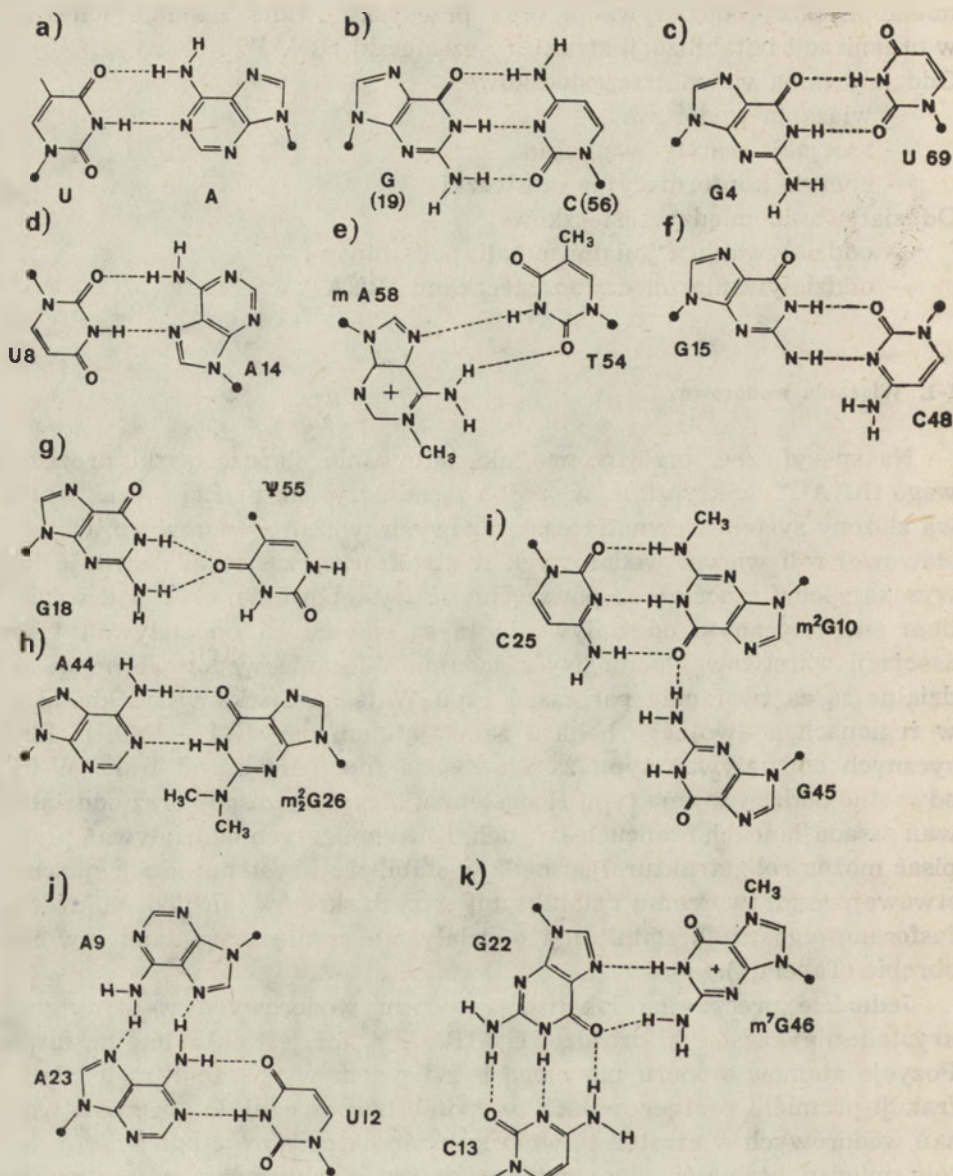
- oddziaływania z jonami metali, poliaminami
- oddziaływania między cząsteczkami tRNA

I-1. Wiazania wodorowe

Na specyficzne, przestrzenne ukształtowanie się cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, w sposób zasadniczy, jak można sądzić, wpływa złożony system wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. O podstawowej roli wiązań wodorowych w strukturze cząsteczki decyduje ich wysoka specyficzność oraz powszechność występowania, choć pod względem energetycznym oddziaływania te są słabsze od oddziaływań typu asocjacji warstwowej pomiędzy zasadami. Wiazania wodorowe odpowiedzialne są za tworzenie par zasad typu Watsona-Cricka wszystkie pary w regionach podwójnego heliksu za wyjątkiem pary G4 — U69, nieklasycznych oddziaływań typu zasada-zasada (np. pary zasad trans W-C), odwrotne oddziaływania typu Hoogstenna, „tryplety zasad” oraz oddziaływań zasada-łańcuch i łańcuch-łańcuch. Każdemu z tych oddziaływań przypisać można rolę strukturalną: bądź w stabilizacji systemu asocjacji warstwowej zasad, tworzeniu i stabilizacji ostrych skrętów łańcucha cukrowo-fosforanowego, bądź stabilizacji oddziaływań pomiędzy pętlami i w ich obrębie (Tabela 1).

Jednakże precyzyjna lokalizacja wiązań wodorowych w strukturze krystalicznej cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} nie jest aktualnie możliwa. Pozycje atomów wodoru nie mogą być bowiem wyznaczone metodą dyfrakcji promieni rentgenowskich w sposób bezpośredni. O obecności wiązań wodorowych w cząsteczce wnioskuje się na podstawie odległości i kątów między atomami potencjalnego donora i akceptora oraz atomów, z którymi są one kowalencyjnie związane. Na przykład Klu g i wsp. (14) wyznaczyli 193 potencjalne wiazania wodorowe w formie jednoskośnej kryształu drożdżowego tRNA^{Phe}, z których 54 to wiazania wodorowe typu zasada-zasada w helikalnych regionach ramion cząsteczki, a pozostałe to trzeciorzędowe wiazania wodorowe typu zasada-zasada, zasada-łańcuch, łańcuch-łańcuch (14).

Kryteria wskazujące na obecność wiązań wodorowych w badanej cząsteczce przyjmowane są dość arbitralnie ze względu na trudność dokładnego wyznaczenia położenia niektórych atomów (błąd w wyznaczonych



Ryc. 3. Wiązania wodorowe typu zasada-zasada występujące w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe}: a-c) pary zasad w trzonach ramion (tzw. „drugorzędowe”), d-k) pary zasad utrzymujące przestrzenną strukturę cząsteczki (tzw. „trzeciorzędowe”).

położeniach atomów sięgać może około 0.3 Å (16)), co wynika między innymi z różnego stopnia uporządkowania poszczególnych fragmentów cząsteczki tRNA. Jak można sądzić, stanowi to jedną z przyczyn pewnych rozbieżności w wyznaczaniu wiązań wodorowych typu zasada-łańcuch

Tabela 1

Wiązania wodorowe w czterech modelach cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształ.

ODDZIAŁYWANIE wg MIT (Rich i wsp. (7—8))	ROLA STRUKTURALNA (wg Rich i wsp. (7—8))	DUC (Kim i wsp. (11—12))	MRC (Klug i wsp. (14—16))	MSN (Sundaralingam i wsp. (17—18))
Forma ortorombowa	A. Oddziaływania zasada — zasada	Forma ortorombowa kryształu	Forma jednoskośna kryształu	
1. U3—A14	Stabilizuje skręt między resztami 7 i 8	+	+	+
2. A9—A23	Stabilizuje ostry skręt łańcucha między resztami 9 i 10	+	+	+
3. m ³ G10—G25	Utrzymuje oddziaływania pomiędzy ramieniem dodatkowym i ramieniem D	+	+	+
4. G15—C48	Stabilizuje połączenie ramion D i TψC oddziaływaniami typu asocjacji warstwowej: łączy ramię D z ramieniem dodatkowym	+	+	+
5. G18—ψ ⁵⁵	Utrzymuje oddziaływania pętli D z pętlą TψC	+	+	+
6. G19—C56	Stabilizuje oddziaływania pętli D z pętlą TψC w rogu cząsteczki	+	+	+
7. G22—m ⁷ G46	Oddziaływania ramion: dodatkowego i D jest stabilizowane przez wiązanie typu elektrostatycznego z m ⁷ G46	+	+	+
8. m ³ G26—A44	Utrzymuje ciągłość oddziaływań typu asocjacji warstwowej między ramionami D i antykodonowym.	+	+	+
9. T54—m ¹ A58	Utrzymuje oddziaływania typu asocjacji warstwowej w pętli TψC.	+	+	+

1. A9N6—P2302 2.* C11N4—S902' lub m ³ G10N7—S902'	B. Oddziaływania zasada — łańcuch cukrowofosforanowy Stabilizuje ostry skręt między resztami 9 i 10 Stabilizuje ostry skręt między resztami 9 i 10 Wiąże reszty 8 i 9 z ramieniem D Stabilizuje oddziaływanie pętli D i pętli T ^Y C Stabilizuje pętlę D i pofałdowanie łańcucha	+	+	+
3. C13N4—P902 4.* G18N2—S1801' 5. A21N1—S802'		+	+	A21N6—S4801' 02'—G4606 02'—P2202 + + + m ⁷ G46N2—S901' + + + m ⁷ G46N7—S802' G5706— C6N4— + U5902—C4802'
6. U33N3—P3602 7.* A35N7—S3302'		—P3605'	+	
8.* m ⁷ G46—P905'			+	
9. W ⁵ 5N3—P5802 10. G57N7—S5502'		m ⁷ G46N2— + + G57N1— + + +	+	
11. G57N2—S1802'	Stabilizuje oddziaływanie pętli D i T ^Y C przez wzmocnienie oddziaływań asocjacji warstwowej reszty G57 Stabilizuje oddziaływanie pętli D i T ^Y C przez wzmocnienie oddziaływań asocjacji warstwowej reszty G57 Stabilizuje oddziaływanie typu asocjacji warstwowej pętli T ^Y C z trzonem ramienia T ^Y C oraz stabilizuje wyłączenie reszt U59 i C60 z systemu oddziaływań asocjacyjnych pozostałych zasad pętli T ^Y C	+	+	
12. G57N2—S1901'		+	+	
13. C61N4—P6001		+	+	

Oznaczenia: P — atom fosforu (reszta fosforanowa), S — reszta rybozy, inne oznaczenia zgodne z Ryc. 3; zapis: — P36 05' oznacza, że pierwszy człon oddziaływania jest identyczny jak w modelu wg MIT.

i łańcuch-łańcuch na podstawie przedstawionych wyżej czterech modeli cząsteczki w kryształach. Natomiast identyczny jest, łatwiejszy do wyznaczenia dzięki regułom komplementarności zasad, system drugo- i trzeciorzędowych oddziaływań typu zasada-zasada.

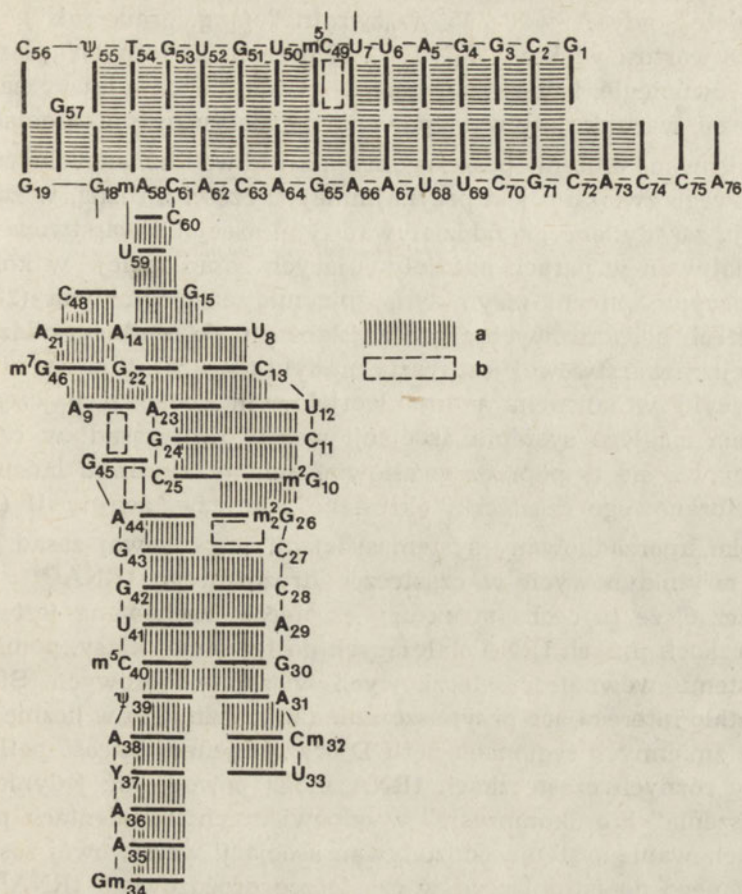
W niniejszym opracowaniu przedstawiono zestawienie „trzeciorzędowych” wiązań wodorowych wszystkich typów, formy ortorombowej (MIT, DUK) i jednoskośnej (MRC, MSN) kryształu drożdżowego tRNA^{Phe} (Tabela 1). Podkreślić należy, że autorzy wszystkich czterech modeli cząsteczki tRNA^{Phe} zakładają — pomimo pewnych różnic — podobny układ wiązań wodorowych. Z uwagi na wspomniane wyżej niejednoznaczności i błędy, którymi obarczone są długości oraz geometria wyznaczonych wiązań wodorowych, zrezygnowano w tym miejscu z porównywania energii poszczególnych oddziaływań trzeciorzędowych, w które uwikłana jest różna ilość jednostkowych wiązań wodorowych o różnych długościach i geometrii. Jednakże niewątpliwie energia poszczególnych oddziaływań jest różna, co przynajmniej w części odpowiedzialne jest za zróżnicowaną, jak się wydaje, dynamikę konformacyjną poszczególnych regionów struktury tRNA w roztworze.

I-2. Asocjacja warstwowa zasad

Oddziaływania typu asocjacji warstwowej zasad, stanowiące istotną cechę charakterystyczną kwasów nukleinowych, mogą być w głównej mierze odpowiedzialne za uprzywilejowane tworzenie struktur prawoskrętnych, jak stwierdzili Yathindra i Sundaralingam (20), analizując możliwości tworzenia się różnych typów helikalnych struktur polinukleotydów. Również w strukturze cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} asocjacja warstwowa zasad purynowych i pirymidynowych posiada bardzo istotne znaczenie, o czym można przekonać się analizując schemat tych oddziaływań przedstawiony na Ryc. 4.

Pomimo, że tylko 55% zasad cząsteczki znajduje się w regionach podwójnie helikalnych ramion, wszystkie oprócz pięciu zasad D16, D17, G20, U47 oraz A76, uczestniczą w oddziaływaniach typu asocjacji warstwowej. Asocjacyjna struktura cząsteczki tRNA zorganizowana jest w dwa obszary oddziaływań. Obszar asocjacji poziomej obejmuje trzony ramion akceptorowego i TψC, dwie zasady pętli D (G18, G19) oraz wszystkie, oprócz dwóch zasad (C60, U59) z pętli TψC. Pionowy ciąg oddziaływań obejmuje dwie zasady pętli TψC (C60, U59), zasady ramienia D wraz z parą związanych wodorowo zasad m²G26—A44 niejako „przenoszących” oddziaływania typu asocjacji warstwowej z ramienia D wzdłuż antykodonowego, aż do trypletu antykodonu.

Stopień organizacji oddziaływań typu asocjacji warstwowej zasad wzdłuż łańcucha polinukleotydowego w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe}



Ryc. 4. Schemat oddziaływań asocjacji warstwowej w tRNA^{Phe} z drożdzy: a) oddziaływania asocjacji warstwowej, b) słabe oddziaływania asocjacji warstwowej (21).

przedstawiony został (22) za pomocą trzech oddzielnych parametrów: kąta Λ utworzonego przez proste prostopadłe do płaszczyzn sąsiadujących zasad, średniej odległości $\langle Z \rangle$ między płaszczyznami kolejnych zasad w łańcuchu oraz średniej odległości $\langle D \rangle$ pomiędzy atomami sąsiadujących w łańcuchu zasad. Większość spośród oddziaływujących zasad (168 z 225 możliwych jednostek dimerycznych z trzech modeli cząsteczki MRC, MSN i DUK, co stanowi 75%), przybiera charakterystyczne dla oddziaływań tego typu równoległe ułożenie płaszczyzn oddziaływujących zasad, gdzie kąt $\Lambda \leq 45^\circ$, a $3,0 \leq \langle Z \rangle \leq 4,0 \text{ \AA}$ i $4,5 \leq \langle D \rangle \leq 5,5 \text{ \AA}$.

W niektórych przypadkach równoległe płaszczyzny zasad oddalone są na odległość większą: $\langle Z \rangle \geq 6 \text{ \AA}$ i $\langle D \rangle \geq 7,5 \text{ \AA}$, tworząc w ten sposób „interkalacyjną lukę” w systemie oddziaływań asocjacyjnych (możliwe jest wsunięcie pomiędzy dwie sąsiadujące w łańcuchu zasady, zasady trzeciej — „interkalującej”). Ponadto, wśród sąsiadujących w łańcuchu par zasad niezwiązanych oddziaływaniami typu asocjacyjnego, wyróżniono

pary „zgięte”, gdy $\Lambda = 90 \pm 45^\circ$ i „zwrotne” (ang. „*reversals*”), gdy kąt zgięcia ma wartość większą: $\Lambda \geq 135^\circ$. W parach „zwrotnych” płaszczyzny zasad są równoległe, lecz usytuowane w sposób niepozwalający na ich nakrywanie się warunkujące występowanie oddziaływań typu asocjacyjnego.

Zróznicowane ułożenie poszczególnych zasad wzdłuż łańcucha cukrowo-fosforanowego związane jest przynajmniej w części z różną, w zależności od rodzaju zasady, energią oddziaływań typu asocjacji warstwowej. Energia oddziaływań w parach oddziaływujących zasad maleje w kolejności: puryna-puryna, puryna-pirymidyna, pirymidyna-pirymidyna (23). Spośród czterech podstawowych zasad najsłabszym składnikiem oddziaływań typu asocjacji warstwowej jest reszta uracylu (24—25). Właśnie w miejscu reszt uracylu w łańcuchu polinukleotydowym dochodzi najczęściej do przerwania ciągłego systemu asocjacji warstwowej zasad: w cząsteczce tRNA objawia się to poprzez gwałtowne zmiany kierunku łańcucha cukrowo-fosforanowego cząsteczki określane jako tzw. zwroty U (Ryc. 2).

Wysoko uporządkowany system asocjacji warstwowej zasad purynowych i pirymidynowych w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} pozwala przypuszczać, że ta cecha struktury cząsteczki zachowana jest również w cząsteczkach innych tRNA należących do tej samej klasy, pomimo różnego systemu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Sformułowane zostało interesujące przypuszczenie (26), że zmiany w liczbie nukleotydów w zmiennych regionach pętli D oraz zmienna długość pętli dodatkowej, w różnych cząsteczkach tRNA mogą powodować jedynie pewne „wybrzuszenia” lub „kompresje” w odpowiednich fragmentach pozwalając na zachowanie systemu oddziaływań asocjacji warstwowej zasad, bardzo zbliżonego do istniejącego w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} (26). Znalazło to potwierdzenie w analizie struktury w kryształach tRNA_i^{Met} z *E. coli* (27) oraz tRNA^{Asp} z drożdży (28).

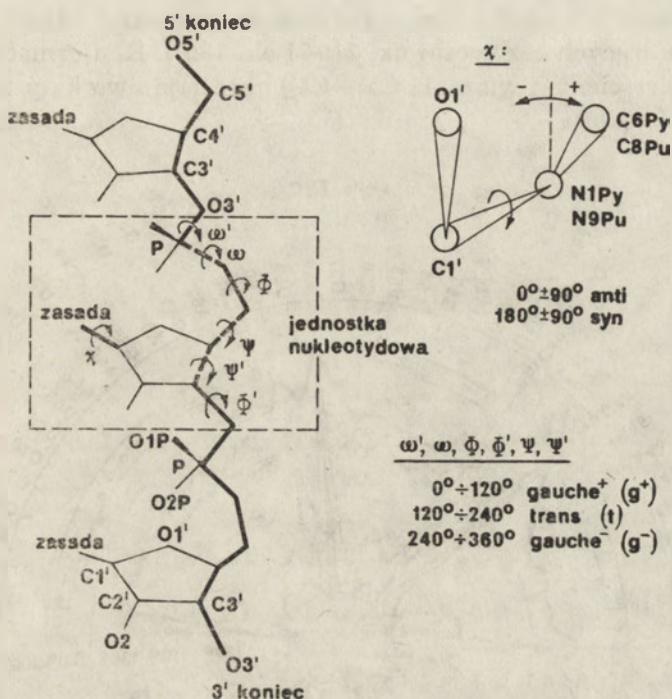
Asocjacja warstwowa zasad purynowych i pirymidynowych stanowi, jak można sądzić, najważniejszy pod względem energetycznym czynnik stabilizujący przestrzenną strukturę cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach. Regiony, w których system oddziaływań typu asocjacji warstwowej zostaje osłabiony lub przerywany są najprawdopodobniej regionami najbardziej podatnymi na zmiany konformacyjne w cząsteczce tRNA w roztworze (są najbardziej „giętkie”).

I-3. Energia konformacyjna cząsteczki

Helikalną konformację łańcucha polinukleotydowego wyznaczają oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe bliskiego zasięgu typu ryboza-ryboza, ryboza-zasada i fosforan-fosforan, a również oddziaływania określające uprzywilejowane konformacje każdej jednostki nukleotydowej. Utworzo-

na struktura stabilizowana jest energetycznie przez oddziaływania typu asocjacji warstwowej zasad oraz wiązania wodorowe zasada-zasada.

Konformację łańcucha polinukleotydowego określa się, zgodnie z propozycją Sundaralingama (29) poprzez podanie wartości siedmiu kątów torsyjnych: κ , ϕ' , ϕ , ψ' , ψ , ω' , ω (Ryc. 5). Proponowana przez innych autorów odmienna symbolika (oraz inne definicje niektórych kątów torsyjnych) przedstawiona została w opracowaniu przeglądowym (30).

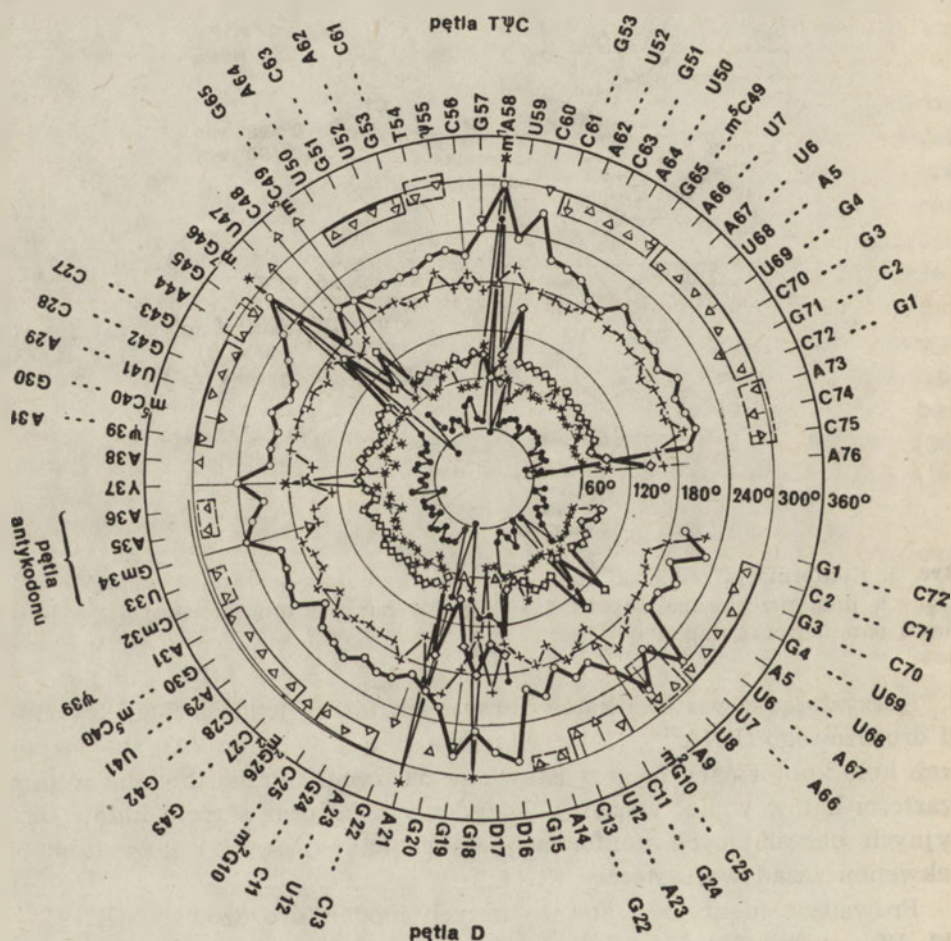


Ryc. 5. Konformacja jednostki nukleotydowej (kąty torsyjne wokół wiązań oznaczonych linią przerywaną odpowiadają wg (22) parametrom „zmiennym”, a linią ciągłą parametrom „stałym”).

Korzystając z wartości kątów torsyjnych formy jednoskośnej kryształu drożdżowego tRNA^{Phe} (16) Srinivasan i Olson (22) skonstruowali koło konformacyjne przedstawione na Ryc. 6. Przedstawiono w nim wartości kątów wokół wiązań glikozydowych (κ) oraz sześciu kątów torsyjnych określających konformację łańcucha ($\omega'\omega\phi\psi\psi'\phi'$) jako funkcję sekwencji zasad w cząsteczce tRNA.

Prowadząc identyczną analizę innych modeli drożdżowego tRNA^{Phe} (11, 18) autorzy (22) zauważyli, że chociaż wartości rozpatrywanych parametrów kątowych w różnych modelach tRNA^{Phe} są niekiedy dość rozbieżne, to jednak można bez większych trudności wyróżnić dwie ich zasadnicze kategorie: „stałe” i „zmiennie”. Zmiany każdego z tzw. para-

metrów „stałych” ϕ' i κ ograniczają się do niewielkiej przestrzeni konformacyjnej. W przeciwieństwie do nich, zmiany tzw. parametrów zmiennych: ω , ψ obejmują stosunkowo duże obszary przestrzeni konformacyjnej. Największą zmienność wykazuje kąt ω , który przybiera wartości obejmujące cały zakres różnych konformacji; najmniejsza zmienność kąta ψ ma związek z występowaniem dwóch różnych konformacji reszt cukrowych: C3' — endo i C2' — endo. Kąt torsyjny κ przybiera zazwyczaj wartości odpowiadające konformacji anti (κ : 0—60°) wokół wiązania glikozydowego. Zmiany wartości κ są sprzężone ze zmianami kątów torsyjnych ϕ' i ϕ (wynoszących zazwyczaj ok. 210° i ok. 180°). Konformację reszt cukrowych (pierścienia i wiązania C5'—C4') określają dwa kąty torsyjne ψ i ψ'



Ryc. 6. Koło konformacyjne dla modelu MRC cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} (strzałkami oznaczono wartości kątów. ω' — podstawa strzałki, ω — grot strzałki wg (22)).

i w większości przypadków jest to konformacja g^+g^+ . Ta kombinacja kątów wyznacza pozycję atomu O (5') w orientacji „gauche” w stosunku do atomów O (1') i C (3') pierścienia reszty cukrowej będącego w konformacji C3'-endo.

Dużym odchyleniom od wartości średniej kątów $\psi\psi'$ towarzyszą drastyczne zmiany kątów ω' i ω w regionach pętlowych tRNA (Ryc. 6).

Jak wynika z badań Sundaralingama i wsp. (31) konformacja g^-g^- ($\omega', \omega \simeq 290^\circ, 290^\circ$) jest najtrwalszą konformacją internukleotydogo wiązania fosfodwuestrowego i występuje w regionach podwójnie helikalnych kwasów nukleinowych. Konformacja tg^- ($\omega', \omega \simeq 190^\circ, 300^\circ$) jest charakterystyczna dla helikalnych regionów jednoniciowych, a konformacja tg^+ ($\omega' \omega \simeq 200^\circ, 60^\circ$) sprzyja tworzeniu się regionów pętlowych w łańcuchu polinukleotydowym (31). Różny zakres zmienności siedmiu kątów torsyjnych, umożliwiając ich umowny podział na „stałe” i „zmienne”, ma związek ze zróżnicowaną energią oddziaływań warunkujących istnienie określonej konformacji fragmentu łańcucha polinukleotydowego. Parametry „stałe” określają bardziej usztywnione elementy łańcucha, parametry „zmienne” natomiast opisują stosunkowo słabe energetycznie oddziaływania, a tym samym związane są elementami cząsteczki tRNA o większej potencjalnej ruchliwości. W cząsteczce tRNA^{Phe} jedynie podwójnie helikalne regiony zachowują najbardziej uprzywilejowaną, typową dla RNA-A konformację, w której:

$$\kappa = \text{anti}; \quad \varphi = t; \quad \varphi' = t; \quad (\psi\psi') = (g^+g^+); \quad (\omega'\omega) = (g^-g^-) (32).$$

Jednakże, występujący w tRNA specyficzny system silniejszych (aniżeli energia konformacyjna) oddziaływań typu asocjacji warstwowej i wiązań wodorowych wymusza deformacje tej najbardziej uprzywilejowanej konformacji. Ulegają jej w mniejszym stopniu kąty torsyjne sklasyfikowane jako „stałe”: $\varphi'\varphi$ i κ spełniające w większości przypadków jedynie, jak się wydaje, rolę przekaźnika naprężeń konformacyjnych manifestujących się głównie w dużej zmienności kątów torsyjnych: $\omega\omega'\psi$ i ψ' . Parametry o największej zmienności to kąty torsyjne $\omega\omega'$ określające konformację wokół internukleotydogo wiązania fosfodwuestrowych P-0. Są one najbardziej czułym detektorem zmian zachodzących w przestrzennej strukturze łańcucha polinukleotydowego tRNA.

I-4. Oddziaływania z jonami metali, poliaminami

Utworzenie względnie trwałej, zwartej przestrzennej struktury cząsteczki tRNA możliwe jest jedynie po zobojętnieniu ujemnych ładunków polianionowego łańcucha polinukleotydowego. Zachodzi to w drodze specyficznego, silnego wiązania koordynacyjnego kationów, bądź w drodze niespecyficznego, słabego wiązania kationów (9). W strukturze krystalicz-

nej cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} wyznaczono miejsca specyficznego, silnego wiązania jonów magnezu, sperminy oraz prawdopodobne miejsca wiązania niektórych cząsteczek wody (wyznaczono również miejsca wiązania jonów niektórych metali ciężkich stosowanych w analizie rentgenostrukturalnej, w metodzie izomorficznego podstawienia jonów). W niniejszym opracowaniu przedstawiono w postaci zbiorczego zestawienia wyniki uzyskane w czterech laboratoriach, na podstawie analizy dwóch form krystalicznych drożdżowego tRNA^{Phe} (Tab. 2). Ze względu na szereg poważnych wątpliwości i niejednoznaczności podkreślanych przez samych autorów pominięto podaną przez Rich'a i wsp. (8) oraz Hingerty i wsp. (16) lokalizację niektórych cząsteczek wody. Podkreślić jednak należy, że cząsteczki wody stanowią 71% formy ortorombowej i 63% formy jednoskośnej kryształu drożdżowego tRNA^{Phe} (33), a więc ich roli strukturotwórczej nie sposób w przyszłości ominąć.

Zbieżne, według autorów czterech modeli cząsteczki tRNA, miejsca występowania niektórych kationów (Tab. 2) potwierdzają przedstawione poniżej przypuszczenia, dotyczące roli, jaką odgrywają one w tworzeniu uporządkowanej struktury tRNA^{Phe} (9):

1° Dwa miejsca wiązania jonów magnezu (Mg 1 i Mg 2) w pobliżu reszt fosforanowych P 19, P 20 i P 21 mają zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowe znaczenie stabilizujące strukturę tRNA. Stabilizują ostry skręt łańcucha cukrowofosforanowego pętli dwuhydrourydyny oraz upakowanie cząsteczek tRNA wokół dwukrotnej osi śrubowej w formie ortorombowej i jednoskośnej kryształu.

2° Kation magnezu Mg 3 neutralizuje ładunki ujemne grup fosforanowych związane z utworzeniem bardzo ostrego skrętu łańcucha polinukleotydowego w obrębie U8-A12.

3° Konformacja antykodonu stabilizowana jest poprzez wiązanie kationu Mg²⁺ kryształ ortorombowy, bądź silne wiązanie cząsteczki wody *) (kryształ jednoskośny) w pobliżu Y 37.

4° Dodatnio naładowana cząsteczka sperminy położona w głębokiej bruzdzie ramion TψC i antykodonowego powoduje zbliżenie dwu przeciwnych krawędzi bruzdy o około 3 Å. W efekcie następuje rozchylenie osi ramion D i antykodonowego o około 25°, co może być jednym z czynników powodujących skrócenie pary zasad m²G26-A44, odgrywającej ważną rolę w systemie oddziaływań asocjacji warstwowej w cząsteczce tRNA^{Phe} (9).

Podsumowując powiedzieć należy, że w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} ładunki elektrostatyczne mogą być neutralizowane bądź przez ładunki punktowe (np. kationy Mg²⁺) bądź przez ładunki o charakterze „wydłużonym” (np. kationy sperminy). Przypuszczalnie, rola pierwszych

*) wg nowszych ustaleń grupy MRC również w formie jednoskośnej kryształu znajduje się kation magnezu Mg²⁺ zamiast wcześniej postulowanej cząsteczki wody (cyt. za Clark (96)).

Miejsca wiązania kationów magnezu i sperminy w czterech modelach cząsteczki tRNA^{Phe} w kryształach.

KATION	POŁOŻENIE	MIEJSCE ODDZIAŁYWANIA		
		MIT wg (8—9)	DUC wg (12a, b)	MSN wg (18)
Forma ortorombowa kryształu				
Mg ¹	pętla D	P19 oraz G20, U59, C60 (C56-oddziaływanie między- cząsteczkowe)	P19 oraz G20, U59, C60	P19 01, G20 06 G20 N7, C56 02 U59 04, C60 N3
Mg ²	pętla D	P20, P21 (P17-oddziaływanie między- cząsteczkowe)	P20, P21	P20 01 (Sm) P21 02
Mg ³	zwrot pomiędzy 8—12	P: 8, 9, 11, 12	P: 8, 9, 11, 12	P801 (Sm), P 9 01 P11 02, P12 02
Mg ⁴	pętla antykodonu	P37 oraz C32, Y37 A38, Ψ ³⁹ , A31	P37 oraz C32, Y37 A38, Ψ ³⁹	prawdopodobnie cząstecz- ka H ₂ O
Spermina NH ₃ (CH ₂) ₃ NH ₂ (CH ₂) ₄ — NH ₂ (CH ₂) ₃ NH ₂		pętla TΨC: U52, G53, T54, P59, P60, P50, P51 koniec 5': P1, P2		pętla D: P14 01 (Sm) P57 01
		1° głęboka bruzda między ra- mionami: D—antykodonu (P24, P25, G42, 06, P23, P44) 2° między P10 a łańcuchami pętli V (P47, P10, P9, P46, S45)	1° głęboka bruzda między ra- mionami: D—antykodonu 2° głęboka bruzda między ra- mionami T—akceptorowym	głębokie bruzdy ramion: (miejsca prawdopodobne) 1° akceptorowego (1—4 i 64—67) 2° TΨC (51—54 i 57—59) 3° antykodonu (37—43 i 24—28)

polega głównie na stabilizowaniu pewnych fragmentów cząsteczki tRNA (pętle, zwroty). Natomiast poliaminy mogą powodować zbliżanie dużych części cząsteczki wpływając istotnie na jej konformację (9). Rozbieżne miejsca występowania kationów magnezu i sperminy w modelach MIT, MRC, DUK i MSN cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} (Tab. 2) niekoniecznie wynikać muszą z „rzeczywistych” różnic strukturalnych. Etap lokalizacji kationów i cząsteczek wody jest bowiem ostatnim etapem uzgadniania rezultatów analizy rentgenostrukturalnej z zaproponowanym modelem cząsteczki, pozostawiającym autorom pewną swobodę interpretacji map gęstości elektronowej.

I-5. Oddziaływania między cząsteczkami tRNA

Opracowanie dotyczące struktury przestrzennej drożdżowego tRNA^{Phe} nie byłoby pełne bez analizy wpływu oddziaływań międzycząsteczkowych tRNA-tRNA na konformację cząsteczki w kryształach. Zagadnienie to porusza Kim i wsp. (12a, b) wyszczególniając jedynie miejsca kontaktów międzycząsteczkowych w kryształach formy ortorombowej. Znacznie mniej precyzyjne informacje dotyczą kryształu formy jednoskośnej (18).

W kryształach formy ortorombowej w oddziaływaniach międzycząsteczkowych zaangażowane są cztery regiony cząsteczki tRNA. Pierwszy region obejmuje pętle dwuhydrourydyny sąsiadujących w sieci krystalicznej cząsteczek: zasady trzech reszt: 17, 19 i 20 jednej cząsteczki tRNA oddziałują z resztami 14, 15 i 16 drugiej i resztą 56 cząsteczki trzeciej. Region ten stabilizowany jest dodatkowo przez dwa hydratowane jony magnezu (Mg1 i Mg2, Tab. 2). Drugi region oddziaływań obejmuje bardzo niewielką powierzchnię ramienia TψC jednej i ramienia akceptorowego drugiej cząsteczki tRNA: zlokalizowano wiązanie wodorowe między grupą hydroksylową 02' rybozy 5 jednej, a atomem tlenu grupy fosforanowej reszty 53 drugiej cząsteczki tRNA. W trzecim regionie oddziaływań międzycząsteczkowych zasada reszty 34 (pierwsza zasada antykodonu) oddziałuje warstwowo z analogiczną zasadą drugiej cząsteczki tRNA. Czwarty region obejmuje 3'-końcowy fragment cząsteczki tRNA. Reszta 76 jednej oddziałuje z hipermodyfikowaną zasadą reszty 37 drugiej cząsteczki tRNA. Ponadto reszty 75 i 76 jednej, oddziałują z resztami 28, 29 i 43 trzeciej (patrząc wzdłuż osi krystalograficznej) cząsteczki tRNA (12a, b).

W kryształach formy jednoskośnej (18) w oddziaływaniach międzycząsteczkowych uwikłane są tylko trzy regiony cząsteczki tRNA. Pierwszy region: w pętli D oddziałują reszty 19 i 20 jednej z resztami 16 i 17 drugiej cząsteczki tRNA. Drugi region oddziaływań: między ramieniem TψC (reszty 53 i 54) a aminokwasowym (reszty 5 i 6) dwóch sąsiadujących w sieci

krystalicznej cząsteczek tRNA. Trzeci region oddziaływań: grupy hydroksylowa 02' reszty 62 jednej i łańcuch cukrowofosforanowy pętli antykodonu drugiej cząsteczki tRNA (18).

Choć w oddziaływaniach tRNA-tRNA w kryształach drożdżowego tRNA^{Pho} nie uczestniczą tak istotne (z punktu widzenia aktualnych poglądów na funkcję tRNA) regiony cząsteczki jak np. w kryształach tRNA^{Asp} (gdzie oddziałują wzajemnie komplementarne antykodony sąsiadujących w sieci cząsteczek (28)), to jednak wpływu tych oddziaływań na konformację cząsteczki zaniedbać nie można. Jak się wydaje, mogą być one jednym z powodów różnic w konformacji cząsteczek tRNA w kryształach formy ortorombowej i jednoskośnej. Różnice te w sposób prosty i czytelny przedstawia Srinivasan i Olson w swoim opracowaniu (22).

Rola oddziaływań międzycząsteczkowych jest zazwyczaj pomijana przy próbach porównywania struktury cząsteczki tRNA w kryształach i w roztworze. Wynika to w głównej mierze z braku wystarczającej ilości informacji (o odpowiedniej precyzji) pozwalających rozdzielić wpływ efektów wewnątrz- i międzycząsteczkowych na konformację tRNA.

II. Struktura drożdżowego tRNA^{Pho} w roztworze

II-1. Jądrowy rezonans magnetyczny

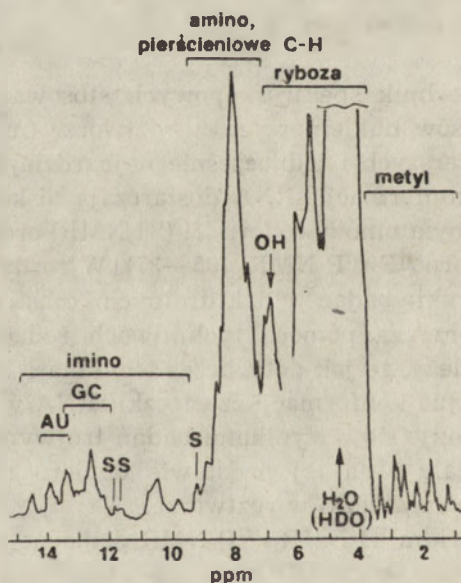
Spśród wielu technik spektroskopowych stosowanych w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych w roztworze (m.in. UV, CD, EPR, fluorescencja), najszerzych i jednocześnie najbardziej szczegółowych informacji na temat konformacji tRNA dostarczają nisko- i wysokopolowy rezonans magnetyczny atomów wodoru ¹H (¹H NMR) oraz rezonans magnetyczny atomów fosforu ³¹P (³¹P NMR) (35—37). W rozdziale tym przedstawione zostaną wyniki badań strukturalnych cząsteczki drożdżowego tRNA^{Pho} w roztworze za pomocą tych dwóch rodzajów spektroskopii NMR. Podkreślić należy, że jak dotychczas technika NMR nie pozwala na bezpośrednie określenie konformacji cząsteczki tRNA w roztworze. Otrzymane wyniki porównuje się z wynikami badań trójwymiarowej struktury cząsteczki w kryształach i na tej podstawie dopiero można formułować wnioski o strukturze cząsteczki w roztworze.

W interpretacji widm ¹H NMR i ³¹P NMR pomocne okazują się:

- chemiczna modyfikacja tRNA
- „topnienie” struktury cząsteczki
- efekty paramagnetycznego poszerzenia sygnałów
- analiza fragmentów cząsteczki
- przewidywanie przesunięć chemicznych sygnałów na podstawie obliczonych efektów prądów pierścieniowych sąsiadujących w strukturze zasad.

Badania prowadzone z wykorzystaniem pierwszych czterech metod dostarczyły bardzo cennych informacji dotyczących występowania w roztworze szeregu oddziaływań oraz lokalizacji w widmie NMR odpowiadających im sygnałów. Informacje te dotyczyły jednakże tylko oddziaływań jednostkowych, nie mówiąc wiele o konformacji cząsteczki tRNA jako całości. Precyzyjną, całościową korelację pomiędzy strukturą cząsteczki tRNA w roztworze i w kryształach powinny umożliwić badania prowadzone ostatnią z wymienionych metod, w której na podstawie precyzyjnej analizy struktury w kryształach (odległości i geometrii poszczególnych par zasad lub położenia poszczególnych atomów), przewiduje się przesunięcia chemiczne sygnałów w widmie NMR cząsteczki w roztworze. Przy założeniu, że w roztworze zachowany jest identyczny jak w kryształach układ oddziaływań w cząsteczce tRNA: asocjacja warstwowa zasad, wiązania wodorowe, kąty torsyjne, widmo symulowane powinno być zgodne z obserwowanym widmem cząsteczki w roztworze.

Widmo protonowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR) tRNA wykazuje kilka oddzielnych grup sygnałów o różnych wartościach przesunięcia chemicznego, w zakresie od 0 do 15 ppm w dół pola, względem DSS (Ryc. 7).



Ryc. 7. Widmo ^1H NMR cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} (złożenie widma wykonanego w D_2O (po prawej) i w H_2O (po lewej); S — sygnał rezonansowy pojedynczego protonu) (wg (89)).

II-1-1. Protonowy rezonans magnetyczny

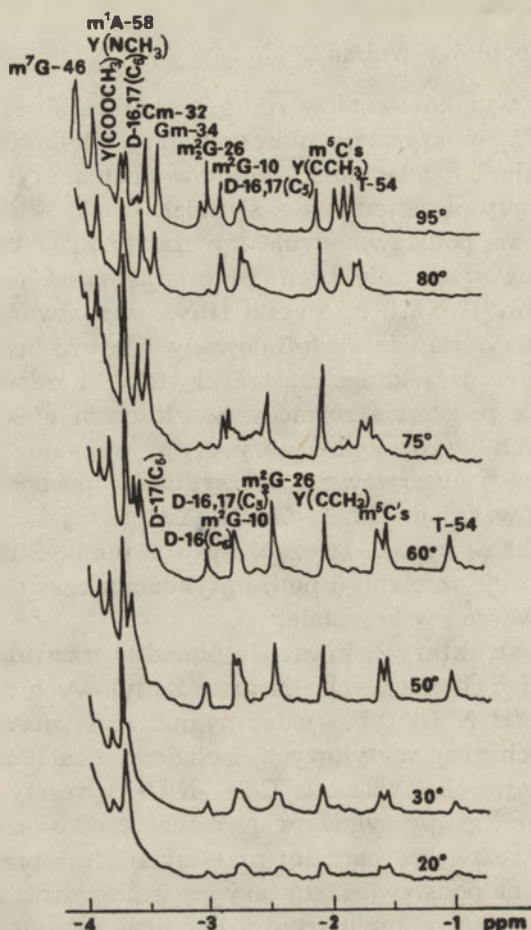
a. region wysokopolowy widma

Na podstawie wyników analizy rentgenostrukturalnej cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach obliczono (38) wielkości spodziewanych efektów przesłaniania/odsłaniania protonów grup metylowych i metylenowych przez prądy pierścieniowe sąsiednich zasad. Wielkości tych efektów (obliczonych na podstawie struktury cząsteczki w kryształach), porównano z obserwowanymi efektami przesłaniania/odsłaniania protonów w wysokopolowym ¹H NMR cząsteczki tRNA w roztworze (obserwowany efekt przesłaniania/odsłaniania zdefiniowany jako różnica przesunięć chemicznych sygnałów w widmie cząsteczki tRNA i odpowiednich mononukleotydów). Na podstawie różnic w wartościach efektów obserwowanych i obliczonych wyróżniono cztery grupy sygnałów rezonansowych. Wartości obliczone i obserwowane dla sygnałów pochodzących od odpowiednich protonów zasad: Cm32, Gm34, Y37 (wszystkie cztery sygnały grup metylowych) są zgodne (w zakresie 0,1 ppm). Sugeruje to bardzo podobną konformację ramienia i pętli antykodonu cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze i w kryształach.

Na podstawie struktury w kryształach ponadto przewidziano dwie różne wartości przesunięć chemicznych dla grup metylowych m²G26. Obserwowany w widmie ¹H NMR tylko jeden sygnał rezonansowy, wspólny dla protonów obu tych grup metylowych, świadczy o zachodzącej w roztworze szybkiej rotacji wokół wiązania C(2)—N(CH₃)₂ reszty m²G26. Protony należące do drugiej grupy sygnałów pochodzące od zasad: m²G10, m⁵C49 i D16, D17 są w roztworze bardziej przesłaniane niż przewidują to obliczenia wykonane na podstawie struktury cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach. Natomiast w mniejszym niż w kryształach stopniu, przesłanianie są sygnały protonów zasad m⁷G46, m¹A58 (trzecia grupa sygnałów). Do grupy czwartej zaliczono obserwowane dwa sygnały rezonansowe protonów T54 (38).

Jednakże, jak stwierdzono w dalszych badaniach, w widmie ¹H NMR cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} wykonanym w niskiej temperaturze i w obecności jonów Mg²⁺ występuje tylko jeden sygnał rezonansowy T54 (Ryc. 8).

W przestrzennej strukturze cząsteczki tego tRNA w kryształach, T54 jest związana wodorowo z m¹A58 oraz ta para zasad znajduje się w systemie oddziaływań typu asocjacji warstwowej między parą zasad G53—C61, a ψ55—G18. Ponadto region ten stabilizowany jest przez trzeciorzędowe oddziaływania między pętlami TψC i dwuhydrourydyny. Po uwolnieniu pętli TψC z oddziaływań trzeciorzędowych (podczas topnienia struktury przestrzennej cząsteczki tRNA), prawdopodobnie ulega zmianie układ asocjacji warstwowej T54 z parą zasad G53—C61, co zdaniem autorów może wyjaśniać obserwowaną multipletowość sygnału T54 (39). Analiza

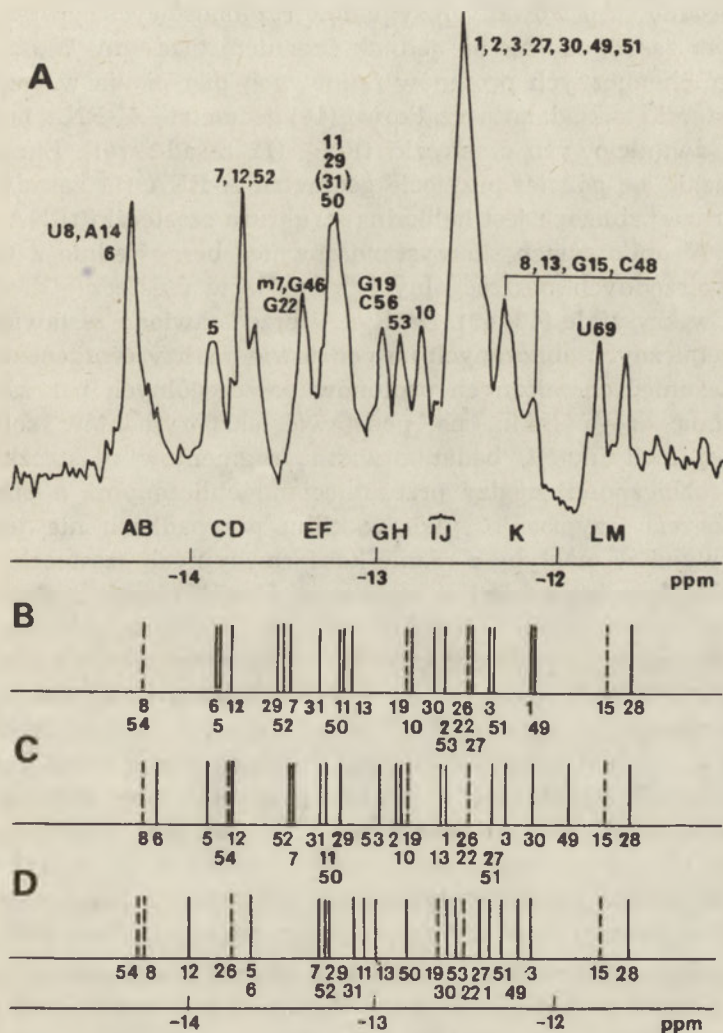


Ryc. 8. Widma ^1H NMR (270 MHz) cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} — region wysokopolowy, wykonane w różnych temperaturach (39).

wysokopolowych widm temperaturowych (Ryc. 8) wykazała również, że jedna z reszt dwuhydrourydyny — D16 — bierze udział w oddziaływaniach wyższego rzędu utrzymujących przestrzenną strukturę cząsteczki tRNA. Druga reszta — D17 — nie bierze udziału w oddziaływaniach tego typu (39). Obserwacja ta jest zgodna z wcześniejszymi ustaleniami dotyczącymi konformacji tego fragmentu cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach (16). Porównując ponadto sygnały rezonansowe Gm34 w widmach temperaturowych tRNA^{Phe} wykonanych w obecności (39) i w nieobecności (40) jonów Mg^{2+} stwierdzono, że w obecności jonów Mg^{2+} zarówno Cm jak i Gm w pętli antykodonu uczestniczą w silnych oddziaływaniach typu asocjacji warstwowej oraz, że Mg^{2+} odgrywa ważną rolę w stabilizacji konformacji antykodonu (39).

b. region niskopolowy widma

Niskopolowy protonowy NMR cząsteczek tRNA umożliwia obserwację sygnałów protonów biorących udział w tworzeniu wiązań wodorowych między komplementarnymi zasadami, czyli tzw. protonów iminowych pierścienia heteroaromatycznego (35). Wyniki szeregu wcześniejszych badań (widma o niskiej rozdzielczości) ograniczały się zasadniczo do określenia liczby drugo- i trzeciorzędowych par zasad w cząsteczkach tRNA



Ryc. 9. Widmo ¹H NMR (360 MHz) cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe}. A: eksperymentalne (42); przypisanie sygnałów rezonansowych (wg (34)), B: obliczone (42) na podstawie współrzędnych atomów w kryształ (wg (10)), C: obliczone (42) na podstawie współrzędnych atomów w kryształ (wg (6)), D: obliczone (43) na podstawie współrzędnych atomów w kryształ (wg (10)).

(41). Stwierdzono, że ogólna ich liczba w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze odpowiada liczbie drugo- i trzeciorzędowych oddziaływań zasada-zasada w strukturze cząsteczki w kryształach. Obecność wielu rozdzielonych sygnałów, w zakresie od -11 do -15 ppm wskazywała, że na różne przesunięcia chemiczne protonów ma wpływ sekwencja zasad i ich przestrzenne usytuowanie. Badania prowadzone tą techniką, po zwiększeniu rozdzielczości widm, powinny więc dostarczać szczegółowych informacji o strukturze cząsteczki w roztworze. Widmo NMR (region niskopółowy) drożdżowego tRNA^{Phe} przedstawia Ryc. 9.

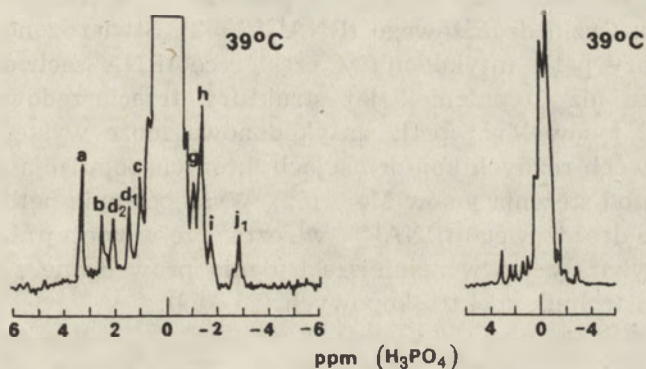
Przypisanie obserwowanych sygnałów rezonansowych, protonom określonych par zasad, okazało się jednak zadaniem trudnym. W obliczeniach przesunięć chemicznych protonów iminowych pierścienia w trzonach ramion cząsteczki zakładano początkowo (44) geometrię A'-RNA helikalnych regionów dwuniciowych cząsteczki tRNA (12 zasad/skręt). Bardziej właściwe okazało się później przyjęcie geometrii A-RNA (11 zasad/skręt), do której bardziej zbliżona jest helikalna struktura cząsteczki tRNA w kryształach (45). W obliczeniach skorzystano również bezpośrednio z wyznaczonych współrzędnych poszczególnych atomów w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach (42, 43). Na Ryc. 9 przedstawiono zestawienie przesunięć chemicznych obliczonych na podstawie analizy rentgenostrukturalnej i przesunięć chemicznych protonów poszczególnych par zasad ustalonych inną drogą (m.in. na podstawie eksperymentów selektywnej chemicznej modyfikacji, badania widm fragmentów cząsteczki tRNA). Znaczne rozbieżności między przesunięciami obliczonymi, a obserwowanymi (których przypisanie tylko w kilku przypadkach nie jest jednoznaczne) wynikać mogłyby z różnic konformacyjnych cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach i w roztworze. Jednak równie prawdopodobne jest to, że wynikają one z pólnościowego charakteru obliczeń, podczas których dokonuje się pewnych uproszczeń np. dotyczących relacji pomiędzy przesunięciem chemicznym protonu, a efektem pola wywołanym przez prądy pierścieniowe sąsiadujących zasad (42—43). Innym źródłem rozbieżności może być niewystarczająca precyzja wyznaczenia współrzędnych poszczególnych atomów w strukturze krystalicznej: autorzy (42—43) korzystali ze współrzędnych, w których położenia poszczególnych atomów mogły być obciążone błędem dochodzącym do 0,5 Å (6, 10, 14). Te same efekty, jak można sądzić, wpływają na rozbieżności przesunięć obliczonych i obserwowanych w wysokopółowym regionie widma (38).

Szczególnie interesujące, z punktu widzenia zastosowania niskopółowego, protonowego NMR do badania dynamiki konformacyjnej tRNA, są sygnały protonów biorących udział w tworzeniu trzeciorzędowych wiązań wodorowych typu zasada-zasada. Odpowiedniego przypisania sygnałów rezonansowych tym protonom dokonano na podstawie m.in. selektywnej modyfikacji chemicznej zasad (U8—A14 (46—47)) chemicznego usunięcia m⁷G46 (m⁷G46—C22 (48)) paramagnetycznego poszerzenia sygnałów

(G15—C48 (49)) oraz badania widm fragmentów cząsteczki tRNA z zachowanymi niektórymi drugo- i trzeciorzędowymi wiązaniami wodorowymi (50—51).

II-1-2. Rezonans magnetyczny atomów fosforu ³¹P

Najpowszechniej występującą konformacją wiązań fosfodwuestrowych w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, jest konformacja określana jako g⁻g⁻. Jednakże konformacja szeregu grup fosforanowych łańcucha polinukleotydowego jest odmienna, co manifestuje się w widmie ³¹P NMR w postaci szeregu sygnałów oddzielonych od głównego sygnału rezonansowego (36).



Ryc. 10. Widmo ³¹P NMR (40,5 MHz) cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} (52).

W widmie ³¹P NMR drożdżowego tRNA^{Phe}, postępując w górę pola (od 3 do -4 ppm w stosunku do sygnału H₃PO₄), kolejno występują sygnały dwuestrów fosforanowych o konformacjach: g⁻t; g⁻g⁻; g⁻g⁺ (37, 52). Przesunięcie sygnału w górę pola następuje również w wyniku powstania wiązania wodorowego z udziałem grupy fosforanowej (37). Wiązania tego typu są dość powszechne w strukturze drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach.

Z punktu widzenia struktury cząsteczki tRNA, pośród sygnałów rezonansowych można wyróżnić sygnały grup fosforanowych specyficznie zwinętej pętli antykodonu oraz sygnały grup fosforanowych centralnej części cząsteczki tRNA, które są zaangażowane w utrzymywanie jej struktury trzeciorzędowej (37). Próby obliczeń przesunięć chemicznych sygnałów rezonansowych z wykorzystaniem kątów torsyjnych ωω', wyznaczonych w strukturze drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, nie dały jednak zadowalających rezultatów (53). Nie wydaje się to dziwne wobec podkreślanej wcześniej w opracowaniu, największej wrażliwości kątów torsyjnych ωω' na zmiany konformacji cząsteczki tRNA. Obserwowane rozbieżności związane są też ze względnie niską (jak na potrzeby korelacji „kry-

sztal-roztwór”) dokładnością z jaką wyznaczono kąty torsyjne estrów fosforanowych w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach (53). Jak wynika z przeprowadzonych obliczeń (54) bardzo silny wpływ na przesunięcia chemiczne sygnałów mogą wywierać również naprężenia kąta wiązania estrowego O-P-O; zmniejszenie tego kąta o około 10° powoduje przesunięcie sygnału rezonansowego w dół pola aż o 20—30 ppm.

Na podstawie badań chemicznie i enzymatycznie zmodyfikowanej cząsteczki tRNA Hilbers i wsp. (37) wstępnie zidentyfikowali sygnały rezonansowe ³¹P w widmie NMR drożdżowego tRNA^{Phe}. Identyfikacja sygnałów oraz zaobserwowanie wrażliwości przesunięć chemicznych atomów ³¹P estrów fosforanowych na zmiany estrowych kątów torsyjnych ωω' i kątów wiązań O-P-O, stwarza możliwości badania dynamicznej struktury tej cząsteczki w roztworze.

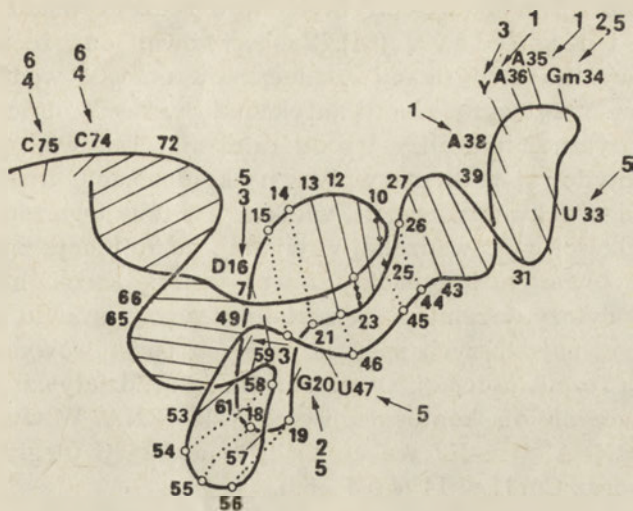
Szeregu interesujących informacji dostarczyły widma temperaturowe ³¹P NMR cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} (52). Stwierdzono, że „topnienie” struktury pętli antykodonu w cząsteczce tRNA zachodzi w niższej temperaturze niż „topnienie” jej struktury trzeciorzędowej. Ponadto, w obecności jonów Mg²⁺ pętla antykodonowa może występować w nie mniej niż dwóch różnych konformacjach, których populacja zależy w dużym stopniu od stężenia jonów Mg²⁺ (52). Występowanie pętli antykodonu w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze w więcej niż jednej konformacji, wykazały też wcześniejsze badania prowadzone z wykorzystaniem innych technik spektroskopowych (55—59).

II-2. Chemiczna modyfikacja

Chemiczna modyfikacja składników kwasów nukleinowych jest metodą szeroko stosowaną w badaniach struktury tRNA w roztworze. O jej upowszechnieniu zdecydowała przede wszystkim zdolność do wnिकania w detale struktury przestrzennej tRNA przy pomocy stosunkowo prostych narzędzi badawczych jakimi są zachodzące w łagodnych warunkach specyficzne reakcje chemiczne. Wyznaczone reaktywności poszczególnych fragmentów cząsteczki tRNA (zasad, fosforanów) z reagentem modyfikującym, umożliwiają porównanie struktury drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze ze strukturą w kryształach na poziomie indywidualnej reszty makrocząsteczki.

W badaniach zastosowano czynniki modyfikujące specyficznie wszystkie podstawowe zasady tRNA (Ryc. 11).

Stosowane reagenty modyfikują zasady w eksponowanych jednonicowych regionach struktury tRNA, a nie modyfikują zasad uczestniczących w tworzeniu wiązań wodorowych. Umożliwiło to eksperymentalne potwierdzenie obecności w roztworze drugorzędowej struktury cząsteczki tRNA (liścia koniczyny), a także zidentyfikowanie niektórych zasad



Ryc. 11. Chemiczna reaktywność zasad w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} :

1 kwas mononadftalowy (63), 2 ketoksal (62), 3 NaBH₄ (67), 4 metoksyamina (69), 5 karbodwuimid (69), 6 J₂/TlCl₃ (66).

uczestniczących w tworzeniu struktury trzeciorzędowej. Stosując ketoksal wykazano (61—62), że spośród reszt guaniny z regionów pętlowych tylko G20 i Gm34 ulegają reakcji modyfikacji, co jest w pełni zgodne z ekspozycją położeniem tych reszt w strukturze cząsteczki w kryształach. Zastosowanie kwasu mononadftalowego do modyfikacji ekspozycywnych reszt adeniny wykazało, że modyfikacji uległy reszty A35, A36 i A38 w pętli antykodonu oraz A76 na końcu 3' cząsteczki (63). Interesujące w tym przypadku wydaje się zestawienie reaktywnej reszty adeniny A38 i nie ulegającej modyfikacji reszty adeniny A73. Obydwie zasady w strukturze krystalicznej cząsteczki znajdują się w przedłużonym obszarze oddziaływań typu asocjacji warstwowej: A38 z trzonu ramienia antykodonowego, A73 z trzonu ramienia akceptorowego. Ponadto A38 bierze udział w silnym wiązaniu kationu magnezu w pętli antykodonu, który powinien dodatkowo stabilizować konformację tego fragmentu cząsteczki. Modyfikację reszty adeniny A38 można wytłumaczyć występowaniem w roztworze odmiennej niż w kryształach konformacji pętli antykodonu. Jak wspomniano wcześniej, na występowanie pętli antykodonu w roztworze w więcej niż jednej konformacji wskazują wyniki szeregu badań z wykorzystaniem technik spektroskopowych (55—59). Jednak nie można wykluczyć, że efektem przemiany konformacyjnej pętli antykodonu w tym przypadku może być modyfikacja reszt adeniny A35 i A36 ekspozycywnych w strukturze cząsteczki, która mogłaby zaburzać oddziaływania istniejące w pętli w ten sposób, że reszta adeniny A38 staje się dostępna dla kwasu mononadftalowego.

Na możliwość zmian strukturalnych tego rodzaju wskazują badania Berstena i Kisseleva (64). Zaobserwowali oni, że w tRNA^{Trp}, zamiana (w wyniku modyfikacji cząsteczki za pomocą wodorosiarczyny sodu) trzech reszt cytozyny z pętli antykodonu w reszty uracylu, zmienia obraz enzymatycznej hydrolizy trzonu ramienia. Tak więc zmiana sekwencji nukleotydowej pętli ma wpływ na konformację trzonu ramienia antykodonowego. Jak można sądzić, wielkość efektów tego rodzaju zależy będzie od wielkości, wprowadzonej w wyniku modyfikacji, zmiany strukturalnej. W cytowanym przypadku zmiana ta była szczególnie znacząca: aż trzy reszty cytozyny zamienione zostały w reszty uracylu tj. w zasady uczestniczące w najsłabszych spośród czterech podstawowych zasad oddziaływaniach typu asocjacji warstwowej, a oddziaływania te mają szczególne znaczenie dla konformacji cząsteczki tRNA. W wyniku reakcji drożdżowego tRNA^{Phe} z KJ wobec TlCl₃ modyfikacji uległy reszty C74 i C75 w 85% oraz Cm32 w 14% (65—66).

W strukturze krystalicznej cząsteczki, reszty C74 i C75 znajdują się w eksponowanym położeniu na końcu długiego heliksu utworzonego przez ramiona aminokwasowe i TψC, natomiast Cm32 z pętli antykodonu znajduje się w systemie oddziaływań asocjacji warstwowej, między trzonem ramienia antykodonowego i resztą U w pozycji 33. To uwikłanie reszty Cm32, w połączeniu z udziałem w oddziaływaniu z kationem magnezu, może tłumaczyć jej niską, chociaż mierzalną reaktywność. Reakcja z borowodorkiem sodu prowadziła do modyfikacji D16, D17 oraz Y, nie uległy modyfikacji m⁷G46 i m¹A58 (67—68). Natomiast, gdy modyfikacji poddano tylko połowę 3' cząsteczki tRNA, stwierdzono pełną reaktywność m⁷G46 i m¹A58. Rezultaty te potwierdzają zaangażowanie tych reszt w tworzeniu struktury trzeciorzędowej w roztworze i są w pełni zgodne z wynikami badań rentgenostrukturalnych. Rhodes (69) użyła metoksyaminę do modyfikacji reszt cytozyny oraz karbodwuimidu do modyfikacji eksponowanych reszt guaniny, uracylu i dwuhydrouuracylu. Modyfikacji uległy: D16, (G18), G20, Cm32, U33, Gm34, U47, C74 i C75. Całkowitą (100%) modyfikację reszt cytozyny C74 i C75 uzasadnia ich występowanie w eksponowanym, jednoniciowym fragmencie, stanowiącym koniec 3' cząsteczki. Stopień modyfikacji zasad pętli antykodonu wzrasta w kolejności: Cm32 < U33 < Gm34. W strukturze krystalicznej Cm32, jak już wspomniano wyżej, oddziałuje poprzez asocjację warstwową z trzonem ramienia antykodonowego z jednej, a resztą uracylu U33 z drugiej strony. Między resztą U33 a Gm34 następuje silny skręt łańcucha cukrowofosforanowego, przy czym reszta Gm34 rozpoczyna budowę kompleksu asocjacyjnego zasad antykodonu. Wzrastający stopień modyfikacji reszt w kolejności Cm32, U33 i Gm34, jest więc zgodny ze wzrostem stopnia eksponowania tych reszt, stwierdzonym w strukturze krystalicznej. Podobnie całkowita modyfikacja reszty uracylu U47 z pętli dodatkowej jest zgodna z jej silnym przestrzennym eksponowaniem w strukturze czą-

steczki w kryształach. Spośród zasad pętli D, modyfikacji ulegają D16, D20 oraz w niewielkim stopniu G18. Reszta dwuhydrouacylu D16 w strukturze drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, jak wykazali Hingerty i wsp. (16), bierze udział w tworzeniu struktury trzeciorzędowej oddziałując z resztą cytozyny C60 (D16 N3 — C60 02; Tab. 1). Uwikłanie D16 w oddziaływania trzeciorzędowe w strukturze drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze potwierdzono (39) techniką ¹H NMR, natomiast uleganie przez D16 modyfikacji karbodwuiminem potwierdził również niedawno Fournier i wsp. (70—71). Stwierdzono ponadto istnienie zależności stopnia modyfikacji reszt D16 i G20 od stężenia jonów Mg²⁺, co mogłoby sugerować ich znaczny wpływ na konformację tego regionu cząsteczki (70—71).

W roku 1980 Peattie i Gilbert przedstawili nową, opartą na innych założeniach i analityce, metodę badania struktury przestrzennej kwasów nukleinowych, którą zastosowali do badania struktury drożdżowego tRNA^{Phe} w roztworze (72) (metodę zastosowano także do badania struktury innych RNA oraz kompleksów RNA-białko (73—76)). Metoda ta stanowi połączenie chemicznej modyfikacji zasad za pomocą odczynników o charakterze alkilującym (siarczan dwumetylowy, pirowęglan dwumetylowy), z żelową techniką frakcjonowania fragmentów RNA. Modyfikacji ulega tylko niewielka część (ok. 1%) cząsteczek tRNA, a zmodyfikowane zasady mają znacznie osłabione wiązanie glikozydowe. W wyniku kolejnych reakcji chemicznych jakimi są kwasowa hydroliza i reakcja z aniliną (77) następuje usunięcie modyfikowanych zasad z łańcucha cukrowofosforanowego RNA i jego przerwanie w miejscach modyfikacji. Jeśli użyto tRNA znakowany ³²P na końcu 3' lub 5', możliwa jest szybka lokalizacja miejsc modyfikacji z wykorzystaniem w analizie techniki poliakryloamidowych żeli sekwencyjnych.

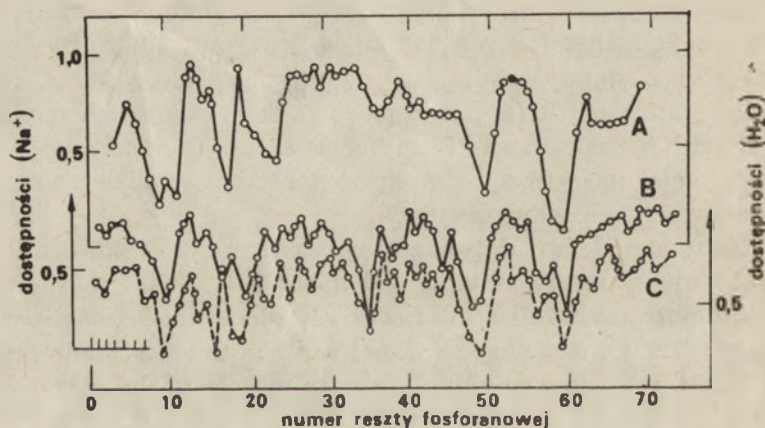
Stosując tę metodę stwierdzono, że w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} modyfikacji uległy reszty guaniny: G1, G18, G19, G30, Gm34, G45, G65, G71; reszty cytozyny C74 i C75 oraz że nie uległa modyfikacji żadna reszta adeniny (72). Oprócz eksponowanej w strukturze krystalicznej reszty guaniny Gm34, reagują więc również reszty biorące udział w trzeciorzędowych (G18, G19, G45), a nawet i w drugorzędowych (G1, G30, G65, G71) oddziaływaniach. Fakty te autorzy tłumaczą specyficnością siarczanu dwumetylu, który alkiluje reszty guaniny na atomie azotu N—7; w strukturze drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach, atom ten jest dostępny dla reagenta w resztach, które uległy reakcji w roztworze.

Ponadto potwierdzono, że tRNA w roztworze — podobnie jak i w kryształach — zawiera niektóre trzeciorzędowe wiązania wodorowe (G57 — ψ55 2' OH i G22 — m⁷G46). Spośród reszty cytozyny, modyfikacji uległy jedynie C74 i C75. Nie stwierdzono modyfikacji reszt Cm32 i C60, co spowodowane jest prawdopodobnie blokowaniem atomów azotu N3 tych reszt (miejsce alkilowania za pomocą siarczanu dwumetylu), przez obecne w tych regionach cząsteczki (Tabl. 1) kationy Mg²⁺. Przedstawiona powy-

zej metoda stanowi nowe, bardzo interesujące podejście z punktu widzenia założeń: statystycznej reakcji ulega bardzo niewielki procent cząsteczek tRNA (do zaniedbania jest więc potencjalny efekt zmian konformacyjnych wywołanych modyfikacją), a ponadto analiza miejsc modyfikacji jest prosta i szybka.

W przedstawionych powyżej badaniach stosowano odczynniki specyficzne dla zasad; uzyskane w tym przypadku informacje dotyczą regionów pętlowych cząsteczki, jej końcowego 3' fragmentu oraz niektórych oddziaływań trzeciorzędowych.

Natomiast do badania sposobu zwinienia łańcucha cukrowofosforanowego w cząsteczce drożdżowego tRNA^{Phe} Vlassov i wsp. (78—79) zastosowali metodę modyfikacji reszt fosforanowych za pomocą etylo-nitrozomocznika. Podstawowe zasady metody modyfikacji i analizy są podobne jak we wcześniej przedstawionej metodzie modyfikacji zasad opracowanej przez Peattie i Gilberta. Jednakże w tym przypadku stosowana procedura analityczna umożliwia ilościowy pomiar stopnia modyfikacji poszczególnych reszt fosforanowych, co pozwoliło autorom (78—79) na porównanie ich reaktywności w roztworze oraz sterycznej dostępności dla cząstek wody i kationów sodu (Ryc. 12).



Ryc. 12. Porównanie chemicznej reaktywności reszt fosforanowych w natywnym drożdżowym tRNA^{Phe} (A) i obliczonych (81—82) sterycznych dostępności atomów tlenu reszt fosforanowych dla jonów Na⁺ (B) i cząsteczek wody (C) w krystalicznej strukturze cząsteczki tRNA (wg (79)).

Steryczne dostępności atomów tlenu reszt fosforanowych liczone na podstawie współrzędnych poszczególnych atomów w strukturze krystalicznej cząsteczki tRNA i odpowiednich promieni van der Waalsa, według oryginalnej metody opracowanej do badania białek (80) a zastosowanej następnie (81, 82) dla cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe}. Na podstawie zestawienia przedstawionego na Ryc. 12, autorzy (79) stwierdzają bardzo

z *E. coli* ma tylko jedno miejsce silnego wiązania jonu magnezu (90), w cząsteczkach innych tRNA stwierdzono obecność od 4 do 6 miejsc wiązania Mg^{2+} o stałych wiązania ok. 10^5 mol^{-1} (9). Cząsteczki tRNA wiążą ponadto 20—36 jonów magnezu o mniejszej stałej powinowactwa (ok. 10^3 mol^{-1}) (89). Te miejsca wiązania nie są specyficzne dla jonów magnezu, mogą być bowiem wiązane kationy jednowartościowe np. sodu lub kationy poliamin np. sperminy (9).

Poliaminy (spermina, spermidyna czy putrescyna), występujące w komórkach wielu organizmów, znane są z ich wpływu na przebieg procesu biosyntezy białka. Między innymi odbywa się to poprzez udział w tworzeniu uporządkowanej struktury tRNA; w strukturze krystalicznej spermina wiąże się przede wszystkim z grupami fosforanowymi tRNA, ale może również wiązać się z zasadami.

Oddziaływania międzycząsteczkowe typu tRNA—tRNA w kryształach dyskutowane były w rozdziale I-5 tego opracowania. Stosunkowo duże stężenie cząsteczek tRNA w roztworze, jakie stosuje się podczas badań za pomocą różnych technik NMR, może również być źródłem zmian konformacyjnych wywołanych przez oddziaływania międzycząsteczkowe. Jednak słuszne wydaje się stwierdzenie, że rola oddziaływań typu tRNA—tRNA będzie w tym przypadku mniejsza niż w strukturze krystalicznej cząsteczki, podczas gdy w metodzie chemicznej modyfikacji, z uwagi na znacznie niższe stężenie tRNA, efekt ten w większości przypadków można zaniedbać.

Z całokształtu przedstawionych badań wynika, że główne oddziaływania w strukturze cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} w kryształach są zachowane w roztworze. Mówiąc o zachowaniu w roztworze oddziaływań typu asocjacji warstwowej zasad, wiązań wodorowych, należy jednak pamiętać o dynamicznym (równowagowym) charakterze tych oddziaływań. Badania dynamicznej struktury tRNA prowadzone były początkowo metodami wymiany atomów wodoru na tryt i sączenia molekularnego (91) oraz wymiany atomów wodoru na deuter i ^1H NMR (92).

Szerokie możliwości badania dynamicznej, fluktuacyjnej struktury dwuniciowych kwasów nukleinowych otworzyła technika pulsacyjnego protonowego NMR zastosowana do badań cząsteczki drożdżowego tRNA^{Phe} przez Johnstona i Redfielda (93) w 1977 roku. Zaobserwowali oni, że stałe wymiany protonów iminowych pierścienia (sygnały w niskopółowym regionie widma ^1H NMR) poszczególnych par zasad są dość zróżnicowane, zależą również od zmian strukturalnych w cząsteczce tRNA (wywołanych np. częściowym rozpleceniem struktury cząsteczki pod wpływem temperatury). Podobne obserwacje w przypadku cząsteczki tRNA^{Phe} z *E. coli* poczynili Hurd i Reid (94). Obserwacje te pozwalają spojrzeć na strukturę cząsteczki tRNA jako na dynamiczną, na przemian otwierającą i zamykającą się dwuniciową strukturę, o zróżnicowanej w poszczególnych regionach cząsteczki szybkości fluktuacji. Jednak pod-

kreślić należy, że zakres tych fluktuacji w przypadku cząsteczki tRNA jest znacznie bardziej ograniczony niż w przypadku dwuniciowych polinukleotydów (wymiana protonów zachodzi wielokrotnie wolniej (91—95)). Tego rodzaju badania dynamiki strukturalnej cząsteczki tRNA posłużą zapewne lepszemu zrozumieniu zmian konformacyjnych, którym ulega cząsteczka tRNA podczas procesu biosyntezy białka.

Zaakceptowano do druku 17.08.1983 r.

PIŚMIENNICTWO

1. RajBhandary U. L., Chang S. H., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 598—608.
2. Holley R. W., Apgar J., Everett G. A., Madison J. T., Marquisse M., Merrill S. H., Penswick J. R., Zamir A., (1965), *Science*, **N.Y.**, **147**, 1462—1465.
3. Suddath F. L., Quigley G. J., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Kim S. H., Rich A., (1974), *Nature*, **248**, 20—24.
4. Robertus J. D., Ladner J. E., Finch J. T., Rhodes D., Brown R. S., Clark B. F., Klug A., (1974), *Nature*, **250**, 546—551.
5. Cramer F., (1971), w *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, Wyd. W. E. Cohn, Vol. 11, 391—421, Academic Press, New York, London.
6. Quigley G. J., Seeman N. C., Wang A. H. J., Suddath F. L., Rich A., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 2329—2341.
7. Quigley G. J., Rich A., (1976), *Science*, **194**, 796—806.
8. Quigley G. J., Teeter M. M., Rich A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 64—68.
9. Teeter M. M., Quigley G. J., Rich A., (1980), *Nucleic Acid-Metal Ion Interaction*, Wyd. T. Spiro, s. 147—177, Wiley, New York.
10. Sussman J. L., Kim S. H., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 89—96.
11. Holbrook S. R., Sussman J. L., Warrant R. W., Church G. M., Kim S. H., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 2811—2820.
- 12a. Sussman L., Holbrook S. R., Warrant R. W., Church G. M., Kim S. H., (1978), *J. Mol. Biol.*, **123**, 607—630.
- 12b. Holbrook S. R., Sussman J. L., Warrant R. W., Kim S. H., (1978), *J. Mol. Biol.*, **123**, 631—660.
13. Ladner J. E., Jack A., Robertus J. D., Brown R. S., Rhodes D., Clark B. F. C., Klug A., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1629—1637.
14. Jack A., Ladner J. E., Klug A., (1976), *J. Mol. Biol.*, **108**, 619—649.
15. Jack A., Ladner J. E., Rhodes D., Brown R. S., Klug A., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 315—328.
16. Hingerty B., Brown R. S., Jack A., (1978), *J. Mol. Biol.*, **124**, 523—534.
17. Stout C. D., Mizuno H., Rubin J., Brennan T., Rao S. T., Sundaralingam M., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1111—1123.
18. Stout C. D., Mizuno H., Rao S. T., Swaminathan P., Rubin J., Brennan T., Sundaralingam M., (1978), *Acta Cryst.*, **B 34**, 1529—1544.
19. Rich A., Kim S. H., (1978), *Scientific American*, Wyd. W. Freeman, Vol. **238**, No 1, 52—62.
20. Yathindra N., Sundaralingam M., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 729—747.

21. Kim S. H., (1976), w *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, Wyd. W. E. Cohn, Vol. 17, 181—216, Academic Press, New York, London.
22. Srinivasan A. R., Olson W. K., (1980), *Nucleic Acids Res.*, **8**, 2307—2329.
23. Cantor C., Schimmel P., (1980), *Biophysical Chemistry*, Wyd. Frieeman, San Francisco.
24. Everett J. R., Hughes D. W., Bell R. A., Alkema D., Neilson T., Romaniuk P. J., (1980), *Biopolymers*, **19**, 557.
25. Alkema D., Mader P. A., Bell R. A., Neilson T., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2109—2117.
26. Kim S.H., Sussman J.L., Suddath F.L., Quigley G. J., McPherson A., Wang A. H., Seeman N. C., Rich A., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4970—4974.
27. Woo N. H., Roe B. A., Rich A., (1980), *Nature*, **286**, 346—351.
28. Moras D., Comarmond M. B., Fischer J., Weiss R., Thierry J. C., Ebel J. P., Giege R., (1980), *Nature*, **288**, 669—674.
29. Sundaralingam M., (1969), *Biopolymers*, **7**, 821—860.
30. Goddard J. P., (1977), *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **32**, 233—308.
31. Yathindra N., Sundaralingam M., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 3325—3328.
32. Hingerty B., (1979), *Biopolymers*, **18**, 1901—1915.
33. Kim S.H., Quigley G., Suddath F.L., McPherson A., Sneden D., Kim J. J., Weinzierl J., Rich A., (1973), *J. Mol. Biol.*, **75**, 421—432.
34. Johnston P. D., Redfield A. G., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1147—1156.
35. Kearns D. R., Patel D. J., Shulman R. G., (1971), *Nature (London)*, **229**, 338—340.
36. Gueron M., Shulman R. G., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3482—3485.
37. Salemink P. J., Swarthof T., Hilbers C. W., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3477—3485.
38. Kan L. S., Ts'o P. O. P., Sprinzl M., von der Haar F., Cramer F., (1977), *Biochemistry*, **16**, 3143—3153.
39. Davanloo P., Sprinzl M., Cramer F., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3189—3199.
40. Robillard G. T., Tarr C. E., Vosman F., Reid B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5261—5273.
41. Kearns D. R., (1976), w *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, Wyd. W. Cohn, Vol. 18, s. 91—149, Academic Press, New York.
42. Geerdes H. A. M., Hilbers C. W., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 207—221.
43. Robillard G. T., Tarr C. E., Vosman F., Reid B. R., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5261—5273.
44. Shulman R. G., Hilbers C. W., Kearns D. R., Reid B. R., Wong J. P., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 57—69. d
45. Reid B. R., Ribero N. S., McCollum L., Abbate J., Hurd R. E., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2086—2074.
46. Reid B. R., Ribeiro N. S., Gould G., Robillard G., Hilbers C. N., Shulman R. G., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2049—2054.
47. Wong K. L., Bolton P. H., Kearns D. R., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 446—451.
48. Hurd R. E., Reid B. R., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4017—4024.
49. Hurd R. E., Azhderian E., Reid B. R., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4012—4017.
50. Hurd R. E., Reid B. R., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4005—4011.

51. Boyle J., Robillard G. T., Kim S. H., (1980), *J. Mol. Biol.*, **139**, 601—625.
52. Salemink P. J., Reijerse E. J., Mollevanger L. C., Hilbers C. W., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **115**, 635—641.
53. Gorenstein D. G., Luxon B. A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 3796—3804.
54. Gorenstein D. G., (1975), *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 898.
55. Urbanke C., Maass G., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1551—1560.
56. Labuda D., Pörschke D., (1980), *Biochemistry*, **19**, 3799—3805.
57. Labuda D., Pörschke D., (1982), *Biochemistry*, **21**, 49—53.
58. Ehrenberg M., Rigler R., Wintermayer W., (1979), *Biochemistry*, **18**, 4588—4599.
59. Ehrlich R., Lefevre J. F., Remy P., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 145—153.
60. Kearns D. R., Wong K. L., Wong Y. P., (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 3843—3846.
61. Litt M., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3249.
62. Litt M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2223—2226.
63. von der Haar F., Schlimme E., Erdman U. A., Cramer F., (1971), *Bioorg. Chem.*, **1**, 282—293.
64. Beresten S., Kisselev L., (1981), *Biochimya AN SSSR*, **40**, 1331—1333.
65. Commerford S. L., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1993—2000.
66. Batey I. L., Brown D. M., (1975), *Mol. Biol. Rep.*, **2**, 65—72.
67. Igo-Kemens T., Zachau H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 459—466.
68. Igo-Kemens T., Zachau H. G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 292—298.
69. Rhodes D., (1975), *J. Mol. Biol.*, **94**, 449—460.
70. Potts R. O., Ford N. C., Fournier M. J., (1981), *Biochemistry*, **20**, 1653—1659.
71. Fritzing D. C., Fournier M. J., (1982), *Nucleic Acids Res.*, **10**, 2419—2437.
72. Peattie D. A., Gilbert W., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4679—4682.
73. Lo A. C., Nazar R. N., (1981), *FEBS Lett.*, **131**, 41—44.
74. Wildeman A. G., Nazar R. N., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **121**, 357—363.
75. Peattie D. A., Herr W., (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2273—2277.
76. Lo A. C., Nazar R. N., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 3516—3524.
77. Thiebe R., Zachau H., (1968), *Eur. J. Biochem.*, **5**, 546—555.
78. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J. P., (1980), *FEBS Lett.*, **120**, 12—16.
79. Vlassov V. V., Giege R., Ebel J. P., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **119**, 51—59.
80. Lee B., Richards F. M., (1971), *J. Mol. Biol.*, **55**, 379—400.
81. Lavery R., Pullman A., Pullman B., (1980), *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, **17**, 233—243.
82. Thiyagarajan P., Ponnuswamy P. K., (1979), *Biopolymers*, **18**, 2233—2247.
83. Sigler P. B., (1975), *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 477—527.
84. Rich A., RajBhandary U. L., (1976), *Annu. Rev. Biochem.*, **45**, 805—860.
85. Cole P. E., Yang S. K., Crothers D. M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4358—4368.
86. Reid B. R., Hurd R. E., (1977), *Acc. Chem. Res.*, **10**, 396—402.
87. Bolton P. H., Kearns D. R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 10—19.
88. Labuda D., Haertle T., Augustyniak J., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 293—301.
89. Schimmel R. R., Redfield A. G., (1980), *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **9**, 181—222.

90. Stein A., Crothers D. M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 160—168.
91. Webb P. K., Frêsko J. R., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 387—402.
92. Rordorf B. F., Kearns D. R., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 857—862.
93. Johnston P. D., Redfield A. G., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 3599—3615.
94. Hurd R. E., Reid B. R., (1980), *J. Mol. Biol.*, **142**, 181—193.
95. Englander S. W., Englander J. J., (1965), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 370—378.
96. Clark B. F. C., (1979), w „Nonsense Mutations and tRNA Suppressors”, Wyd. J. E. Cells, 1—46, Academic Press, London.

SŁAWOMIR PIKUŁA ^{*)}, M. GABRIELA SARZAŁA ^{**)}

Asymetria błon biologicznych — rozmieszczenie lipidów i niektórych białek enzymatycznych w płaszczyźnie poprzecznej błony

Asymmetry of Biological Membranes — Localization of Lipids and Some Enzymatic Proteins in the Transversal Plane of Membrane

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Tworzenie asymetrii błon w czasie ich biogenezy**
- III. Lokalizacja lipidów w błonach biologicznych**
 - III-1. Nieenzymatyczne i enzymatyczne znakowanie lipidów a uszkodzenia dwu-molekularnej warstwy lipidowej**
 - III-1.1. Zastosowanie przenikających i nieprzenikających przez błony związków znakujących lipidy**
 - III-1.2. Jodowanie fosfolipidów katalizowane przez laktoperoksydazę oraz znakowanie lipidów trytem w reakcji z borowodorkiem sodu katalizowanej przez oksydazę galaktozylową**
 - III-1.3. Lokalizowanie lipidów w błonie przy użyciu fosfolipaz**
 - III-2. Zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy w badaniach asymetrii błon**
 - III-3. Zastosowanie przeciwciał przeciwko lipidom w badaniach ich asymetrycznego rozmieszczenia w błonach**
- IV. Rozmieszczenie enzymów syntetyzujących i degradujących lipidy w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych**
 - IV-1. Zastosowanie chemicznego i enzymatycznego znakowania białek w badaniach asymetrii błon**
 - IV-2. Zastosowanie różnych proteaz**
 - IV-3. Metody immunologiczne**
 - IV-4. Dostępność centrów aktywnych enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów**
 - IV-4.1. Enzymy syntetyzujące lipidy**
 - IV-4.2. Enzymy biorące udział w degradacji lipidów**
- V. Podsumowanie**

^{*)} mgr, ^{**)} prof. dr hab., Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Zakład Badania Mięśni i Systemów Kurczliwych, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Contents

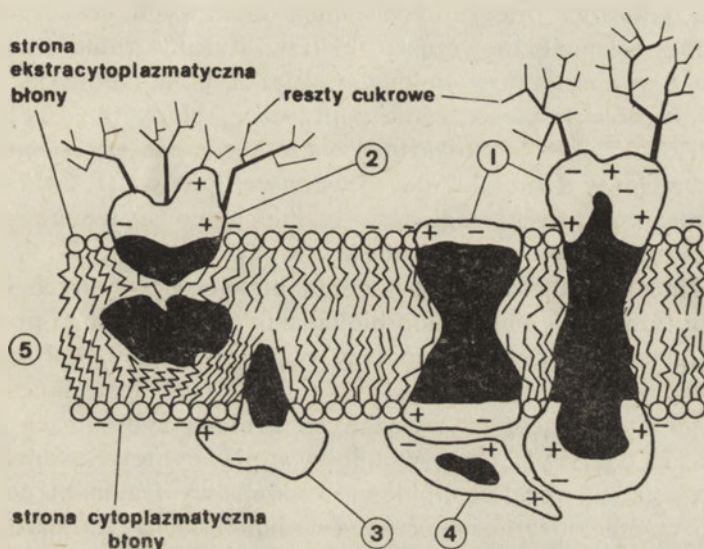
- I. Introduction**
- II. Asymmetric assembly of membrane constituents during membrane biogenesis**
- III. Localization of lipids in biological membranes**
 - III-1. Non-enzymatic and enzymatic lipid labelling and damage of lipid bilayer**
 - III-1.1. The use of penetrating and non-penetrating lipid labelling reagents**
 - III-1.2. Lactoperoxidase catalysed lipid iodination and labelling of lipids with the use of tritium labelled sodium boron hydride and galactose oxidase**
 - III-1.3. Localization of membrane lipids using phospholipases**
 - III-2. Phospholipid exchange proteins in the studies of membrane asymmetry**
 - III-3. The use of antibodies against lipids for assessing of membrane asymmetry**
- IV. Localization of lipid synthetizing and degradating enzymes in the transversal plane of biological membranes**
 - IV-1. Chemical and enzymatic labelling of proteins**
 - IV-2. The use of different proteases**
 - IV-3. Immunological methods**
 - IV-4. Accessibility of enzymes involved in lipid metabolism**
 - IV-4.1. Lipid synthetizing enzymes**
 - IV-4.2. Lipid degradating enzymes**
- V. Concluding remarks**

I. Wstęp

W ostatnich latach zgromadzono szereg danych świadczących o asymetrycznym rozmieszczeniu składników w płaszczyźnie poprzecznej błon plazmatycznych i wewnątrzkomórkowych. Powstaje zatem pytanie, czy asymetria strukturalna wynika z asymetrii funkcjonalnej, czy też może odwrotnie, powoduje ją? Procesy transportu jonów i metabolitów, przenoszenie energii, przekazywanie sygnałów chemicznych oraz zachodzące w błonach reakcje enzymatyczne są ukierunkowane (1, 2). Zależą one przede wszystkim od molekularnej struktury i orientacji składników błon w lateralnej i transwersalnej płaszczyźnie dwumolekularnej warstwy lipidowej. Badania polegające na lokalizowaniu poszczególnych składników błon mają więc istotne znaczenie w poznaniu i wyjaśnieniu szeregu ważnych funkcji błon biologicznych.

Przyjmowany powszechnie płynno-mozaikowy model budowy błon, zaproponowany przez Singera i Nicolsona (3), opierający się na koncepcji dwumolekularnej warstwy lipidowej Gorter'a i Grendla (4), podkreślając dynamiczną strukturę błon, bierze pod uwagę asymetryczne rozmieszczenie składników błon w ich płaszczyźnie poprzecznej. Podstawowymi składnikami błon biologicznych są białka, lipidy i węglowodany (występujące jako glikolipidy lub glikoproteidy). Klasyfikując białka błonowe, ze względu na sposób ich umiejscowienia w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej, wyróżniono białka integralne i powierzchniowe (1—3, 5—8). Białka integralne (oddziaływujące z fosfolipidami) wbudowane są prostopadle do powierzchni dwumolekular-

nej warstwy lipidowej tak, że ich hydrofilowe fragmenty skierowane są do fazy wodnej. W przypadku białek penetrujących przez całą grubość błony (ang. *transmembrane proteins*) hydrofilowe fragmenty ich cząsteczek odnajdziemy na obu powierzchniach błony, podczas gdy fragment hydrofobowy zanurzony jest w fazie lipidowej. Wśród białek integralnych wyróżniamy takie, których hydrofilowy fragment jest eksponowany jedynie na stronę ekstracytoplazmatyczną (tzw. ektobiałka) oraz takie, których hydrofilowy fragment znajduje się jedynie na stronie cytoplazmatycznej (tzw. endobiałka). Białka powierzchniowe, luźno związane z błoną (np. przez jony metali tworzące tzw. mostki), oddziałują elektrostatycznie z zewnętrznymi, hydrofilowymi grupami lipidów i białek integralnych błon.



Ryc. 1. Rozmieszczenie białek w błonach biologicznych: 1 — Białka integralne błony penetrujące przez dwumolekularną warstwę lipidową; hydrofilowe fragmenty cząsteczki białka są eksponowane na obu powierzchniach błony; 2 — Białko integralne błony, którego hydrofilowy fragment jest eksponowany na stronę ekstracytoplazmatyczną; 3 — Białko integralne błony, którego hydrofilowy fragment jest eksponowany na stronę cytoplazmatyczną; 4 — Białko powierzchniowe związane z polarnym rejonem błony; 5 — Białko integralne o charakterze hydrofobowym, całkowicie zanurzone w dwumolekularnej warstwie lipidowej (proteolipid). Pola białe odpowiadają hydrofilowemu fragmentowi cząsteczki białka; Pola czarne odpowiadają hydrofobowemu fragmentowi cząsteczki białka.

Niniejszy artykuł omawia kilka wybranych zagadnień dotyczących asymetrii błon biologicznych ^{*)}, przede wszystkim na przykładzie błon:

^{*)} Szereg informacji na temat asymetrii błon biologicznych można również znaleźć we wcześniejszym artykule opublikowanym w *Postęпах Biochemii*, tom 23, str. 523—539, (1977).

erytrocytów, endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby i sarkoplazmatycznego retikulum z mięśni szybkich. Wobec istniejących rozbieżności na temat rozmieszczenia lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony, zaprezentowano krytyczny przegląd metod najczęściej stosowanych w badaniach asymetrii oraz przedyskutowano sposoby interpretacji otrzymanych wyników. Szczegółowo zajęto się też problemem rozmieszczenia białek enzymatycznych biorących udział w biosyntezie i degradacji lipidów w błonach biologicznych, traktując tę część artykułu jako dyskusję na temat przyczyn istnienia asymetrii lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych.

II. Tworzenie asymetrii błon w czasie ich biogenezy

Dyfuzja lateralna integralnych białek błonowych oraz rotacja tych białek wzdłuż osi podłużnej cząsteczki (tzw. dyfuzja rotacyjna), są uwarunkowane płynnością fazy lipidowej. Białka błon nie mają natomiast możliwości ruchów w płaszczyźnie poprzecznej błony (9—16). Rozmieszczenie białek w błonie jest uwarunkowane przez procesy związane z ich wbudowywaniem w dwumolekularną warstwę lipidową (1, 2, 17—30). Według obecnie przyjętych poglądów białka błonowe wbudowywane są w dwumolekularną warstwę lipidową w dwojaki sposób^{**}). Pierwszy z nich opisano w odniesieniu do szeregu białek sekrecyjnych i enzymatycznych, w tym także białek błon biologicznych. Mechanizm procesu próbuje się tłumaczyć za pomocą hipotezy sygnałów (ang. *signal hypothesis*). Zakłada ona jednoczesność translacji mRNA i syntezy łańcucha polipeptydowego zachodzącej na związanych z błoną rybosomach (*model ko-translacyjny*) oraz wbudowywania syntetyzowanego białka w dwumolekularną warstwę lipidową. N-końcowy fragment polipeptydu przechodzi w czasie syntezy przez dwumolekularną warstwę lipidową w hydrofilowym „tunelu” utworzonym przez błonowe białka integralne. Na N-końcu łańcucha polipeptydowego znajduje się fragment hydrofilowy o ładunku dodatnim (zbudowany przeważnie z reszt lizynowych, argininowych, serynowych, cysteinowych i tyrozynowych), fragment hydrofobowy (zbudowany z około 10 reszt aminokwasów) oraz fragment rozpoznawany przez peptydazę sygnałową (hydroliza następuje przeważnie pomiędzy dwiema resztami alaninowymi). Wymienione 3 fragmenty łańcucha polipeptydowego tworzą tzw. sekwencję sygnałową. Centrum aktywne peptydazy sygnałowej znajduje się na ekstracytoplazmatycznej stronie błony. Po zakończeniu translacji i wbudowaniu białka odcinana jest sekwencja sygnałowa oraz zachodzą inne modyfikacje łańcucha polipeptydowego. W wiązaniu nowosyntetyzowanych białek z błoną ważną

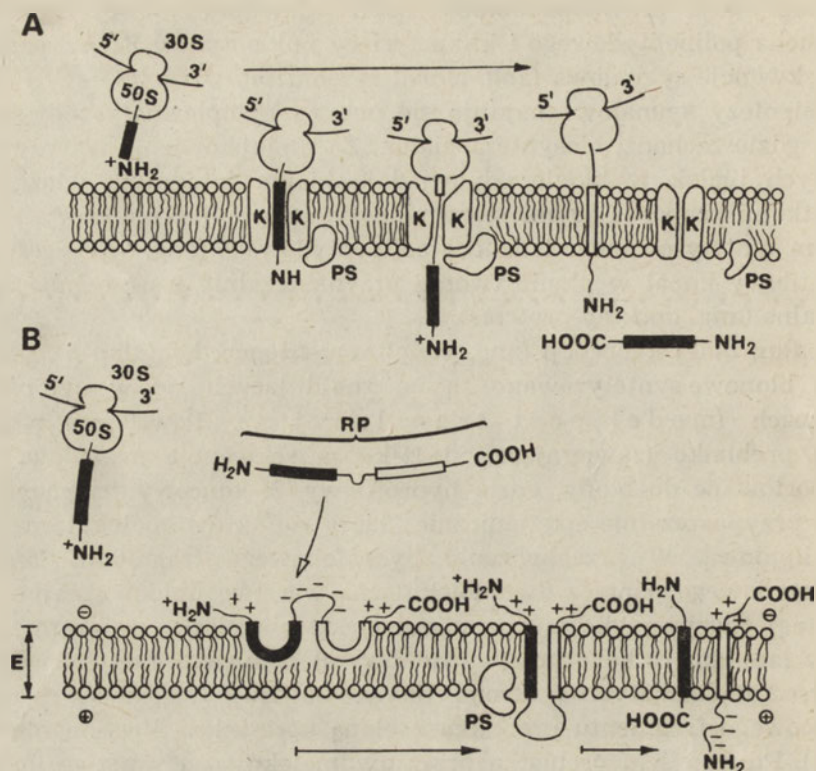
^{**}) Problemowi biosyntezy białek i ich translokacji przez błony poświęcony został artykuł E. M. Rakowicz-Szulczyńskiej opublikowany w 1981 roku w *Postęпах Biochemii* w tomie 27, str. 197—215.

rolę odgrywają prawdopodobnie cząstki nukleoproteinowe, zbudowane z łańcucha polipeptydowego i kilku tysięcy nukleotydów RNA, rozpoznające sekwencję sygnałową (ang. *signal recognizing particles* — SRP). Według hipotezy sygnałów znajdują się one na cytoplazmatycznej stronie błony, gdzie zachodzi biosynteza białek. Za umiejscowienie nowosyntetyzowanych białek w błonie odpowiadają białka integralne wiążące się z cząstkami rozpoznającymi sekwencję sygnałową i N-kończowym fragmentem syntetyzowanego łańcucha polipeptydowego (ang. *SRP-receptors*). Hydrofilowy kanał w błonie tworzą przypuszczalnie jeszcze inne białka integralne (ang. *docking proteins*).

Według innej koncepcji (ang. *membrane-triggered folding hypothesis*) białka błonowe syntetyzowane są na znajdujących się w cytoplazmie polisomach (model post-translacyjny). Powstające rozpuszczalne prebiałko (zawierające od N-końca sekwencję sygnałową) jest transportowane do błony, gdzie hydrofilowy, N-kończowy fragment prebiałka przypuszczalnie spontanicznie „łączy się” z dwumolekularną warstwą lipidową. W przechodzeniu hydrofobowego fragmentu łańcucha polipeptydowego poprzez dwumolekularną warstwę lipidową najprawdopodobniej odgrywa rolę tzw. gradient elektrochemiczny związany z różnicą w ładunku całkowitym (wypadkowym) pomiędzy cytoplazmatyczną i ekstracytoplazmatyczną stroną błony. Sugeruje się, iż w asocjacji N-końcowego fragmentu prebiałka z błoną uczestniczą kwaśne fosfolipidy (31). Po przejściu prebiałka przez dwumolekularną warstwę lipidową peptydaza sygnałowa odcina fragment łańcucha polipeptydowego tworzący sekwencję sygnałową. W opisany sposób syntetyzowane są przypuszczalnie i wbudowywane w dwumolekularną warstwę lipidową niektóre integralne białka błon mitochondrialnych.

Białka integralne i powierzchniowe syntetyzowane są zawsze na stronie cytoplazmatycznej błony. Po wbudowaniu w dwumolekularną warstwę lipidową, kiedy osiągną właściwą orientację i konformację, nie przemieszczają się one w poprzek błony. Tym tłumaczy się utrzymywanie asymetrii białek, których orientacja zostaje ustalona w czasie biogenezy błon. W przypadku białek mówi się potocznie o absolutnej asymetrii, która dotyczy ich rozmieszczenia w płaszczyźnie transwersalnej błony.

Błony powierzchniowe charakteryzują się asymetrycznym rozmieszczeniem fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej (w błonach wewnątrzkomórkowych asymetria fosfolipidów budzi nadal kontrowersje). Asymetria w rozmieszczeniu lipidów w błonach biologicznych polega na różnicach ilościowych (2, 5, 7, 32—39). Synteza lipidów *de novo* w komórkach bakteryjnych i eukariotycznych zachodzi po cytoplazmatycznej stronie błon (40). Nowosyntetyzowane cząsteczki lipidów bardzo szybko przemieszczają się z cytoplazmatycznej warstwy monomolekularnej do ekstracytoplazmatycznej (okres półtrwania cza-



Ryc. 2. Sposoby wbudowywania białek w dwumolekularną warstwę lipidową: A — Hipoteza sygnałów (ang. *the signal hypothesis*) — model ko-translacyjny; B — Hipoteza samotworzenia się błony (ang. *the membrane-triggered folding hypothesis*) — model post-translacyjny; 30S — Lżejsza podjednostka rybosomu; 50S — Cięższa podjednostka rybosomu; K — Białko kanałowe; PS — Peptydaza sygnałowa; E — Gradient elektrochemiczny; RP — rozpuszczalne prebiałko; Hydrofilowy fragment cząsteczki białka oznaczono linią cienką; Hydrofobowy fragment cząsteczki białka oznaczono za pomocą pustego prostokąta; Hydrofobowy fragment sekwencji sygnałowej oznaczono za pomocą wypełnionego prostokąta.

steżki lipidu w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej wynosi kilka minut) (41—48). Proces ten różni się zasadniczo od wymiany lipidów pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi (*flip—flop*). Przypuszcza się, że w transporcie nowosyntetyzowanych lipidów na ekstracytoplazmatyczną stronę dwumolekularnej warstwy lipidowej w czasie biogenezy błon biorą udział białka integralne błony (49—52).

III. Lokalizacja lipidów w błonach biologicznych

W badaniach nad rozmieszczeniem lipidów (i białek) w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych poddaje się analizie: stopień czystości otrzymanych frakcji, ponieważ błony różnych organelli (nawet w tej sa-

mej komórce) różnią się od siebie składem chemicznym; orientację błon (tzn. która powierzchnia błony jest eksponowana na zewnątrz); przepuszczalność błon dla związków znakujących i enzymów hydrolitycznych oraz zmiany przepuszczalności błon w trakcie reakcji znakowania bądź hydrolizy; rodzaj wiązań (modyfikacji) pomiędzy cząsteczką znakowaną w błonie a związkiem znakującym; ruch lipidów pomiędzy dwiema monomolekularnymi warstwami błony.

Interpretacja otrzymanych wyników odnośnie rozmieszczenia składników błon w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej może być obarczona dużym błędem, jeśli nie została przeprowadzona kontrola jednorodności badanej populacji pęcherzyków pod względem orientacji błony. W wyniku homogenizacji tkanki, błony plazmatyczne i wewnątrzkomórkowe ulegają fragmentacji tworząc niejednorodną populację zamkniętych pęcherzyków o różnej wielkości i różnej orientacji błony: tzw. pęcherzyki prawidłowo zorientowane (ang. *right-side-out*) oraz odwrotnie zorientowane (ang. *inside-out*). Po rozdzieleniu prawidłowo i odwrotnie zorientowanych populacji pęcherzyków (obie powierzchnie błony są dostępne) w badaniach rozmieszczenia składników w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej nie jest konieczne stosowanie metod zaburzających strukturę błony (53—58).

Szereg metod stosowanych w badaniach rozmieszczenia składników na obu powierzchniach błon biologicznych opiera się na ich chemicznej modyfikacji, a następnie określeniu miejsca i pomiarze stopnia tej modyfikacji. Związki znakujące składniki błon nie powinny w kontrolowanych warunkach przenikać przez dwumolekularną warstwę lipidową. W przypadku zastosowania w tego typu badaniach niskocząsteczkowych związków modyfikujących, np. znaczników grup tiolowych i aminowych lipidów (i białek), sond fluorescencyjnych, itp., kontrola ich przenikania przez błonę jest warunkiem nieodzownym.

Jednym z ważnych czynników, które należy brać pod uwagę interpretując wyniki dotyczące rozmieszczenia składników błon, jest rozpatrzenie możliwości, czy znakowanie składników błon biologicznych nie wpływa na przepuszczalność badanego systemu błonowego wobec związku znakującego. O błędnej interpretacji wyników decyduje również fakt, iż składniki błony biologicznej, znajdujące się na jej stronie wewnętrznej, mogą stać się dostępne dla związku znakującego lub innego czynnika modyfikującego w wyniku przemieszczenia w płaszczyźnie transwersalnej błony. W przypadku białek wykazano, że ruch w płaszczyźnie poprzecznej błony jest niemożliwy, natomiast lipidy, jak wspomniano, stosunkowo łatwo przemieszczają się na zasadzie wymiany (*flip-flop*) pomiędzy obiema warstwami monomolekularnymi. W błonie erytrocytów zjawisko to w przypadku fosfatydylocholin jest wolne (czas półtrwania w monowarstwie wynosi 4—7 godzin), zaś w mikrosomach izolowanych z komórek wątroby jest o wiele szybsze i wynosi najwyżej kilkanaście minut (39, 41, 42, 45,

47, 49, 59, 60). Przemieszczanie lipidów może ulegać zwielokrotnieniu pod wpływem zastosowanego związku znakującego lub hydrolizy przy użyciu fosfolipaz (39). Interpretując wyniki dotyczące rozmieszczenia lipidów w błonach biologicznych konieczne jest uwzględnienie także przeszkód sterycznych wywołanych np. przez zmianę lokalnego ładunku powierzchniowego w czasie reakcji związku znakującego z cząsteczkami lipidów. Zastosowanie niezależnie kilku metod lokalizowania składników w płaszczynie poprzecznej błon jest warunkiem sine qua non otrzymania wyników zbliżonych do sytuacji *in vivo*.

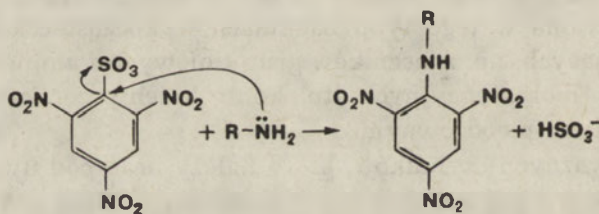
III-1. Nieenzymatyczne i enzymatyczne znakowanie lipidów a uszkodzenia dwumolekularnej warstwy lipidowej

III-1.1. Zastosowanie przenikających i nieprzenikających przez błony związków znakujących lipidy

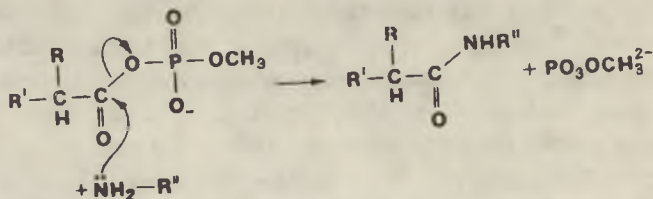
W badaniach rozmieszczenia lipidów w płaszczynie poprzecznej błony często stosowane są związki chemiczne zawierające chromofor lub znakowane izotopowo. Powszechnie w tego typu badaniach używane są związki reagujące z grupami aminowymi lipidów (i białek).

Strukturę związków znakujących lipidy i białka w błonach biologicznych oraz charakterystyczne reakcje podano na Ryc. 3.

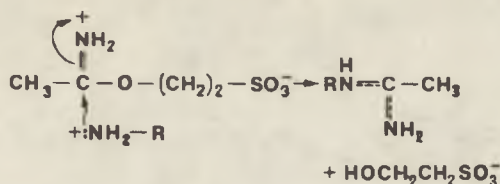
Ryc. 3. Czynniki stosowane do znakowania lipidów i białek w błonach biologicznych:



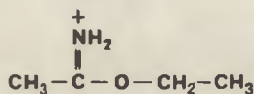
Wzór I — Kwas trójnitrobenzenosulfonowy (TNBS) wiąże się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi lipidów i białek. Przenikanie TNBS-u przez błonę jest zależne od jego stężenia i od temperatury;



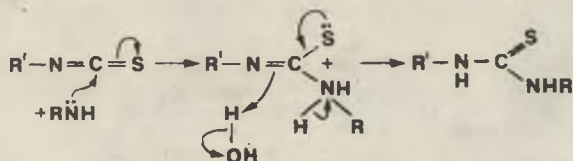
Wzór II — Formylometionyl(sulfonyl)metylofosforan (FMMP) wiąże się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi białek i lipidów. Związek nie przenika przez błonę;



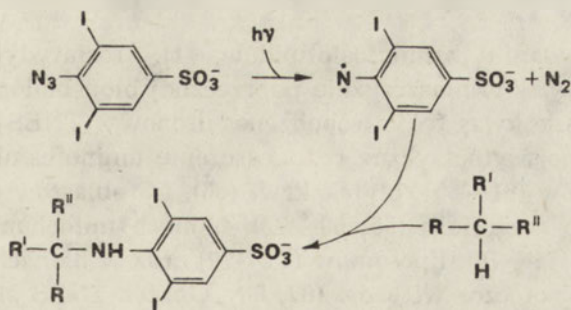
Wzór III — Izotionyloacetoimid (IAI) wiąże się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi lipidów i białek. Związek nie przenika przez błonę;



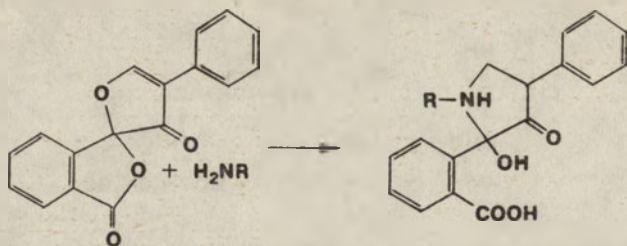
Wzór IV — Etyloacetoimid (EAI) wiąże się z pierwszorzędowymi grupami aminowymi lipidów i białek. Związek przenika przez błonę;



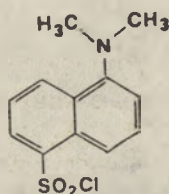
Wzór V — 4-acetoimido-4'-izotiociano-2,2'-stillbenodwusulfonian (SITS) lub 4,4'-dwiizotiociano-2,2'-stillbenodwusulfonian (DIDS) wiążą się z grupami aminowymi i tiolowymi oraz resztami tyrozylowymi, histydylowymi i guanidylowymi białek. Oba związki nie przenikają przez błonę;



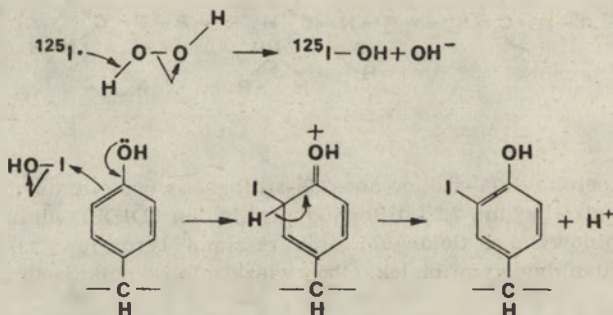
Wzór VI — 3,5-dwujodo-4-azydobenzenosulfonian (DIABS) jest związkiem niespecyficznym. Pod wpływem UV tworzy nitren, który reaguje z grupami -CH₃;



Wzór VII — Fluoreskamina reaguje z grupami aminowymi lipidów i białek. Po reakcji z grupą aminową fluoryzuje. Związek przenika przez błonę;



Wzór VIII — Chlorek dansylu jest związkiem rozpuszczalnym w lipidach. Fluoryzuje w środowisku hydrofobowym. Przenika przez błonę;



Wzór IX — Jodowanie reszt tyrozylowych białek katalizowane przez peroksydazę.

W lokalizowaniu aminofosfolipidów, tj. fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych wielokrotnie stosowano kwas trójnitrobenzenosulfonowy (TNBS). Przy pomocy TNBS wykazano asymetryczne rozmieszczenie aminofosfolipidów w błonach erytrocytów (61—65), płytek krwi (66), fibroblastów (67, 68), sarkoplazmatycznego retikulum (55, 69—73), błonach mitochondrialnych (36), synaptosomów (74—76), liposomów (77—79) oraz w błonach bakteryjnych (7, 63, 80—86) i otoczce wirusów (87, 88). Oprócz TNBS stosowano także inne związki reagujące z grupami aminowymi lipidów (i białek), jak 1-fluoro-2,4-dwunitrobenzen (FDNB) i 1,5-dwufluoro-2,4-dwunitrobenzen (DTNB). Jednakże TNBS ze względu na ujemnie naładowaną grupę sulfonową uznawany jest (przynajmniej w pewnym zakresie temperatur i stę-

zeń) za nieprzenikający przez hydrofobową część błony, podczas gdy FDNB i DTNB mogą przenikać przez dwumolekularną warstwę lipidową (63, 64, 72). W szeregu przypadków przenikanie to zależy od temperatury, w której zachodzi reakcja znakowania, a także od stężenia użytego związku. Zauważono na przykład, iż TNBS nie przenika przez błonę *Bacillus megaterium* w 0°C, podczas gdy w 15°C powoli zaczyna przenikać przez dwumolekularną warstwę lipidową (81) wiążąc się z lipidami i białkami wewnętrznej warstwy monomolekularnej. W wielu pracach wskazuje się na charakterystyczne dla różnych błon stężenie graniczne, poniżej którego TNBS jeszcze nie przenika przez błonę oraz zależność od temperatury reakcji (7, 55, 61—88). Niektórzy autorzy uważają, że TNBS może być transportowany na cytoplazmatyczną stronę błony erythrocytu przez białko przenoszące aniony (białko pasma 3) (89, 90). Związek ten może również reagować z wodą w trakcie reakcji znakowania, tworząc wówczas kwas pikrynowy, który powoduje dodatkową kontaminację preparatu błon, a tym samym obniża efektywność stosowanej metody (37, 91).

Aminofosfolipidy lokalizowano w płaszczyźnie poprzecznej błon erythrocytów także przy pomocy 4-acetoimido-4'-izotiocjanostillbeno-2,2'-dwusulfonianu (SITS) (92) i formylometionyl(sulfono)metylofosforanu (FMMP) (93, 94). Oba wymienione związki nie przenikają przez błony erythrocytów. Wykazano, że aminofosfolipidy w błonie erythrocytów rozmieszczone są asymetrycznie i w większym procencie występują w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej.

Większość autorów stwierdza zgodnie, iż aminofosfolipidy są rozmieszczone asymetrycznie w płaszczyźnie poprzecznej błon powierzchniowych, tzn., że występują one w przeważającej ilości w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błon bakteryjnych (np. *Bacillus megaterium*) (81) i błon plazmatycznych: erythrocytów (np. szczura i człowieka) (61—65), płytek krwi (np. świni) (66), komórek wątrobowych (np. szczura) (95). W otocze wirusa grypy zaobserwowano równomierne rozmieszczenie aminofosfolipidów (96), podczas gdy w otocze wirusa VSV fosfatydyloetanoloamina występuje w większości w wewnętrznej warstwie monomolekularnej (87, 97).

95% lipidów otoczki bakteriofaga PM₂ stanowią fosfatydyloetanoloamina i fosfatydyloglicerol. Rozmieszczenie fosfolipidów w otocze tego bakteriofaga zbadano przy użyciu dwuazosulfonianu (98). Wykazano, że fosfatydyloglicerol jest rozmieszczony symetrycznie, zaś fosfatydyloetanoloamina występuje w wewnętrznej warstwie monomolekularnej otoczki bakteriofaga PM₂.

Dane dotyczące rozmieszczenia fosfatydyloetanoloaminy w płaszczyźnie poprzecznej błon wewnątrzkomórkowych są sprzeczne. Na przykład, w przypadku błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby szczura przy użyciu TNBS-u stwierdzono, że fosfatydyloetanoloamina występuje w większym procencie w cytoplazmatycznej (35, 36, 99—101), bądź

w przeważającej liczbie w ekstracytoplazmatycznej (102—104) warstwie monomolekularnej. Inni badacze wskazują natomiast na równomierne rozmieszczenie fosfatydyloetanolaminy w obu warstwach monomolekularnych błon endoplazmatycznego retikulum (105, 106). W jaki sposób można wytłumaczyć tak duże rozbieżności otrzymywanych wyników, skoro w każdym przypadku badano system błon pochodzących z tego samego organu, przeprowadzano kontrolę integralności błon w czasie reakcji i uwzględniano orientację błon otrzymanej populacji pęcherzyków endoplazmatycznego retikulum?! Najprawdopodobniej wiąże się to z szybkim metabolizmem lipidów (np. synteza „na eksport”), powodującym, iż w błonach endoplazmatycznego retikulum, w zależności od ich stanu metabolicznego, dochodzi prawdopodobnie do powstawania innych niż dwumolekularna warstwa konfiguracji lipidowych (np. odwrotne micelle, struktury heksagonalne, romboidalne, kostkowe itp. (2, 7, 32, 34—39, 48, 95, 99—127). Wpływa to niewątpliwie na interpretację wyników dotyczących rozmieszczenia aminofosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon endoplazmatycznego retikulum. Większość autorów zgadza się, iż w błonach sarkoplazmatycznego retikulum (odpowiadających funkcjonalnie systemowi błon endoplazmatycznego retikulum komórek mięśniowych), mniej dynamicznych pod względem metabolizmu lipidów niż błony endoplazmatycznego retikulum, fosfatydyloetanolamina występuje w przeważającej ilości w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej (55, 69, 70, 72). W błonie pęcherzyków sarkoplazmatycznego retikulum, których orientację określano na podstawie zdolności do akumulacji jonów wapnia, przy użyciu TNBS wykazano jednak, że w pęcherzykach szczególnie aktywnych w transporcie jonów wapnia (a więc prawidłowo zorientowanych — strona cytoplazmatyczna błony znajduje się na zewnątrz) fosfatydyloetanolamina jest rozmieszczona symetrycznie (73). Kontrowersyjne dane uzyskano również odnośnie rozmieszczenia fosfatydyloseryny (55, 69—72). Przy użyciu dwuazosulfonianu i fluoreskaminy sprzężonej z cykloheptaamylową stwierdzono, iż fosfatydyloseryna znajduje się w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej (70), co nie zgadza się z wynikami uzyskanymi przez innych autorów (55, 69). Trudności w badaniach rozmieszczenia fosfatydyloseryny mogą w tym przypadku wynikać z faktu, iż fosfolipid ten występuje w bardzo małych ilościach, stanowi bowiem 3—5% całkowitej ilości fosfolipidów w błonach sarkoplazmatycznego retikulum (54, 55).

Aminofosfolipidy w przeważającej ilości występują w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błon aparatu Golgi'ego z komórek wątroby szczura (36). W wewnętrznej błonie mitochondriów z komórek wątroby szczura (35) fosfatydyloetanolamina znajduje się w warstwie monomolekularnej skierowanej do przestrzeni międzybłonowej (odpowiadającej cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej organelli komórkowych ograniczonych pojedynczą błoną). Inni autorzy stwierdzili jednak, iż w we-

wewnętrznej błonie mitochondrialnej mitochondriów z komórek wątroby szczura (128) i serca wołu (129) fosfatydyloetanoloamina znajduje się w przeważającej ilości w warstwie monomolekularnej stykającej się z mitochondrialną matrix.

W przypadku metod polegających na chemicznym znakowaniu lipidów należy pamiętać, iż zastosowanie kilku metod badawczych, niezależnych od siebie, pozwala na otrzymanie najmniej kontrowersyjnych danych.

III-1.2. Jodowanie fosfolipidów katalizowane przez laktoperoksydazę oraz znakowanie lipidów trytem w reakcji z borowodorkiem sodu katalizowanej przez oksydazę galaktozylową

W obecności laktoperoksydazy, nadtlenu wodoru i wolnego jodu reakcji jodowania ulegają jedynie lipidy znajdujące się w zewnętrznej warstwie monomolekularnej błon biologicznych o niezniszczonej strukturze dwumolekularnej warstwy lipidowej. Jodowanie katalizowane przez laktoperoksydazę stosowano początkowo jedynie do badania lokalizacji białek. Później wykazano także, iż jodowaniu ulegają również lipidy obojętne oraz fosfolipidy (130—133). W obecności laktoperoksydazy 20—30% lipidów i białek w błonie biologicznej ulega znakowaniu, podczas gdy w nieobecności enzymu tylko 2% (134).

Metodę jodowania katalizowanego przez laktoperoksydazę stosowano w badaniach rozmieszczenia fosfatydylocholiny, sfingomieliny, fosfatydyloetanoloaminy, fosfatydyloinozytolu, glikolipidów i cholesterolu w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych. W błonie *Acholeplasma laidlawii* (która nie zawiera aminofosfolipidów) stwierdzono przy użyciu tej metody, iż glikolipidy znajdują się w zewnętrznej warstwie monomolekularnej (135).

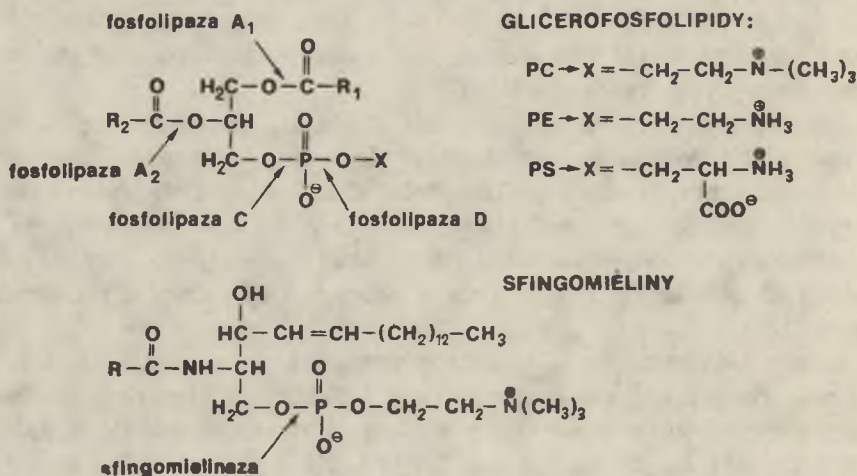
Zaletą jodowania katalizowanego przez laktoperoksydazę jest fakt, iż w czasie reakcji nie uwalnia się wolny I_2 , który mógłby dyfundować poprzez dwumolekularną warstwę lipidową i w ten sposób kontaminować cząsteczki lipidów normalnie niedostępne. Niedogodnością tej metody zaś jest utrudniona analiza ilościowa otrzymanych wyników. Dotąd np. nie wiadomo, które z wiązań w cząsteczce lipidu są wrażliwe na jodowanie: wiązanie podwójne w łańcuchu węglowodorowym, czy grupa karbonylowa w pozycji α (135). Dlatego też w badaniach rozmieszczenia fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych jodowanie przeważnie stosowane jest łącznie z innymi metodami lokalizowania lipidów (trawienie fosfolipazami, związki znakujące, itp.).

Rozmieszczenie galaktozylolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych badano przy użyciu trytowania lipidów katalizowanego przez oksydazę galaktozylową w obecności borowodoru sodu (NaB^3H_4). Katalizujący oksydację lipidów do aldehydów enzym został wyizolowany z *Dactylium dendroides* (136). Powstający w pierwszym etapie reakcji aldehyd jest redukowany przy użyciu NaB^3H_4 do odpowiedniego alkoholu

(136—139). Opisanemu wyznakowaniu ulegają jedynie lipidy z zewnętrznej warstwy monomolekularnej w pęcherzykach lub całych komórkach o nienaruszonej strukturze błony, ponieważ enzym nie przenika przez dwumolekularną warstwę lipidową. Stosując tę metodę wykazano, że w błonie erytrocytów grup krwi A i B glikosfingolipidy (oligoheksozyloceramidy i gangliozydy) występują w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błony (139).

III-1.3. Lokalizowanie lipidów w błonie przy użyciu fosfolipaz

Enzymatyczna degradacja lipidów była, szczególnie w latach 1973—1979, jedną z szeroko stosowanych metod w badaniach rozmieszczenia fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony. W tego typu badaniach używano najczęściej fosfolipazy: A₂, C i D oraz sfingomielinazę (140), których działanie pokazano na Ryc. 4.



Ryc. 4. Miejsce działania fosfolipaz: PC — fosfatydylocholina; PE — fosfatydyloetanolamina; PS — fosfatydyloseryna; Strzałki wskazują wiązanie w cząsteczce fosfolipidu hydrolizowane w wyniku działania fosfolipazy.

W badaniach symetrii błon przy użyciu fosfolipaz należy uwzględnić: specyficzność substratową użytego enzymu (35, 102, 106, 129, 141—151), napięcie powierzchniowe i wypadkowy ładunek powierzchniowy badanej błony (152—159); możliwość ochronnego działania białek błonowych (160, 161) oraz efekt lityczny powstających produktów degradacji (np. lizofosfolipidów i kwasów tłuszczowych) (35, 84, 150, 162—168).

Jednym z powszechnie badanych obiektów pod względem asymetrii jest błona erytrocytów. Wykazano m.in., że trawienie błony erytrocytów fosfolipazą A₂ z jadu *Naja naja* powoduje degradację 70% fosfatydylo-

cholino, przy czym nie ulegają trawieniu fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna (168). Sfingomielinaza ze *Staphylococcus aureus* powoduje zaś degradację 80% sfingomieliny. Jeśli błony erytrocytów poddać lizie, a następnie trawieniu fosfolipazą A₂, wszystkie fosfolipidy ulegną degradacji do lizozwiązków (168). Dane te świadczą, iż fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna występują w większości w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej, podczas gdy fosfatydylocholina i sfingomielina zlokalizowane są w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błony. Podobne wyniki otrzymano stosując związki znakujące grupy aminowe w badaniach nad rozmieszczeniem lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony erytrocytów (61—65, 169). Błony plazmatyczne komórek innych tkanek ssaków charakteryzują się podobnym jak w błonie erytrocytów, asymetrycznym rozmieszczeniem lipidów w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej (66, 74—76, 95, 169—177).

Prace dotyczące rozmieszczenia lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon wewnątrzkomórkowych są bardzo liczne, jednak rozbieżności pomiędzy wynikami otrzymanymi przez różnych autorów są duże. W przypadku błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby szczura stwierdzono (99), iż fosfolipaza A trawi w nienaruszonych pęcherzykach: 84—92% fosfatydyloetanolaminy, 82—97% fosfatydyloseryny, 39—46% fosfatydylocholino, 16—23% fosfatydyloinozytolu i 13—15% sfingomieliny. Na tym samym materiale biologicznym inni autorzy stwierdzili przy użyciu TNBS i fosfolipaz, iż fosfatydylocholina i sfingomielina w większości zlokalizowane są w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błony, podczas gdy fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol znajdują się w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej (64, 102, 104). W błonach sarkoplazmatycznego retikulum z komórek mięśni szkieletowych badania przy użyciu fosfolipaz wskazują na obecność fosfatydyloetanolaminy i fosfatydyloseryny w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej, a fosfatydyloinozytolu i sfingomieliny w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej, zaś fosfatydylocholino w prawie równych ilościach w obu warstwach monomolekularnych błony (55, 72, 178). W wewnętrznej błonie mitochondrialnej fosfatydyloetanolamina i fosfatydyloseryna występują w większości w warstwie monomolekularnej skierowanej do przestrzeni międzymbłonowej, podczas gdy fosfatydyloglicerol występuje w warstwie przeciwnej (35).

III-2. Zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy w badaniach asymetrii błon

Jedną z metod dających najlepsze wyniki (najmniej artefaktów) w badaniach rozmieszczenia lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych jest zastosowanie białek przenoszących fosfolipidy, gdyż białka te

nie przenikają przez dwumolekularną warstwę lipidową. Spontaniczna wymiana fosfolipidów pomiędzy różnymi systemami błonowymi albo między błonami a lipoproteidami lub liposomami jest procesem bardzo powolnym (z wyjątkiem wymiany cholesterolu) (179—183). Wymianę fosfolipidów pomiędzy błonami stymulują białka znajdujące się w cytoplazmie, zdolne do wiązania i transportu fosfolipidów. Można wyróżnić trzy rodzaje białek przenoszących fosfolipidy: wysokocząsteczkowe białka specyficzne, względnie specyficzne białka przenoszące fosfatydyloinozytole i fosfatydylocholino oraz niskocząsteczkowe białka niespecyficzne^{*)}. Białka o dużej masie cząsteczkowej głównie transportują fosfolipidy na drodze wymiany między błonami (184). Białka o małej masie cząsteczkowej uczestniczą raczej w transporcie netto (185). Wykazano również zależność transportu fosfolipidów katalizowanego przez białka przenoszące od składu lipidowego i wypadkowego ładunku błon (184, 186).

Rozmieszczenie fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony przy zastosowaniu białek przenoszących fosfolipidy badano w błonach: erytrocytów o nienaruszonej strukturze, cieni erytrocytów, różnych organelli komórek eukariotycznych, bakterii i otoczce wirusów (43, 45, 182, 183, 187—203). Zastosowanie tej metody jest ograniczone i wymaga, aby ruch cząsteczek fosfolipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony (*flip-flop*) był dłuższy niż czas wymiany fosfolipidów katalizowanej przez białko przenoszące (180, 181, 192, 200—203). Tylko w takim przypadku, gdy różnica jest duża mamy pewność, że wymieniane fosfolipidy pochodzą z zewnętrznej warstwy monomolekularnej błony donora. Wspomniany warunek spełnia błona erytrocytów, zaś błony o szybkim metabolizmie fosfolipidów, w których ruch cząsteczek fosfolipidów jest stosunkowo szybki, nie są dobrym obiektem badania asymetrii przy użyciu białek przenoszących fosfolipidy (48, 182).

Badania nad rozmieszczeniem fosfatydylocholino w płaszczyźnie poprzecznej błony erytrocytów ludzkich (197) lub szczura (43, 181, 197, 198) wykazały, że 60—75% całej frakcji tego fosfolipidu jest szybko wymieniane. W erytrocytach o orientacji *inside-out* szybko wymieniane jest 37% całej frakcji fosfatydylocholino (181, 199). Wyniki te świadczą o asymetrycznym rozmieszczeniu fosfatydylocholino w błonie erytrocytów i wskazują, że fosfolipid ten znajduje się w większym procencie w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej.

Przy użyciu białka przenoszącego specyficznie fosfatydylocholinę (białko wyizolowano z wątroby wołu) wykazano, iż fosfatydylocholina w większości znajduje się w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby szczura (45).

^{*)} Właściwościom białek przenoszących fosfolipidy poświęcone zostały dwa artykuły przeglądowe J. Zborowskiego opublikowane w *Postęпах Biochemii* w tomie 23, str. 541—547 (1977 r.) i w tomie 29, str. 101—109 (1983 r.).

III-3. Zastosowanie przeciwciał przeciwko lipidom w badaniach ich asymetrycznego rozmieszczenia w błonach

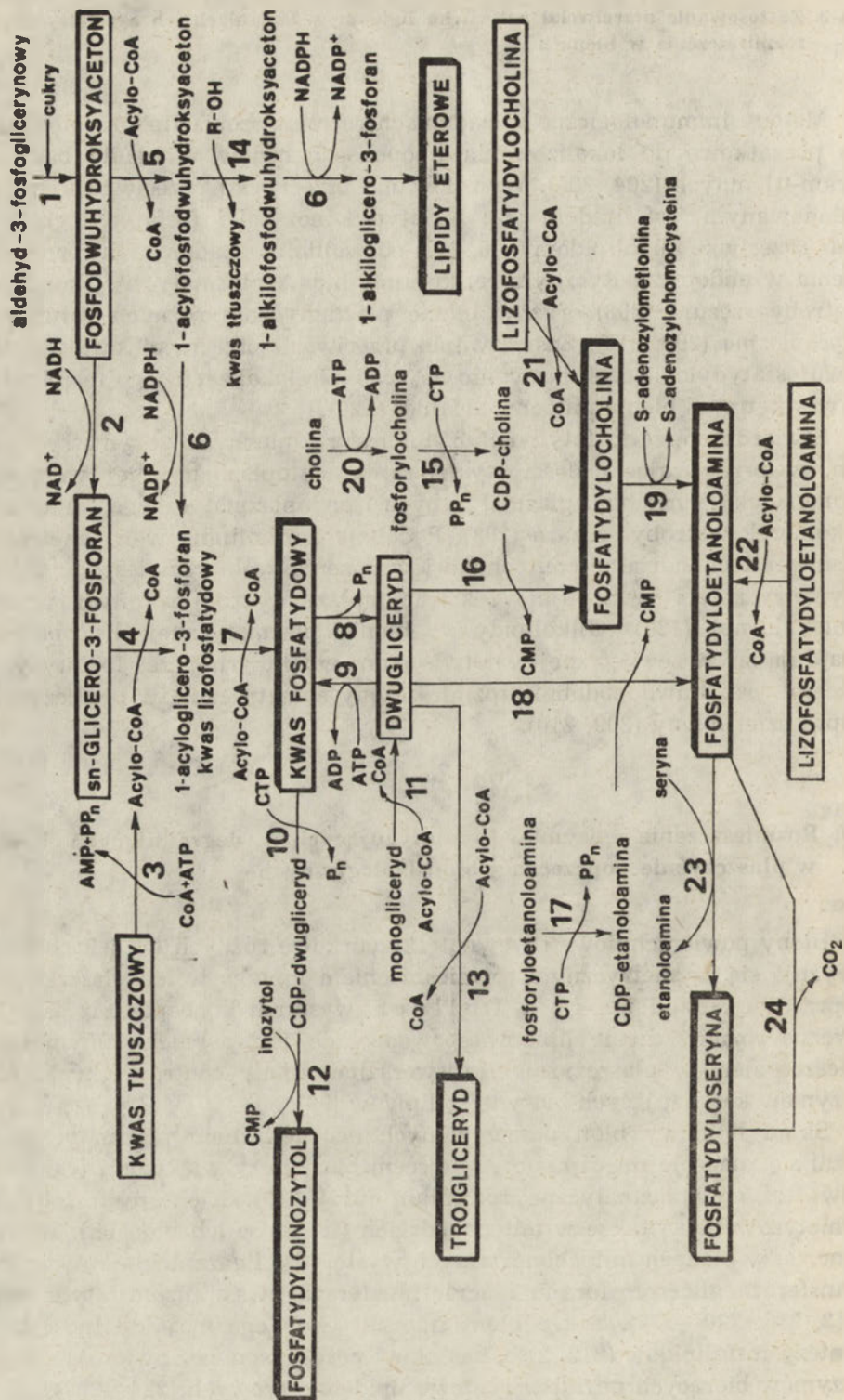
Metody immunologiczne w badaniach rozmieszczenia lipidów stosowano początkowo do lokalizowania lipopolisacharydów w błonie bakterii Gram-ujemnych (204, 205). Wyizolowanie przeciwciał przeciwko ujemnie naładowanym fosfolipidom jak: fosfatydyloinozytol i fosfatydyloglicerol oraz przeciwko glikolipidom (206, 207) pozwoliło na zbadanie ich rozmieszczenia w endoplazmatycznym retikulum i błonie plazmatycznej komórek wątroby szczura (208) oraz w błonie plazmatycznej różnych gatunków *Mycoplasma* (209, 210). Zastosowanie przeciwciał przeciwko kardiolipinie (dwufosfatydyloglicerol) pozwoliło na zbadanie lokalizacji tego fosfolipidu w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (129).

Stwierdzono, że fosfatydyloinozytol jest rozmieszczony asymetrycznie, tzn. w przeważającej ilości występuje w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błon plazmatycznych i endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby szczura (208). Podobnie kardiolipina w wewnętrznej błonie mitochondrialnej mitochondriów z serca wołu rozmieszczona jest asymetrycznie i występuje w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej (129). Glikolipidy w błonie plazmatycznej *Mycoplasma* znajdują się w zewnętrznej warstwie monomolekularnej, zaś fosfatydyloglicerol jest prawdopodobnie rozmieszczony symetrycznie w płaszczyźnie poprzecznej błony (209, 210).

IV. Rozmieszczenie enzymów syntetyzujących i degradujących lipidy w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych

Błony powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe różnych tkanek charakteryzują się asymetrycznym rozmieszczeniem lipidów w ich płaszczyźnie poprzecznej. De Pierre i Dallner wysunęli koncepcję, iż asymetryczne rozmieszczenie lipidów spowodowane jest asymetrycznym rozmieszczeniem w płaszczyźnie transversalnej błony centrów aktywnych enzymów katalizujących biosyntezę lipidów (99).

Skład lipidowy błon poszczególnych organelli błon plazmatycznych różni się znacznie między sobą. Miejscem biosyntezy większości fosfolipidów jest endoplazmatyczne retikulum (211—219). Niektóre fosfolipidy syntetyzowane są także w mitochondriach (ściślej w ich błonach). Wykazano, że w błonach mitochondrialnych występują: ligaza acyloCoA, acylotransferaza glicerofosforanu i acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego (212, 213, 220—223). Także błony aparatu Golgi'ego mają zdolność biosyntezy fosfolipidów (212, 219), zaś błony peroksysomów zawierają szereg enzymów biorących udział w syntezie lipidów eterowych (224—227).



←
Ryc. 5. Główne drogi biosyntezy lipidów w błonach biologicznych: 1 — izomeraza fosfotriozyowa; 2 — dehydrogenaza glicerolofosforanowa (EC 1.1.1.8); 3 — ligaza acylo-CoA (EC 6.2.1.3); 4 — acylotransferaza glicerolofosforanowa (EC 2.3.1.15); 5 — acylotransferaza fosfodwuhydroksyacetonu (EC 2.3.1.42); 6 — oksydoreduktaza acylo-(alkilo)fosfodwuhydroksyacetonu (EC 1.1.1.101); 7 — acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego (EC 2.3.1.—); 8 — kinaza dwuglicerydowa (EC 2.7.1.—); 9 — fosfataza kwasu fosfatydowego (EC 3.1.3.4); 10 — cytydylilotransferaza glicerolofosforanowa (syntaza CDP-dwuglicerydu) (EC 2.7.7.41); 11 — acylotransferaza monoglicerydowa (EC 2.3.1.22); 12 — fosfatydylotransferaza inozytolowa (EC 2.7.8.11); 13 — acylotransferaza dwuglicerydu (EC 2.3.1.20); 14 — syntaza alkilofosfodwuhydroksyacetonu; 15 — cytydylilotransferaza fosforylocholiny (EC 2.7.7.15); 16 — cholinofosfotransferaza (EC 2.7.8.2); 17 — cytydylilotransferaza fosforyloetanoloaminy (EC 2.7.7.14); 18 — etanoloaminofosfotransferaza (EC 2.7.8.1); 19 — metylotransferazy I i II (EC 2.1.1.17); 20 — kinaza cholinowa (EC 2.7.1.32); 21 — acylotransferaza lizofosfatydylocholiny (EC 2.3.1.23); 22 — acylotransferaza lizofosfatydyloetanoloaminy; 23 — enzym katalizujący reakcję wymiany seryny na etanoloaminę fosfatydyloetanoloaminy; 24 — dekarboksylaza fosfatydyloseryny.

Na rycinie 5 pokazano schematycznie główne drogi biosyntezy lipidów w błonach biologicznych. W zależności od typu tkanki można mówić o przewadze jednego lub kilku szlaków syntezy lipidów nad innymi; często także nie obserwuje się któregoś z nich w niektórych tkankach.

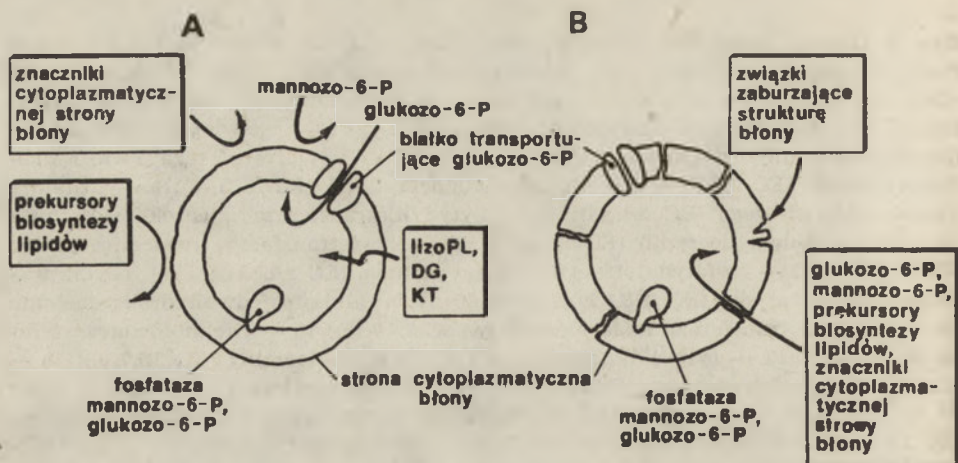
Szereg prekursorów biosyntezy lipidów, takich na przykład jak: glicerofosforan, CDP-cholina, CDP-etanoloamina, estry koenzymu A i nukleotydy jest syntetyzowanych przez enzymy zlokalizowane we frakcji cytoplazmatycznej (40).

Wykazano także, że ATP, CMP, CDP-cholina, CDP-etanoloamina, glicerofosforan, acylo-CoA (228—235) oraz NADPH (236) nie przenikają przez błony endoplazmatycznego retikulum z wątroby szczura, a zatem są dostępne jedynie od strony cytoplazmatycznej błony. W związku z powyższym należy więc przypuszczać, iż synteza lipidów powinna zachodzić na stronie cytoplazmatycznej błon biologicznych.

Dane na temat lokalizacji białek enzymatycznych związanych z metabolizmem lipidów są najpełniejsze w przypadku błon endoplazmatycznego retikulum, izolowanych z komórek wątroby (40, 56, 59, 188, 229, 230, 237—246). W wyniku homogenizacji tkanki, błony te ulegają fragmentacji i zamykają się w postaci pęcherzyków. W otrzymanej w ten sposób frakcji mikrosomalnej orientację białek w płaszczyźnie poprzecznej błony określano na podstawie następujących kryteriów:

— centra aktywne enzymów, których aktywność jest hamowana w wyniku kontrolowanej proteolizy pęcherzyków w błonie nienaruszonej, są prawdopodobnie zlokalizowane na cytoplazmatycznej stronie błony;

— centra aktywne enzymów, których aktywność ulega zahamowaniu w czasie proteolizy pęcherzyków, dopiero po zniszczeniu integralności błony, są przypuszczalnie zlokalizowane na ekstracytoplazmatycznej (luminalnej, wewnętrznej) stronie błony.



Ryc. 6. Lokalizacja miejsca biosyntezy i degradacji lipidów w błonach endoplazmatycznego retikulum: A — Dostępność substratów biosyntezy lipidów oraz różnych związków modyfikujących strukturę błony w zamkniętym, prawidłowo zorientowanym pęcherzyku mikrosomalnym. Fosfataza mannozo-6-fosforanu (glukozo-6-fosforanu) jest enzymem, którego centrum aktywne znajduje się po ekstracytoplazmatycznej stronie błony. Mannozo-6-fosforan nie przenika przez błonę. Glukozo-6-fosforan jest transportowany przy udziale specyficznego białka transportującego. Badanie aktywności fosfatazy mannozo-6-fosforanu stanowi kontrolę integralności i orientacji pęcherzyków endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby.

Znaczniki cytoplazmatycznej strony błony: enzymy hydrolityczne, przeciwciała, niektóre związki znakujące białka i lipidy, inhibitory biosyntezy związane np. z dekstranem. lizoPL — lizofosfolipidy, DG — dwuglicerydy, KT — kwasy tłuszczowe. Prekursory biosyntezy lipidów: NADPH, ATP, CMP, CDP-cholina, CDP-etanolamina, palmitylo-CoA.

B — Dostępność składników błonowych w tzw. pęcherzykach ciekących. Zastosowanie szeregu związków zaburzających strukturę błony pozwala na zbadanie rozmieszczenia białek i lipidów znajdujących się po ekstracytoplazmatycznej stronie błony; na przykład aktywność fosfatazy mannozo-6-fosforanu ulega zahamowaniu w wyniku proteolizy błon pęcherzyków ciekących.

Związki zaburzające strukturę błony: detergenty, EDTA lub inne związki chelatujące jony Me^{2+} , roztwory soli, np. KCl.

W badaniach asymetrii istotne jest więc stwierdzenie w jaki sposób zorientowane są otrzymane z endoplazmatycznego retikulum pęcherzyki i czy badana frakcja jest pod tym względem jednorodna. Przykładowo, błony endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby, po fragmentacji tkanki, przyjmują taką orientację, że strona cytoplazmatyczna dwumolekularnej warstwy lipidowej znajduje się na zewnątrz (35, 36, 99, 234, 247, 248). Wysoka latencja *) mannozo-6-fosfatazy (enzymu znacznikowego

*) Latencję enzymów określa następująca zależność:

$$L = 1 - \frac{a}{A} \times 100\%$$

gdzie a oznacza aktywność enzymu błon nie traktowanych detergentem, zaś A oznacza aktywność enzymu po potraktowaniu błon detergentem.

strony ekstracytoplazmatycznej) — 92%, oraz wysoka podatność na proteolizę NADPH-cytochrom c reduktazy (enzymu znacznikowego strony cytoplazmatycznej błon endoplazmatycznego retikulum) świadczą o prawidłowej orientacji błon wyizolowanych mikrosomów. W przypadku błon sarkoplazmatycznego retikulum, przez wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy, można oddzielić frakcję tzw. prawidłowo zorientowanych (ang. *right-side-out*) pęcherzyków, których strona cytoplazmatyczna błony jest ekspozycja na zewnątrz (85% całej populacji pęcherzyków sarkoplazmatycznego retikulum z mięśni szybkich), od frakcji odwrotnie zorientowanych (ang. *inside-out*) pęcherzyków ze stroną ekstracytoplazmatyczną błony wyekspozowaną na zewnątrz (15% całej populacji mikrosomów sarkoplazmatycznego retikulum) (54, 55). Opisano również metody związane z izolowaniem prawidłowo i odwrotnie zorientowanych cieni erytrocytów, a także pęcherzyków endoplazmatycznego retikulum, przy użyciu opłaszczonych polilizyną kuleczek szklanych (56—58).

Ogólne zasady interpretacji wyników dotyczących lokalizowania białek w płaszczyźnie poprzecznej błon przy zastosowaniu niepenetrującego przez dwumolekularną warstwę lipidową związku (lub enzymu hydrolytycznego) obrazuje rycina 6.

IV-1. Zastosowanie chemicznego i enzymatycznego znakowania białek w badaniach asymetrii błon

Przyłączanie syntetycznych związków chemicznych do wolnych grup aminowych lub tiolowych białek oraz reszt takich aminokwasów jak tyrozyna, tryptofan, histydyna, arginina, fenyloalanina i lizyna, jest powszechnie wykorzystywane w lokalizacji białek w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych (61, 82, 89, 92, 93, 249—277, patrz także praca przeglądowa 278). Szereg z nich znajduje również zastosowanie w badaniach rozmieszczenia lipidów w płaszczyźnie transwersalnej błony.

Wiele ze związków modyfikujących jest anionami, co sugeruje, że związki te reagować będą przede wszystkim z grupami białek (i lipidów) o ładunku dodatnim, ekspozowanymi na stronie cytoplazmatycznej pęcherzyków prawidłowo zorientowanych. Żeby zidentyfikować także białka z grupami funkcyjnymi o ładunku ujemnym, stosowany jest nieprzenikający przez błonę związek modyfikujący ester N,N,N-trójmetyloamino- β -alanylo-N-hydroksy imidobursztynianu (TMAS), o ładunku dodatnim. Aby ułatwić detekcję i móc ilościowo zanalizować produkty reakcji, do wielu związków modyfikujących przyłączane są grupy fluoryzujące lub znakuje się je izotopowo. 4-acetoimido-4'-izotiocjano-2,2'-stillbenodwusulfonian (SITS), 4,4'-dwiizotiocjano-2,2'-stillbenodwusulfonian (DIDS), ester N,N,N-trójmetyloamino- β -alanylo-N-hydroksy imidobursztynianu (TMAS)

lub fosforan pirydoksalu mogą być wyznakowane trytem, inne zaś przy użyciu ^{35}S lub ^{125}I (np. dwuazoniowa sól kwasu dwujodosulfanilowego — DDISA).

Powszechnie stosowaną metodą lokalizacji białek w błonach biologicznych jest jodowanie tyrozyny (i histydyny) katalizowane przez laktoperoxydazę (patrz praca przeglądowa (278)). Mechanizm reakcji jest taki sam jak w przypadku jodowania lipidów i został przedstawiony na rysunku 3.

IV-2. Zastosowanie różnych proteaz

Nie przenikające przez dwumolekularną warstwę lipidową cząsteczki enzymów proteolitycznych (lub innych enzymów hydrolitycznych, na przykład neuraminidazy) używane są często w badaniach rozmieszczenia białek lub ich fragmentów, które są dostępne od zewnętrznej strony pęcherzyków pochodzących z błon wewnątrzkomórkowych lub plazmatycznych (patrz prace przeglądowe (38, 278)).

Tabela 1

Najczęściej stosowane enzymy hydrolityczne w badaniach rozmieszczenia białek w płaszczynie poprzecznej błon biologicznych

Enzym	Nr systematyczny (EC)	Charakterystyczna reakcja	Piśmienictwo
neuraminidaza (sialidaza, glikozydaza)	3.2.1.18	hydroliza 2,3-; 2,6-; i 2,8-glukozydowych mostków łączących reszty N- lub O-acylneuraminy z galaktozą, N-acetyloheksosaminą oraz N- lub O-acylową resztą neuraminy i oligosacharydów, glikolipidów i glikoproteidów	(279, 280)
chymotrypsyna A i B (proteinaza serynowa) M.cz. = 25310 (trzustka wołowa)	3.4.21.1	hydroliza wiązań peptydowych, w których reszta karbonylowa pochodzi z Tyr, Trp, Phe, Leu; hydroliza peptydów, estrów i amidów; endopeptydazy specyficzne w stosunku do długich łańcuchów peptydowych	(281—283)
trypsyna (proteinaza serynowa) M.cz. = 23281 (trzustka wołowa)	3.4.21.4	hydroliza wiązań peptydowych, w których reszta karbonylowa pochodzi z Arg i Lys; hydroliza peptydów, estrów i amidów; katalizuje reakcje hydrolizy niezależnie od sekwencji i długości łańcucha peptydowego	(284, 285)

c.d. tabeli 1

elastaza (proteinaza serynowa) M.cz. \approx 25000 (trzustka wieprzowa)	3.4.21.11	hydroliza wiązań peptydowych, w których reszta karbonylowa pochodzi z aminokwasów obojętnych	(286, 287)
proteiny serynowe z mikroorganizmów, np.: subtilizina z <i>B. subtilis</i> (A i B — nagaraza) M.cz. \approx 26700	3.4.21.14	trawia białka i amidy peptydowe, subtilizyny A i B różnią się od siebie strukturą pierwszorzędową, przekształcają ovoalbuminę w plakalbuminę	(288—290)
proteiny serynowe z mikroorganizmów, np.: alkaliczna proteinaza z <i>Tritirachium album</i> (proteinaza K)	3.4.21.14	trawia keratynę oraz wiązania peptydowe, w których grupa karbonylowa pochodzi z aminokwasów hydrofobowych lub aromatycznych	(291—293)
papaina (proteinaza tiolowa) M.cz. \approx 21000 (<i>Carica papaya</i>)	3.4.22.2	hydroliza wiązań peptydowych, w których reszta karbonylowa pochodzi z Arg, Lys, Phe-X, Leu, Gly; trawi peptydy, amidy i estry oraz immunoglobuliny	(294—298)
metaloproteiny z mikroorganizmów np.: neutralna proteinaza z <i>Streptomyces griseus</i> (pronaza)	3.4.24.4	hydroliza wiązań peptydowych, w których reszta karbonylowa pochodzi z aminokwasów hydrofobowych	(299—301)

Metoda kontrolowanej proteolizy jest szczególnie użyteczna w lokalizacji centrów aktywnych enzymów, których substraty syntetyzowane są w cytoplazmie i dla których błona jest nieprzepuszczalna. W doświadczeniach, w których stosuje się kontrolowaną proteolizę białek błonowych, a następnie bada się aktywności enzymatyczne enzymów związanych z błoną, niezbędna jest kontrola integralności dwumolekularnej warstwy lipidowej w trakcie proteolizy. Interpretację otrzymanych wyników ułatwia w takich przypadkach stosowanie porównawczo kilku enzymów proteolitycznych o różnej specyficzności. Równie dobre wyniki daje połączenie metody kontrolowanej proteolizy z innymi metodami używanymi w badaniach topografii składników błon biologicznych.

IV-3. Metody immunologiczne

Przeciwciała, jako białka o dużej masie cząsteczkowej (około 200 000 daltonów), nie przenikają przez dwumolekularną warstwę lipidową, a zatem mogą reagować tylko ze składnikami z zewnętrznej powierzchni błony. Jedną z rozwijanych ostatnio metod polega na wydzielaniu kompleksu białek błonowych z przeciwciałami przy zastosowaniu immunoelektroforezy dwukierunkowej (302, 303). Zachodzącą reakcję immunologiczną można też obserwować stosując mikroskopię immunofluorescencyjną, przy użyciu przeciwciał związanych kowalencyjnie z fluorochromem, na przykład izotiocjanianem fluoresceiny, izotiocjanianem czterometylorodaminy, izotiocjanianem rodaminy B, itp. Pochodne izotiocjanianu wiążą się z wolnymi grupami aminowymi białek (zarówno z ϵ -grupami aminowymi lizyny, jak i N-końcową grupą aminową). W reakcji powstają tiokarbamidy (tiomocznik) (304, 305).

Inna metoda polega na zastosowaniu makrocząsteczek o charakterystycznym, łatwym do zidentyfikowania kształcie, wiążących się z przeciwciałem, zaś kompleks antygen — wyznakowane przeciwciało może być uwidoczniiony pod mikroskopem elektronowym. Do często używanych w tej metodzie związków należy ferrytyna (M. cz. 445 000) stanowiąca materiał wysoce elektronowogęsty, hemocyjaniny małży, a nawet wirusy czy sferyczne cząstki z mleczu roślin (306—318).

Jeszcze inna, interesująca metoda lokalizacji kompleksu antygen-przeciwciało polega na wiązaniu się przeciwciał z enzymami, np. peroksydazami lub fosfatazą alkaliczną (319—323). Detekcja takiego kompleksu polega na wykorzystaniu jego właściwości enzymatycznych. W przypadku zastosowania peroksydazy (M. cz. około 40 000) w wyniku reakcji 3,3',4,4'-czteroaminodwufenylu (dwuaminobenzydyny) z nadtlakiem wodoru powstaje amorficzny polimer, który daje się łatwo wybarwić przy użyciu OsO_4 i może być obserwowany zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym (324—326).

Do technik immunologicznych stosowanych w badaniach rozmieszczenia białek w płaszczyźnie lateralnej i transversalnej błon biologicznych należy także immunoautoradiografia. Polega ona na izotopowym wyznakowaniu przeciwciała przy użyciu najczęściej trytu, ^{14}C lub ^{125}I . Powstający kompleks antygen-przeciwciało lokalizowany jest za pomocą autoradiografii (327—329).

Zastosowanie metod immunologicznych w badaniach asymetrii błon zostało szczegółowo omówione w pracy przeglądowej w języku angielskim (278).

IV-4. Dostępność centrów aktywnych enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów

IV-4.1. Enzymy syntetyzujące lipidy

W badaniach nad rozmieszczeniem enzymów syntetyzujących lipidy w płaszczyźnie transwersalnej błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby stosowano kontrolowaną proteolizę przy użyciu różnych proteaz (40, 59, 229, 237, 239—243, 245, 330) oraz inhibitory biosyntezy lipidów związane z nieprzenikającym przez dwumolekularną warstwę lipidową dekstranem (40, 229, 237). Zmiany aktywności enzymów porównywano ze zmianami aktywności enzymów o poznanej lokalizacji, jak fosfatazy mannozo-6-fosforanu, której centrum aktywne znajduje się po ekstracytoplazmatycznej stronie błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby oraz reduktazy NADPH — cytochrom c, której centrum aktywne znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony (35, 36, 40, 101, 229, 233, 234, 248). W trakcie doświadczeń kontrolowano przenikanie substratów biosyntezy przez dwumolekularną warstwę lipidową błony. Stosując powyższą procedurę wykazano, że enzymy katalizujące biosyntezę fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy *de novo* (Ryc. 5, reakcje 16 i 18) znajdują się po cytoplazmatycznej stronie błony endoplazmatycznego retikulum (40, 229, 239, 241, 245).

Fakt ten potwierdzono badając rozmieszczenie tych enzymów w pęcherzykach o odwróconej orientacji, ale o nienaruszonej strukturze dwumolekularnej warstwy lipidowej (56). W błonie tych ostatnich fosfataza mannozo-6-fosforanu jest wrażliwa na działanie enzymów proteolitycznych, podczas gdy aktywności cholinofosfotransferazy i etanolaminofosfotransferazy (enzymów katalizujących końcowy etap syntezy fosfatydylocholiny i fosfatydyloetanolaminy *de novo*) nie są hamowane w wyniku proteolizy (56). Także cytydyliotransferazy (Ryc. 5, reakcje 15 i 17) występują po cytoplazmatycznej stronie błon endoplazmatycznego retikulum (245). Po cytoplazmatycznej stronie błony zachodzi również, jak wykazano, trójstopniowa metylacja fosfatydyloetanolaminy (59, 245) (Ryc. 5, reakcja 19).

Syntezę zaktywowanych kwasów tłuszczowych katalizuje ligaza acylo-CoA (Ryc. 5, reakcja 3). Centrum aktywne tego enzymu znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błon endoplazmatycznego retikulum (40, 229, 239). Acylo-CoA jest następnie wykorzystywany w acylacji lizopochodnych fosfolipidów katalizowanej przez acylotransferazę lizofosfatydylocholiny (Ryc. 5, reakcje 21 i 22). Aktywność tego enzymu jest tylko w części hamowana w wyniku proteolizy błon endoplazmatycznego retikulum (243); przypuszcza się zatem, iż enzym ten zlokalizowany jest zarówno po cytoplazmatycznej, jak i ekstracytoplazmatycznej stronie błon endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby. Ponieważ acylo-CoA nie

Tabela 2

Asymetryczne rozmieszczenie enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błon endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby

Centrum aktywne enzymu występuje po stronie cytoplazmatycznej błony	Piśmiennictwo
ligaza acylo-CoA (EC 6.2.1.3)	(40, 229, 239)
acylotransferaza glicerolofosforanowa (EC 2.3.1.15)	(40, 229, 239)
acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego (EC 2.3.1.—)	(40, 239, 240)
acylotransferaza dwuglicerydowa (EC 2.3.1.20)	(40, 229, 239)
cytydylilotransferaza fosforylocholinyl (EC 2.7.7.15)	(245)
cholinofosfotransferaza (EC 2.7.8.2)	(40, 229, 239, 241, 245)
etanoloaminofosfotransferaza (EC 2.7.8.1)	(40, 229, 239, 245)
acylotransferaza monoglicerydowa (EC 2.3.1.22)	(40, 237)
kinaza dwuglicerydowa (EC 2.7.1.—)	(40)
metylotransferazy I i II (EC 2.1.1.17)	(59, 245)
enzym katalizujący reakcję wymiany seryny na etanoloaminę fosfatydyloetanolaminy	(40, 237)
fosfatydylotransferaza inozytolowa (EC 2.7.8.11)	(40, 237)
cytydylilotransferaza glicerolofosforanowa (EC 2.7.7.41)*	(40, 237)
acylotransferaza lizofosfatydylocholinyl (EC 2.3.1.23) częściowo także po stronie ekstracytoplazmatycznej	(243)
acylotransferaza cholesterolu (EC 2.3.1.26)	(242)
acylotransferaza fosfodwuhydroksyacetonu (EC 2.3.1.42)	(40, 237)
oksydoreduktaza acylo(alkilo)fosfodwuhydroksyacetonu (EC 1.1.1.101)	(40, 237)
Centrum aktywne enzymu występuje po stronie ekstracytoplazmatycznej błony	
fosfataza kwasu fosfatydowego (EC 3.1.3.4)	(40, 229, 239)
hydrolaza palmitylo-CoA (EC 3.1.2.2)	(351)
lizofosfolipaza II (EC 3.1.1.5)	(349, 350)

przenika przez dwumolekularną warstwę lipidową i jest syntetyzowany po stronie cytoplazmatycznej błony, sądzić można, że na wewnętrznej (ekstracytoplazmatycznej) powierzchni błony acylotransferaza współdziała z fosfolipazą A w tworzeniu nowych rodzajów molekularnych fosfatydylocholine (243). Działanie fosfolipazy A umożliwia penetrację acylo-CoA przez dwumolekularną warstwę lipidową, gdyż powstające w wyniku hydrolizy kwasy tłuszczowe i lizofosfolipidy działają jak detergenty.

Dostępne w piśmiennictwie dane odnośnie lokalizacji centrów aktywnych enzymów katalizujących syntezę lipidów innych klas wskazują, iż enzymy biorące udział w syntezie acyloglicerol-3-fosforanu, kwasu fosfatydowego, mono i dwuglicerydów, fosfatydyloinozytolu, fosfatydyloseryny i alkiloglicerol-3-fosforanu (głównego prekursora biosyntezy lipidów eterowych) (Ryc. 5, reakcje 4—8, 10—12, 23) są eksponowane na cytoplazmatyczną stronę błon endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby (40, 188, 229, 237, 239, 240). Potwierdza to dostępność właściwych substratów wymienionych enzymów właśnie od strony cytoplazmatycznej błon endoplazmatycznego retikulum.

W błonie erytrocytów inkorporacja kwasów tłuszczowych i acylacja lizopochodnych fosfolipidów zachodzą po cytoplazmatycznej stronie błony (Ryc. 5, reakcje 21, 22) (43, 331), podobnie jak synteza dwuglicerydów (Ryc. 5, reakcja 8) (332). W odróżnieniu od błon endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby, w błonie erytrocytów metylotransferazy I i II (Ryc. 5, reakcja 19) mają przeciwne w stosunku do siebie umiejscowienie: centrum aktywne pierwszego enzymu zlokalizowane jest po stronie cytoplazmatycznej, zaś drugiego, po stronie ekstracytoplazmatycznej (333). Podobną lokalizację obu metylotransferaz zaobserwowano też w błonie synaptosomalnej (334). Wysłunięto w związku z powyższym sugestię, iż metylacja fosfatydyloetanoloaminy może zachodzić w czasie przemieszczania się cząsteczki fosfolipidu z jednej warstwy monomolekularnej do drugiej (334). Ta atrakcyjna hipoteza budzi jednak zastrzeżenia innych badaczy (40).

W błonie mikrosomów z mózgu kurczęcia centrum aktywne cholinofosfotransferazy (Ryc. 5, reakcja 16) jest eksponowane na cytoplazmatyczną stronę, zaś etanoloaminofosfotransferazy (Ryc. 5, reakcja 18) na stronę ekstracytoplazmatyczną (335). Stosując TNBS i znakowane izotopowo prekursory biosyntezy lipidów wykazano, iż w błonie takich mikrosomów synteza fosfatydyloetanoloaminy *de novo* zachodzi po ekstracytoplazmatycznej stronie błony, a syntetyzowany fosfolipid jest w ciągu kilku minut przenoszony do drugiej warstwy monomolekularnej (336).

W błonie mikrosomalnej wyizolowanej z komórek nabłonka jelita cienkiego szczura centra aktywne cholinofosfotransferazy i acylotransferazy monoglicerydowej (Ryc. 5, reakcje 16 i 11) znajdują się na ekstracytoplazmatycznej stronie błony, zaś acylotransferazy glicerofosforanu i acylotransferazy lizofosfatydylocholine (Ryc. 5, reakcje 4 i 21) na stronie cyto-

plazmatycznej (337). Powyższe wyniki poddano krytyce (240), gdyż aktywności badanych enzymów oznaczono w środowisku zawierającym aktywną proteazę.

W błonach mikrosomalnych z pęcherzykowych komórek nowotworowych nabłonka płuc wykazano, że centrum aktywne acylotransferazy lizofosfatydylocholiny (Ryc. 5, reakcja 21) jest częściowo eksponowane na stronę cytoplazmatyczną, a częściowo na ekstracytoplazmatyczną (243). Podobne rozmieszczenie acylotransferazy lizolecytyny wykazano w błonach endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby szczura (243) i w błonach sarkoplazmatycznego retikulum z mięśni szybkich królika (338). W sarkoplazmatycznym retikulum z mięśni szybkich królika stwierdzono, iż centra aktywne enzymów katalizujących końcowy etap biosyntezy fosfatydyloetanoloaminy i fosfatydylocholiny (Ryc. 5, reakcje 16 i 18) *de novo* rozmieszczone są asymetrycznie i znajdują się po cytoplazmatycznej stronie tych błon (216, 338).

Interesujące wyniki dotyczące lokalizacji enzymów syntetyzujących lipidy eterowe w błonach mikrosomalnych wyizolowanych z gruczołu Harderiana królika i raka wysiękowego Ehrlicha (244, 339, 340) oraz w błonie peroksysomów z komórek wątroby świnki morskiej (224) wskazują również na asymetrię w ich rozmieszczeniu w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej. Centra aktywne acylotransferazy fosfodwuhydroksyacetonu i syntazy alkilofosfodwuhydroksyacetonu (Ryc. 5, reakcje 5 i 14) wykazano po ekstracytoplazmatycznej stronie błony (340), zaś ligazy acylo-CoA (Ryc. 5, reakcja 3) po cytoplazmatycznej stronie błony mikrosomów z gruczołu Harderiana (340). Dotąd zebrano tylko wyrywkowe dane na temat rozmieszczenia enzymów lipidowych w błonie plazmatycznej adipocytów szczura (341); na przykład wiadomo, iż centrum aktywne acylotransferazy glicerofosforanowej (Ryc. 5, reakcja 4) dostępne jest od ekstracytoplazmatycznej strony błony.

Enzym katalizujący reakcję wymiany fosfatydylocholiny na etanoloaminę (ang. *choline base exchange enzyme*) w błonie mikrosomów z mózgu szczura występuje po cytoplazmatycznej stronie, a enzymy katalizujące wymianę seryny i etanoloaminy, odpowiednio fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanoloaminy na inne zasady (ang. *serine base exchange enzyme*, *ethanolamine base exchange enzyme*) po ekstracytoplazmatycznej stronie błony (53). Inni badacze wskazują na cytoplazmatyczną lokalizację procesu wymiany choliny na etanoloaminę w błonie mikrosomów z mózgu szczura (342).

Podsumowując, należy podkreślić, że w błonach endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby biosynteza lipidów zachodzi po stronie cytoplazmatycznej dwumolekularnej warstwy lipidowej, gdzie znajdują się centra aktywne enzymów katalizujących syntezę lipidów. W błonach różnych organelli komórkowych w innych tkankach mamy do czynienia z podobną sytuacją. Wydaje się, iż asymetria w rozmieszczeniu enzymów syn-

tetyzujących lipidy w płaszczyźnie poprzecznej błon biologicznych jest tylko jednym z czynników powodujących powstawanie i utrzymywanie asymetrii lipidów.

IV-4.2. Enzymy biorące udział w degradacji lipidów

W komórkach wielu organizmów eukariotycznych fosfolipazy A występują w błonach plazmatycznych i wewnątrzkomórkowych, np.: fosfolipazy A₁ i A₂ są enzymami błon mitochondrialnych i plazmalemy płytek krwi ludzkiej (343), fosfolipaza A₁ zaś występuje w sarkolemie serca (344) oraz plazmalemie i błonach endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby (345). Centrum aktywne fosfolipazy A wykryto na ekstracytoplazmatycznej stronie błony erytrocytów krwi przeżuwaczy (346). Działaniem fosfolipazy A błony erytrocytów tłumaczy się brak w zewnętrznej warstwie monomolekularnej fosfatydylocholine (346).

W komórkach wątroby wołu stwierdzono obecność dwóch lizofosfolipaz I i II. Lizofosfolipaza I jest enzymem rozpuszczalnym (80% aktywności całkowitej), podczas gdy aktywność lizofosfolipazy II (około 20% aktywności całkowitej) charakteryzuje frakcję błon endoplazmatycznego retikulum (347, 348). Enzym ten jest białkiem powierzchniowym o m. cz. 65 000 daltonów, które zostaje uwolnione do frakcji cytoplazmatycznej w wyniku ekstrakcji błon detergentem. Używając przeciwciał przeciwko lizofosfolipazie II (349) oraz stosując trawienie endoplazmatycznego retikulum enzymami proteolitycznymi (350) wykazano, że enzym ten występuje w ekstracytoplazmatycznej warstwie błon endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby szczura. Także centrum aktywne fosfatazy kwasu fosfatydowego (Ryc. 5, reakcja 9) w błonach endoplazmatycznego retikulum komórek wątroby szczura zlokalizowano na stronie ekstracytoplazmatycznej błony (40, 229, 239). Na stronie ekstracytoplazmatycznej znajduje się również centrum aktywne hydrolazy palmitylo-CoA (aktywowanej przez detergenty) (351).

Jak wynika z cytowanych wyżej danych literaturowych zbadano rozmieszczenie w błonach zaledwie kilku enzymów biorących udział w degradacji lipidów. Porównanie jednakże położenia ich centrów aktywnych z położeniem centrów aktywnych enzymów syntetyzujących lipidy sugeruje, iż synteza i degradacja lipidów są procesami zachodzącymi po przeciwnych stronach błony. Odnosi się to zarówno do endoplazmatycznego retikulum z komórek wątroby (40, 59, 229, 237, 239—243, 245, 330, 349—351), jak i błon sarkoplazmatycznego retikulum komórek mięśni szybkich (216, 338), błony erytrocytów krwi ssaków (41, 43, 331—333, 346, 352) oraz błony synaptosomalnej (53, 334—336, 342).

V. Podsumowanie

Rozmieszczenie białek integralnych w błonach biologicznych wynika ze sposobów ich wbudowywania w dwumolekularną warstwę lipidową w czasie biogenezy błon. Asymetria białek utrzymuje się w błonie, gdyż białka nie przemieszczają się przez hydrofobowy trzon dwumolekularnej warstwy lipidowej (jest to tzw. asymetria absolutna). Różnice w zawartości lipidów pomiędzy obiema warstwami monomolekularnymi błony są ilościowe, a nie jakościowe. Nie mamy więc w tym przypadku do czynienia z asymetrią absolutną. Fosfolipidy, zawierające zasadę cholinoową (fosfatydylocholina i sfingomielina) na ogół przeważają w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błony, podczas gdy fosfolipidy posiadające ładunek netto (fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanoloamina i fosfatydyloinozytol) znajdują się w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej. Większość dotychczas uzyskanych danych na temat rozmieszczenia glikolipidów wskazuje na ich obecność w ekstracytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej (jest to asymetria absolutna, podobnie jak w przypadku białek).

Upakowanie cząsteczek lipidów w błonie zależy od ładunku netto lipidu i od wchodzących w skład lipidów kwasów tłuszczowych (długości ich łańcucha alifatycznego, stopnia nasycenia, itp.). Asymetria w rozmieszczeniu lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony jest determinowana także przez rodzaj interakcji lipidów z integralnymi białkami błon i z różnym pod względem składu chemicznego środowiskiem po obu stronach błony. Stwierdzono, iż aktywność katalityczna szeregu enzymów błonowych zależy od obecności określonych fosfolipidów (353—371). Kwaśne fosfolipidy (które dodane z zewnątrz przyspieszają koagulację erytrocytów) występują w cytoplazmatycznej warstwie monomolekularnej błony plazmatycznej erytrocytów. Czynniki koagulujące natomiast znajdują się po ekstracytoplazmatycznej stronie błony (365, 372, 373).

Porównanie rozmieszczenia lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony z miejscem ich biosyntezy i degradacji wskazuje, iż asymetryczne rozmieszczenie enzymów biorących udział w metabolizmie lipidów może być jednym z czynników warunkujących asymetrię lipidów. Wydaje się jednak, że decydującymi czynnikami utrzymującymi asymetryczne rozmieszczenie lipidów w płaszczyźnie poprzecznej błony są:

- oddziaływania poszczególnych klas fosfolipidów z białkami integralnymi błon;

- selektywny transport lipidów pomiędzy dwiema warstwami monomolekularnymi (*flip-flop*), być może wspomagany przez białka integralne błon;

- wymiana fosfolipidów pomiędzy różnymi komórkami lub lipo-

proteidami (spontaniczna lub katalizowana przez białka przenoszące fosfolipidy);

— fuzja błon.

W związku z kontrowersyjnością otrzymanych przez różnych autorów wyników odnośnie asymetrii błon, zamieściliśmy w niniejszym artykule krytyczny przegląd metod stosowanych w badaniach rozmieszczenia lipidów i białek w płaszczyźnie poprzecznej dwumolekularnej warstwy lipidowej. Wydaje się, że dopiero zastosowanie kilku niezależnych metod pozwala na otrzymanie wyników wiarygodnych i określających rzeczywiste rozmieszczenie składników w obu warstwach monomolekularnych błon biologicznych.

Podziękowanie

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie Panu doktorowi Józefowi Zbrowskiemu za życzliwe uwagi i wnikliwą dyskusję w czasie pisania niniejszej pracy.

Zaakceptowano do druku 29.09.1983 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Wickner W., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 23—45.
2. Rothman J. E., Lenard J., (1977), *Science*, **195**, 743—753.
3. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
4. Gorter E., Grendel F., (1925), *J. Exp. Med.*, **41**, 439—443.
5. Etémedi A.-H., (1980), *Biochimie*, **62**, 111—134.
6. Cornforth J. W., (1969), *Q. Rev.*, **23**, 125—140.
7. Lodish H. F., Rothman J. E., (1979), *Sci. Am.*, **240** (1), 38—53.
8. Singer S. J., (1971), w: *Structure and Function of Biological Membranes*, red. Rothfield L. J., str. 145—222, Academic Press, New York, London.
9. Frye L. D., Edidin M., (1970), *J. Cell Sci.*, **7**, 319—335.
10. Cherry R. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 289—327.
11. Petit V. A., Edidin M., (1974), *Science*, **184**, 1183—1185.
12. Edidin M., Wei T., (1977), *J. Cell Biol.*, **75**, 475—482.
13. Schlessinger J., Elson E. L., Webb W. W., Yahara I., Rutishauser U., Edelman G. M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1110—1114.
14. Johnson M., Edidin M., (1978), *Nature*, **272**, 443—450.
15. Thomas D. D., Bigelow D. J., Squier T. C., Hidalgo C., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 217—225.
16. Chapman D., Gómez-Fernández J. C., Goñi F. M., (1979), *FEBS Lett.*, **98**, 211—223.
17. Wickner W., (1980), *Science*, **210**, 861—868.
18. Blobel G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1—7.
19. Blobel G., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1496—1500.
20. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell Biol.*, **67**, 835—851.
21. Blobel G., Dobberstein B., (1975), *J. Cell Biol.*, **67**, 852—862.
22. Walter P., Ibrahim I., Blobel G., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 545—550.
23. Walter P., Blobel G., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 551—556.

24. Walter P., Blobel G., (1981), *J. Cell Biol.*, **91**, 557—561.
25. Waksman A., Hubert P., Crémel G., Rendon A., Burgun C., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 249—296.
26. Palade G., (1975), *Science*, **189**, 347—358.
27. Silver P., Watts C., Wickner W., (1981), *Cell*, **25**, 341—345.
28. Watts C., Silver P., Wickner W., (1981), *Cell*, **25**, 347—353.
29. Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M., (1982), *J. Cell Biol.*, **92**, 1—22.
30. Meyer D. L., Krause E., Dobberstein B., (1982), *Nature*, **297**, 647—650.
31. Nesmeyanova M. A., (1982), *FEBS Lett.*, **142**, 189—193.
32. Bergelson L. D., Barsukov L. I., (1977), *Science*, **197**, 224—230.
33. Bretscher M. S., (1973), *Science*, **181**, 622—629.
34. Etémadi A.-H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 423—475.
35. Nilsson O. S., Dallner G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 453—458.
36. Nilsson O. S., Dallner G., (1977), *J. Cell Biol.*, **72**, 568—583.
37. Op den Kamp J. A. F., (1979), *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47—71.
38. Op den Kamp J. A. F., (1981), w: New Comprehensive Biochemistry, red. Neuberger A., Van Deenen L. L. M., t. 1, Membrane Structure, red. Finean J. B., Michell R. H., str. 83—126, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
39. Van Deenen L. L. M., (1979), *FEBS Lett.*, **123**, 3—15.
40. Bell R. M., Ballas L. M., Coleman R. A., (1981), *J. Lipid Res.*, **22**, 391—403.
41. De Kruijff B., Vanden Besselaar A. M. H. P., Van den Bosch H., Van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 181—192.
42. De Kruijff B., Wirtz K. W. A., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **648**, 318—326.
43. Renooij W., Van Golde L. M. G., Zwaal R. F. A., Van Deenen L. L. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 53—58.
44. Schachter D., Cogan U., Abbott R. E., (1982), *Biochemistry*, **21**, 2146—2150.
45. Vanden Besselaar A. M. H. P., De Kruijff B., Vanden Bosch H., Van Deenen L. L. M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 241—255.
46. Vanden Besselaar A. M. H. P., De Kruijff B., Vanden Bosch H., Van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 193—199.
47. Van Meer D., Poorthuis B. J. H. M., Wirtz K. W. A., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **103**, 283—288.
48. Lenaz G., (1974), *Sub-Cell. Biochem.*, **3**, 167—248.
49. De Kruijff B., Van Zoelen E. J. J., Van Deenen L. L. M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 537—542.
50. Haest C. W. M., Deuticke B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 468—480.
51. Haest C. W. M., Plasa G., Kamp D., Deuticke B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 21—32.
- 51a. Mombers C., Verkleij A. J., De Gier J., Van Deenen L. L. M., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 271—281.
- 51b. Mombers C., De Gier J., Demel R. A., Van Deenen L. L. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **603**, 52—64.
- 51c. Marinetti G. V., Crain R. C., (1978), *J. Supramol. Struct.*, **8**, 191—197.
52. Gerritsen W. J., Henricks P. A. J., De Kruijff B., Van Deenen

- L. L. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 607—619.
53. Buchanan A. G., Kanfer J. N., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 720—725.
54. Michalak M., Sarzała M. G., Drabikowski W., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 105—116.
55. Sarzała M. G., Michalak M., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 221—235.
56. Dawidowicz E. A., Sawyer J. R., (1979), *Biophys. J.*, **25**, 292a.
57. Gauthron D. C., Godinot C., Mairouch H., Blanchy B., Perrin F., Wojtkowiak Z., (1977), w: *Bioenergetic of Membranes*, red. Packers L., Papageorgiou G. L., Trebst A., str. 501—512, Elsevier, Amsterdam.
58. Cohen C. M., Kramer R. M., Branton D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 29—40.
59. Higgins J. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 1—15.
60. Renooij W., Van Golde L. M. G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 465—474.
61. Gordesky S. E., Marinetti G. V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1027—1031.
62. Gordesky S. E., Marinetti G. V., Love R., (1975), *J. Membrane Biol.*, **20**, 111—132.
63. Marinetti G. V., Love R., (1976), *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 239—254.
64. Marinetti G. V., Senior A. E., Love R., Broadhurst C. I., (1976), *Chem. Phys. Lipids*, **17**, 353—362.
65. Marinetti G. V., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 198—209.
66. Schick P. K., Kurica K. B., Chacko G. K., (1976), *J. Clin. Invest.*, **57**, 1221—1226.
67. Fontaine R. N., Schroeder F., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **558**, 1—12.
68. Sandra A., Pagano R. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 332—338.
69. Hasselbach W., Migala A., (1975), *Z. Naturforsch.*, **30c**, 681—683.
70. Hidalgo C., Ikemoto N., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8446—8454.
71. Thorley-Lawson D. A., Green N. M., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 223—226.
72. Vale M. G. P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **471**, 39—48.
73. McGill K. A., Bennett J. P., Smith G. A., Plumb R. W., Warren G. B., (1981), *Biochem. J.*, 287—295.
74. Fontaine R. N., Harris R. A., Schroeder F., (1979), *Life Sci.*, **24**, 395—400.
75. Fontaine R. N., Harris R. A., Schroeder F., (1980), *J. Neurochem.*, **34**, 269—277.
76. Smith A. P., Loh H. H., (1976), *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **19**, 147—151.
77. Paton J. C., May B. K., Elliott W. H., (1978), *J. Bacteriol.*, **135**, 393—401.
78. Litman B. J., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2844—2848.
79. Lentz B. R., Litman B. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 5537—5542.
80. Kumar G., Klara V. K., Brodie A. F., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 22—30.
81. Rothman J. E., Kennedy E. P., (1977), *J. Mol. Biol.*, **110**, 603—618.
82. Shimada K., Murata N., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 605—620.
83. Rothman J. E., Kennedy E. P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1821—1825.
84. Op den Kamp J. A. F., Kauertz M. T., Van Deenen L. L. M., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 1090—1098.
85. Bishop D. G., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **80**, 381—391.

86. Langley K. E., Kennedy E. P., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 6245—6249.
87. Fong B. S., Hunt R. C., Brown J. C., (1976), *J. Virol.*, **20**, 658—663.
88. Fong B. S., Brown J. C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **510**, 230—241.
89. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **15**, 227—248.
90. Rothstein A., Cabantchik Z. I., Knaufe P., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 3—10.
91. Houslay M. D., Stanley K. K., (1982), *Dynamics of biological membranes. Influence of synthesis, structure and function*, str. 326, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
92. Maddy A. H., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **88**, 390—399.
93. Bretscher M. S., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 523—528.
94. Bretscher M. S., (1972), *Nature New Biol.*, **236**, 11—12.
95. Higgins J. A., Evans W. H., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 563—567.
96. Tsai K. H., Lenard J., (1975), *Nature*, **253**, 554—555.
97. Patzer E. J., Moore N. E., Barenholz Y., Shaw J. M., Wagner R. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4544—4550.
98. Schäfer R., Hinnen R., Franklin R. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 15—27.
99. DePierre J. W., Dallner G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 411—472.
100. Nilsson O. S., Dallner G., (1975), *FEBS Lett.*, **58**, 190—193.
101. Nilsson O. S., DePierre J. W., Dallner G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 93—104.
102. Higgins J. A., Dawson R. M. C., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 342—356.
103. Higgins J. A., Pigott C. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 151—158.
104. Low M. G., Finean J. B., (1977), *Biochem J.*, **162**, 235—240.
105. Sundler R., Alberts A. W., Vagelos P. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5299—5304.
106. Sundler R., Sarcione S. L., Alberts A. W., Vagelos P. R., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3350—3354.
107. Chapmann D., Peel W. E., Kingston B., Lilley T. H., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **464**, 260—275.
108. Karnovsky M. J., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Klausner R. D., (1982), *J. Cell Biol.*, **94**, 1—6.
109. Krebs J. J. R., (1982), *J. Bioenerg. Biomemb.*, **14**, 141—157.
110. Omura T., Harano T., (1979), w: *Structure and Function of Biomembranes, The Proceedings of the first congress of the Federation of Asian and Oceanian Biochemists*, red. Yagi K., str. 117—125. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Center for Academic Publications, Japan, Tokyo.
111. Cullis P. R., De Kruijff B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 399—420.
112. Israelachvili J. N., Mitchell D. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 13—19.
113. Verkleij A. J., Van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Cullis P. R., De Kruijff B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 620—624.
114. Meyer H. W., (1983), *Exp. Path.*, **23**, 3—26.
115. Luzzatti V., Husson F., (1962), *J. Cell Biol.*, **12**, 207—218.
116. Luzzatti V., Gulik-Krzywicki T., Tardieu A., (1968), *Nature*, **218**, 1031—1034.
117. Luzzatti V., Tardieu A., (1974), *Ann. Rev. Phys. Chem.*, **25**, 79—94.
118. Luzzatti V., Reiss-Husson F., Rivas E., Gulik-Krzywicki T.,

- (1966), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **137**, 409—413.
119. Rand R. P., Sengupta S., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 484—492.
120. Deamer D. W., Leonard R., Tardieu A., Branton D., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **219**, 47—60.
121. Vail W. J., Stollery J. G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 74—84.
122. Cullis P. R., Verkleij A. J., Ververgaert P. H. J. T., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **513**, 11—20.
123. Papahadjopoulos D., Vail W. J., Pangborn W. A., Poste G., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 268—283.
124. Papahadjopoulos D., Jacobson K., Poste G., Shepherd D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 483—491.
125. Cullis P. R., Verkleij A. J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **552**, 545—550.
126. Verkleij A. J., Mombers C., Leunissen-Bijvelt J., Ververgaert P. H. J. T., (1979), *Nature*, **279**, 162—163.
127. De Kruijff B., Verkleij A. J., Van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., De Gier J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 200—209.
128. Crain R. C., Marinetti G. V., (1979), *Biochemistry*, **18**, 2407—2414.
129. Krebs J. J. R., Hauser H., Carafoli E., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 5308—5316.
130. Hubbard A. L., Cohn Z. A., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 390—405.
131. Podulso J. F., Greenberg C. S., Glick M. C., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2616—2621.
132. Podulso J. F., Braun P. E., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1099—1105.
133. Zimmerman B., Chapman M. L., (1977), *J. Immunol. Methods*, **15**, 183—192.
134. Mersel M., Benenson A., Doljanski F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 1166—1171.
135. Gross Z., Rottem S., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **555**, 547—552.
136. Gahmberg C. G., Hakomori S. I., (1976), w: Biomembranes, red. Manson L. A., t. 8, str. 131—165, Plenum Press, New York.
137. Avigad G., Amaral D., Asensio C., Horecker B. L., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 2736—2743.
138. Steck T. L., Dawson G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2138—2142.
139. Gahmberg C. G., Hakomori S. I., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4311—4317.
140. Roelofsen B., Zwaal R. F. A., (1976), w: Methods in Membrane Biology, red. Korn E. D., str. 147—163, Plenum Press, New York.
141. Van Deenen L. L. M., (1974), w: Metabolism and Physiological Significance of Lipids, red. Dawson R. M., Rhodes D. N., str. 155—178, Wiley, London.
142. De Haas G. H., Postema N. M., Nieuwenhuizen W., Van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **159**, 103—117.
143. Marinetti G. V., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 55—99.
144. Okuyama H., Nujima S., (1965), *J. Biochem. (Tokyo)*, **57**, 529—538.
145. Mölby R., Wadström T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 569—584.
146. Adamich M., Dennis E. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 424—428.
147. Adamich M., Dennis E. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5121—5125.
148. Salach J. I., Turini P., Hauber J., Seng R., Tisdale H., Singer T. P., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 936—942.
149. Lankisch P. G., Lege L., Oldigs H. D., Vogt W., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **239**, 267—272.

150. Martin J. K., Luthra M. G., Wells M. A., Watts R. P., Hanahan D. J., (1975), *Biochemistry*, **14**, 5400—5408.
151. Deems R. A., Dennis E. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9008—9012.
152. Verkleij A. J., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Comfurius B., Kastelijn D., Van Deenen L. L. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 178—187.
153. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Comfurius P., Van Deenen L. L. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 83—96.
154. Roelofsen B., Zwaal R. F. A., Comfurius P., Woodward C. B., Van Deenen L. L. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 925—931.
155. Verger R., De Haas G. H., (1976), *Annu. Rev. Biophys. Bioenerg.*, **5**, 77—117.
156. Demel R. A., Guerts van Kessel W. S. M., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Van Deenen L. L. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 97—107.
157. Op den Kamp J. A. F., Kauerz M. T., Van Deenen L. L. M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 169—177.
158. Bevers E. M., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 35—42.
159. Zwaal R. F. A., (1974), *Biochem. Soc. Trans. London*, **2**, 821—830.
160. Rottem S., Hasin M., Razin S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 520—531.
161. Bevers E. M., Wang H. H., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **193**, 502—508.
162. Simpson R., Hauser R., (1966), *Virology*, **30**, 684—697.
163. Wahlström A., (1971), *Toxicon*, **9**, 45—56.
164. Bevers E. M., Singal S. A., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1290—1295.
165. Gazitt Y., Loyter A., Reichler Y., Ohad I., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **419**, 479—492.
166. Gazitt Y., Ohad I., Loyter A., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **382**, 65—72.
167. Van Meer G., De Kruijff B., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **596**, 1—9.
168. Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Colley C. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **300**, 159—182.
169. Kahlenberg A., Walker C., Rothrick R., (1974), *Can. J. Biochem.*, **52**, 803—806.
170. Miljanich G. P., Nemes P. P., White D. L., Dratz A. E., (1981), *J. Membrane Biol.*, **60**, 249—258.
171. Wang Y. J., Mahler H. R., (1976), *J. Cell Biol.*, **71**, 639—658.
172. Perret B., Chap H. J., Douste-Blazy L., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 434—446.
173. Plantavid M., Perret B. P., Chap H., Simon M. F., Douste-Blazy L., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 451—460.
174. Sessions A., Horwitz A. F., (1981), *FEBS Lett.*, **134**, 75—78.
175. Hale J. E., Schroeder F., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 649—661.
176. Litman B. J., Smith H. J., Jr., (1974), *Fed. Proc.*, **33**, 1575—1587.
177. Chap H. J., Zwaal R. F. A., Van Deenen L. L. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **467**, 146—157.
178. Vale M. G. P., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **204**, 148—152.
179. Kornberg R. D., Mc Connell H. M., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1111—1120.

180. Johnson L. W., Hughes M. E., Zilversmit D. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 176—185.
181. Rothman J. E., Dawidowicz E. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2809—2816.
182. Zilversmit D. B., Hughes M. E., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **469**, 99—110.
183. Lange Y., D'Alessandro J. S., (1978), *J. Supramol. Struct.*, **8**, 391—397.
184. Zborowski J., Demel R. A., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **688**, 381—387.
185. Crain R. C., Zilversmit D. B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **620**, 37—48.
186. Wirtz K. W. A., Guerts van Kessel W. S. M., Kamp H. H., Demel R. A., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **61**, 515—523.
187. Konings W. N., Bisschop A., Veenhuis M., Vermeulen C. A., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 1456—1465.
188. Brophy P. J., Burbach P., Ad Nelemans S., Westerman J., Wirtz K. W. A., Van Deenen L. L. M., (1978), *Biochem. J.*, **174**, 413—420.
189. Steck T. L., Wackman N., Tarlov A. R., (1976), *J. Supramol. Struct.*, **4**, 169—180.
190. Kramer R. M., Branton D., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 219—232.
191. Rothman J. E., Tsai D. K., Dawidowicz E. A., Lenard J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2361—2370.
192. Barsukov L. I., Kulikov V. I., Bergelson L. D., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 704—711.
193. Patzer E. J., Shaw J. M., Moore N. E., Thompson T. E., Wagner R. R., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4192—4200.
194. Lenard J., Rothman J. E., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 391—395.
195. Rottem S., Slutzky G. M., Bittman R., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2723—2726.
196. Lange Y., Cohen C. M., Poznansky M. J., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1538—1542.
197. Van Meer G., Lange L. G., Op den Kamp J. A. F., Van Deenen L. L. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **598**, 173—177.
198. Bloj B., Zilversmit D. B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1277—1283.
199. Hollings J. A., Kamp H. H., Wirtz K. W. A., Van Deenen L. L. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 601—605.
200. Machida K., Ohnishi S. I., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 156—164.
201. Dawidowicz E. A., Rothman J. E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 176—185.
202. Rousselet A., Colbeau A., Vignais P. M., Devaux P. F., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **426**, 372—384.
203. Pattus F., Desnuelle P., Verger R., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 62—70.
204. Mühlradt P. F., Menzel J., Golecki J. R., Speth V., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **43**, 533—539.
205. Mühlradt P. F., Golecki J. R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 343—352.
206. Inoue K., Nojima S., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **144**, 409—414.
207. Rapport M. M., Graf S., (1969), *Prog. Allergy*, **13**, 273—331.
208. Guarnieri M., (1975), *Lipids*, **10**, 294—298.
209. Razin S., Prescott B., Caldes G., James W. D., Chanock R. M., (1970), *Infect. Immun.*, **1**, 408—416.
210. Schiefer H. G., Gerhard U., Brunner H., (1975), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 559—565.
211. Jelsema C. L., Morré D. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7960—7971.
212. Bell R. M., Coleman R. A., (1980), *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 459—487.

213. Harding R.G.R., Chan F., Casola P.G., Fellows G.F., Wong T., Possmayer F., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **750**, 373—382.
214. Butler M., Morell P., (1982), *J. Neurochem.*, **39**, 155—164.
215. Vereyken J. M., Montfoort A., Van Golde L. M. G., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **260**, 70—81.
216. Pilarska M., Zimniak P., Pikuła S., Sarzała M. G., (1980), *FEBS Lett.*, **114**, 21—24.
217. Sarzała M. G., Pilarska M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 81—92.
218. Barańska J., (1982), w: *Advances in Lipid Research*, red. Paoletti R., Kritchevsky D., t. 19, str. 163—184, Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto.
219. Van Golde L. M. G., Raben J., Batenburg J. J., Fleischer B., Zambrano F., Fleischer S., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **360**, 179—192.
220. Daae L. N. W., Bremer J. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 92—104.
221. Daae L. N. W., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 186—193.
222. Zborowski J., Wojtczak L., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **187**, 73—84.
223. Sarzała M. G., Van Golde L. M. G., De Kruyff B., Van Deenen L. L. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 106—119.
224. Jones C. L., Hajra A. K. (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 8289—8295.
225. Hajra A. K., Burke C. L., Jones C. L., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 10896—10900.
226. Hajra A. K., Jones C. L., Davis P. A., (1978), w: *Enzymes of Lipid Metabolism*, red. Gatt S., Freysz L., Mandel P., str. 369—378, Plenum Press, New York.
227. Krisans S. K., Mortensen R. M., Lazarow P. B., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9599—9607.
228. Ballas L. M., Arion W. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8512—8518.
229. Ballas L. M., Bell R. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **602**, 578—590.
230. Polokoff M. A., Bell R. M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7173—7178.
231. Nilsson O. S., Peterson E., Dallner G., (1973), *J. Cell Biol.*, **56**, 762—776.
232. Carey D. J., Sommers L. W., Hirshberg C. B., (1980), *Cell*, **19**, 597—605.
233. Arion W. J., Ballas L. M., Lange A., Wallin B. K., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4901—4907.
234. Arion W. J., Lange A. J., Ballas L. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6784—6790.
235. Schwartz S. E., Dietschy J. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 961—973.
236. Takahashi T., Hori S. H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 262—276.
237. Ballas L. M., Bell R. M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 586—595.
238. Carroll M. A., Morris P. E., Grosjean C. D., Anzalone T., Hal-dar D., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 17—25.
239. Coleman R. A., Bell R. M., (1978), *J. Cell Biol.*, **76**, 245—253.
240. Coleman R. A., Bell R. M., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **595**, 184—188.
241. Higgins J. A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **558**, 48—57.
242. Lichtenstein A. H., Brecher P., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 9098—9104.
243. Renooij W., Snyder F., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **666**, 468—474.
244. Rock C. O., Snyder F., (1978), w: *Enzymes of Lipid Metabolism*, red. Gatt S., Freysz L., Mandel P., str. 379—385, Plenum Press, New York, London.
245. Vance D. E., Choy P. C., Blake Farren S., Lim P., Schneider W., (1977), *Nature*, **270**, 268—269.

246. Valtersson C., Brunk U., Dallner G., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **689**, 539—547.
247. Nilsson O. S., DePierre J. W., Dallner G., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **511**, 93—104.
248. DePierre J. W., Ernster L., (1977), *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 201—262.
249. Carraway K. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 379—410.
250. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1972), *J. Membrane Biol.*, **10**, 311—330.
251. Juliano R. L., (1974), *Exp. Cell Res.*, **86**, 181—184.
252. Cabantchik Z. I., Rothstein A., (1974), *J. Membrane Biol.*, **15**, 207—226.
253. Juliano R. L., Behar-Bannelier M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **375**, 249—267.
254. Berg H. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 65—78.
255. Carraway K. L., Kobylka B., Triplett R. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 934—940.
256. Bender W. W., Gazan H., Berg H. C., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 783—797.
257. Trinberg H. M., Melnick R. L., Maguire J., Packer L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **345**, 118—128.
258. Merli A., Capaldi R. A., Ackrell B. A. C., Kearney E. B., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1393—1400.
259. Ludwig B., Downer N. W., Capaldi R. A., (1979), *Biochemistry*, **18**, 1401—1407.
260. Hinnen R., Schäfer R., Franklin R. M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **50**, 1—14.
261. Tinberg H. M., Packer L., (1979), *Methods Enzymol.*, **56**, 613—622.
262. Edwards R. M., Kempson S. A., Carlson G. L., Dousa T. P., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **553**, 54—65.
263. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **58**, 775—781.
264. Bretscher M. S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **59**, 351—357.
265. Arrotti J. J., Garvin J. E., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 79—90.
266. Vidal R., Tarone G., Peroni F., Comoglio P. M., (1974), *FEBS Lett.*, **47**, 107—112.
267. Tarone G., Prat M., Comoglio P. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 214—221.
268. Arrotti J. J., Garvin J. E., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 205—211.
269. Whiteley N. M., Berg H. C., (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 541—561.
270. Rifkin D. B., Compans R. W., Reich E., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6432—6437.
271. Hunt R. C., Brown J. C., (1974), *Biochemistry*, **13**, 22—28.
272. Abbott R. E., Schachtel D., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7176—7183.
273. Batt E. R., Abbott R. E., Schachtel D., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7184—7190.
274. Staros J. V., Haley B. E., Richards F. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5004—5007.
275. Staros J. V., Richards F. M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2720—2726.
276. Zisapel N., Littauer U. Z., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **512**, 156—162.
277. Henderson R., Jubb J. S., Whytock S., (1978), *J. Mol. Biol.*, **123**, 259—274.
278. Etémadi A.-H., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 347—422.
279. De Martinez N. R., Olavarria J. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 301—319.
280. Gottschalk A., (1958), *Advan. Enzymol.*, **20**, 135—146.
281. Desnuelle P., (1960), w: *The Enzymes*, wyd. 2, red. Boyer P. D., Lardy H.,

- Myrbäck K., t. 4, str. 93—111, Academic Press, New York.
282. Kunitz M., (1938), *J. Gen. Physiol.*, **22**, 207—222.
283. Millie L. B., Enenkel A. G., Kay C. M., (1966), *J. Biol. Chem.*, 2097—2109.
284. Charles M., Rovey M., Guidoni A., Desnuelle P., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 115—131.
285. Hermodson M. A., Ericsson L. H., Neurath H., Walsh K. A., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3146—3159.
286. Banga J., (1952), *Acta Physiol. Acad. Sci. (Hungary)*, **3**, 317—327.
287. Hartley B. S., Naughton M. A., Sanger F., (1959), *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 243—256.
288. Güntelberg A. V., Ottesen M., (1954), *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **29**, 36—54.
289. Matsubara H., Hagihara B., Nakai M., Kemiaki Y., Yonetani T., Okunuki K., (1958), *J. Biochem. (Tokyo)*, **45**, 251—273.
290. Ottesen M., Svendsen I., (1970), *Methods Enzymol.*, **19**, 199—215.
291. Ebeling W., Hennrich N., Klockow M., Metz H., Orth H. D., Lang H., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 91—100.
292. Morihara K., Tsuzuki H., (1975), *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1489—1497.
293. Kraus E., Kiltz H. H., Fembert U. F., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 233—251.
294. Balls A. K., Lineweaver H., Thompson R. R., (1937), *Science*, **86**, 379—346.
295. Drenth J., Jansonius J. N., Koekoek R., Swan H. M., Wolthers B. G., (1968), *Nature (London)*, **218**, 929—937.
296. Sluyterman L. A. E., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 305—315.
297. Smith E. L., Kimmel J. R., (1960), w: *The Enzymes*, wyd. 2, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., t. 4, str. 133—146, Academic Press, New York.
298. Johansen J. T., Ottesen M., (1968), *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **36**, 265—278.
299. Stenesh J. J., Winnick T., (1960), *Biochem. J.*, **77**, 575—584.
300. Morihara K., Tsuzuki H., Oka T., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 572—580.
301. Hiramatsu A., (1967), *J. Biochem. (Tokyo)*, **62**, 353—361.
302. Johansson K. E., Hjertén S., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 341—348.
303. Salton M. R. J., Owen P., (1976), *Annu. Rev. Microbiol.*, **30**, 451—482.
304. Brandtzaeg P., (1973), *Scand. J. Immunol.*, **2**, 273—290.
305. Cerba J. A., Goldstein G. J., (1965), *J. Immunol.*, **95**, 230—245.
306. Davis W. C., (1974), *Methods Enzymol.*, **32**, 60—70.
307. Singer S. J., Schick A. F., (1961), *J. Biochem. Biophys. Cytol.*, **9**, 519—537.
308. Singer S. J., (1959), *Nature*, **183**, 1523—1524.
309. Gyenes L., Sehon A. H., (1964), *Immunochemistry*, **1**, 43—48.
310. Kraehenbuhl J. P., Racine L., Jamieson J. D., (1977), *J. Cell Biol.*, **72**, 406—423.
311. Hoare R. J., Harrison P. M., Hoy T. G., (1975), *Nature*, **255**, 653—654.
312. Fernandez-Moran H., Van Bruggen E. F. J., Ohtsuki M., (1966), *J. Mol. Biol.*, **16**, 191—207.
313. Karnovsky M. J., Unanue E. R., Levinthal M., (1972), *J. Exp. Med.*, **136**, 907—930.
314. Haimovich J., Sela M., (1969), *Science*, **164**, 1279—1280.
315. Hämmerling U., Stackpole C. W., Koo G., (1973), *Methods Cancer Res.*, **9**, 255—282.

316. Molday R. S., Dreyer W. J., Rembaum A., Yen S. P. S., (1975), *J. Cell Biol.*, **64**, 75—88.
317. Fuchs H., Bächli T., (1975), *J. Ultrastruct. Res.*, **52**, 114—119.
318. Jan L. Y., Revel J. P., (1975), *J. Supramol. Struct.*, **3**, 61—66.
319. Avrameas S., (1970), *Int. Rev. Cytol.*, **27**, 349—385.
320. Avrameas S., Taudou B., Ternynck T., (1971), *Int. Arch. Allergy*, **40**, 161—170.
321. Ternynck T., Avrameas S., (1976), *Ann. Immunol. (Paris)*, **127**, 197—208.
322. Nakane P. K., Kawaoi A., (1974), *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084—1091.
323. Avrameas S., Hosli P., Stanislawski M., Rodrigot M., Vogt E., (1979), *J. Immunol.*, **122**, 648—659.
324. De Duve C., (1973), *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 941—948.
325. McGroarty E., Tolbert N. E., (1973), *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 949—954.
326. Mühler M., (1975), *Annu. Rev. Microbiol.*, **29**, 467—483.
327. Binz H., Bächli T., Wigzell H., Ramseier H., Lindemann J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3210—3214.
328. Gonatas N. K., Gonatas J. O., Stieber A., Antoine J. C., Avrameas S., (1975), *J. Cell Biol.*, **70**, 477—493.
329. Porter C. W., Bernacki R. J., (1975), *Nature*, **256**, 648—650.
330. Higgins J. A., (1976), *J. Cell Sci.*, **22**, 173—197.
331. Renooij W., Van Golde L. M. G., Zwaal R. F. A., Roelofsen B., Van Deenen L. L. M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 287—292.
332. Allan D., Thomas P., Michell R. H., (1978), *Nature*, **276**, 289—290.
333. Hirata F., Axelrod J., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2348—2352.
334. Crews F. T., Hirata F., Axelrod J., (1980), *Neurochem. Res.*, **5**, 983—991.
335. Freysz L., Harth S., Dreyfus H., (1982), *J. Neurochem.*, **38**, 582—587.
336. Dominski J., Binaglia L., Porcellati G., Freysz L., (1982), *FEBS Lett.*, **147**, 153—155.
337. Hülsmann W. C., Kupershoek-Davidov R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 288—300.
338. Piękła S., Szymańska G., Sarzała M. G., (1983), praca w przygotowaniu.
339. Rock C. O., Fitzgerald V., Snyder F., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 172—177.
340. Rock C. O., Fitzgerald V., Snyder F., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6363—6366.
341. Giacobino J. P., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **202**, 101—105.
342. Corazzi L., Binaglia L., Roberti R., Freysz L., Arienti G., Porcellati G., (1983), *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 104—110.
343. Trugnan G., Bereziat G., Manier M. C., Polonovski J., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 61—72.
344. Franson R. C., Pang D. C., Towle D. W., Weglicki W. B., (1978), *J. Molec. Cell. Cardiol.*, **10**, 921—930.
345. Nachbaur J., Colbeau A., Vignais P. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **274**, 426—435.
346. Zwaal R. F. A., Flückiger R., Moser S., Zahler P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **373**, 416—424.
347. De Jong J. G. N., Van den Bosch H., Rijken D., Van Deenen L. L. M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 50—63.

348. Van den Bosch H., De Jong J. G. N., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 244—257.
349. Moonen H., Van den Bosch H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **575**, 174—182.
350. Moonen J. H. E., Van den Bosch H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **573**, 114—125.
351. Jambdar S. C., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 81—94.
352. Marinetti G. V., Cattieu K., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 245—248.
353. Hesketh T. R., Smith G. A., Houslay M. D., McGill K. A., Bird-sall N. J. M., Metcalfe J. C., Warren G. B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4145—4151.
354. Hidalgo C., Ikemoto N., Gergely J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4224—4232.
355. Nakamura H., Jilka R. L., Boland R., Martonosi A. N., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5414—5423.
356. Bennet J. P., McGill K. A., Warren G. B., (1978), *Nature*, **274**, 823—825.
357. Bisson R., Montecucco C., Gutweniger H., Azzi A., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9962—9965.
358. Strittmatter W. J., Hirata F., Axelrod J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 147—153.
359. Bennett J. P., McGill K. A., Warren G. B., (1980), *Current Topics in Membrane and Transport*, **14**, 127—164.
360. Niggli V., Adunyah E. S., Carafoli E., (1981), *J. Biol. Chem.*, **256**, 8588—8597.
361. Bevers E. M., Comfurius P., Van Rijn J. L. M. L., Hemker H. C., Zwaal R. F. A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 429—436.
362. Casey R. P., Ariano B. H., Azzi A., (1982), *Eur. J. Biochem.*, **122**, 313—318.
363. Cercek B., Houslay M. D., (1982), *Biochem. J.*, **207**, 123—132.
364. Crain R. C., Zilversmit D. B., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 46—47.
365. Zwaal R. F. A., Comfurius P., Van Deenen L. L. M., (1977), *Nature*, **268**, 358—360.
366. Hedbon G. M., Levine III H., Sahyoun N. E., Schmitges C. J., Cuatrecasas P., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 41—42.
367. Krebs J. J. R., (1982), *J. Bioenerg. Biomemb.*, **14**, 141—157.
368. Lentz B. R., Moore B. M., Kirkman C., Meissner G., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 30—32.
369. Poore V. M., Ragan C. I., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **693**, 105—112.
370. Robinson N. C., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 65—66.
371. Smith V. L., Brent L. G., Shabbot M. S., Thompson R. E., (1982), *Biophys. J.*, **37**, 42—44.
372. Zwaal R. F. A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 163—205.
373. Sharon N., (1979), w: *Structure and Function of Biomembranes*, red. Yagi K., str. 63—82, Plenum Press, New York.

EWA ZIĘTKIEWICZ ^{*)}, RYSZARD SŁOMSKI ^{**)}

Zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji o znaczeniu biologicznym do komórek

Liposomes as Carriers in the Transfer of Substances of Biological Importance into Cells

Spis treści

- I. Wprowadzenie**
- II. Ogólna charakterystyka liposomów**
 - II-1. Klasyfikacja i budowa liposomów**
 - II-2. Podstawy teoretyczne i sposoby tworzenia liposomów**
 - II-3. Szczelność liposomów**
 - II-4. Efektywność zamykania substancji w liposomach**
- III. Wprowadzanie substancji do komórek przy użyciu liposomów**
 - III-1. Mechanizmy pobierania liposomów przez komórki**
 - III-2. Efektywność pobierania liposomów przez komórki**
 - III-3. Cytotoksyczność liposomów**
 - III-4. Praktyczne zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji do komórek**
 - III-4.1. Badania *in vivo***
 - III-4.2. Badania *in vitro***

Contents

- I. Introduction**
- II. General description of liposomes**
 - II-1. Classification and structure of liposomes**
 - II-2. Theoretical basis and methods of liposome formation**
 - II-3. Tightness of liposomes**
 - II-4. Efficiency of substance entrappment in liposomes**
- III. Insertion of substances into cells by the use of liposomes**
 - III-1. Mechanisms of liposome uptake by cells**
 - III-2. Efficiency of liposome uptake by cells**
 - III-3. Cytotoxicity of liposomes**
 - III-4. Application of liposomes in the transfer of substances into cells**
 - III-4.1. Studies *in vivo***
 - III-4.2. Studies *in vitro***

^{*)} Mgr, ^{**)} Doc. dr hab., Zakład Genetyki Człowieka w Poznaniu ul. Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań

Autorzy uczestniczą w realizacji problemu 09.7 koordynowanego przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

Wykaz stosowanych skrótów:

LUV — duży jednowarstwowy pęcherzyk fosfolipidowy, MLV — wielowarstwowy pęcherzyk fosfolipidowy, SUV — mały jednowarstwowy pęcherzyk fosfolipidowy, T_f — temperatura przejścia fazowego fosfolipidów, CF — karboksylfluoresceina, DCP — fosforan dwucetylu, DPPC — dwupalmitylofosfatydylocholina, DSPC — dwustearylofosfatydylocholina, PA — kwas fosfatydowy, PC — fosfatydylocholina, PI — fosfatydyloinozytol, PS — fosfatydyloseryna, SA — stearyloamina

I. Wprowadzenie

W ciągu minionych 15 lat wiele uwagi poświęcono właściwościom i zastosowaniom sztucznie wytwarzanych, jedno- lub wielowarstwowych pęcherzyków fosfolipidowych — liposomów. W początkowym okresie badań liposomy traktowano niemal wyłącznie jako doskonały model błony biologicznej zamykającej przestrzeń wypełnioną wodnym roztworem soli. Badania koncentrowały się na takich właściwościach liposomów, jak molekularna organizacja, płynność, przepuszczalność i inne fizyko-chemiczne cechy błon liposomalnych (1—7). Od początku lat 70-tych powszechne stały się doświadczenia z zamykaniem w liposomach wodnych roztworów substancji o znaczeniu biologicznym. Następnym etapem było użycie liposomów do wprowadzania zamkniętych w nich substancji do komórek — początkowo *in vivo*, później również *in vitro*. W piśmiennictwie zagranicznym ukazały się liczne artykuły przeglądowe oraz publikacje książkowe dotyczące mechanizmów oddziaływania fosfolipidowych pęcherzyków z komórkami oraz praktycznego zastosowania liposomów w biologii i medycynie (8—19).

Artykuł niniejszy, będąc przeglądem prac dotyczących wykorzystania liposomów do przenoszenia substancji do komórek, jakkolwiek nie wyczerpuje tego zagadnienia, pozwala zorientować się w zakresie i charakterze prowadzonych badań.

II. Ogólna charakterystyka liposomów

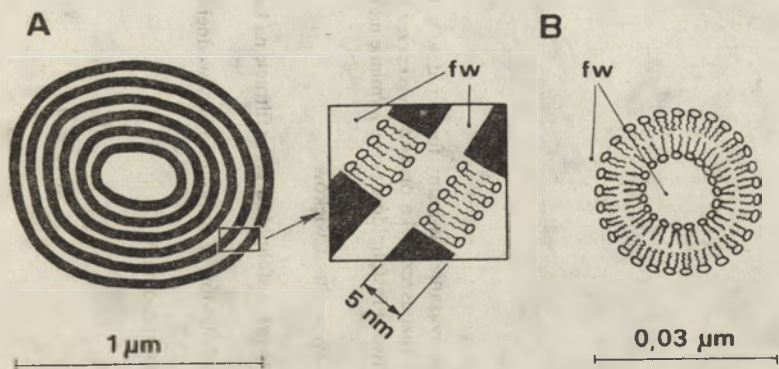
II-1. Klasyfikacja i budowa liposomów

Zgodnie z ogólnie przyjętą klasyfikacją rozróżnia się trzy typy liposomów:

— MLV (z ang. *multilamellar vesicles*) — wielowarstwowe pęcherzyki zbudowane z koncentrycznie ułożonych błon — dwuwarstw fosfolipidowych — oddzielonych od siebie przedziałami wodnymi (Ryc. 1A); liposomy tego typu charakteryzują się dużą rozpiętością wymiarów — ich średnica zewnętrzna wynosi od kilkuset do kilku tysięcy nanometrów (7, 20—22),

— SUV (z ang. *small unilamellar vesicles*) — jednowarstwowe pęcherzyki o średnicy 20—20 nm (23—26), zbudowane z dwuwarstwy fosfolipidowej otaczającej zamkniętą przestrzeń wodną (Ryc. 1B),

— LUV (z ang. *large unilamellar vesicles*) — pęcherzyki typu SUV, których średnica — zależnie od sposobu przygotowywania liposomów — może wynosić od 100 do 2400 nm (27—33), a nawet 9000 nm (34).



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie budowy liposomów: A) MLV, B) SUV, fw — faza wodna

Oprócz fosfolipidów stanowiących strukturalny zrąb błony liposomalnej, w jej skład mogą wchodzić również inne substancje o charakterze hydrofobowym (np. sterole) lub amfipatycznym (np. niektóre białka). W praktyce najczęściej stosowanymi składnikami błon liposomalnych są: fosfolipidy naturalne — fosfatydylocholina (PC), fosfatydyloseryna (PS), fosfatydyloinozytol (PI) oraz syntetyczne — dwupalmitylofosfatydylocholina (DPPC) i dwustearylofosfatydylocholina (DSPC). Częstość dodatkiem jest cholesterol, którego zawartość w błonie liposomalnej może dochodzić do 50%. PC używana jest często w mieszaninie z lipidami obdarzonymi wypadkowym ładunkiem elektrycznym; źródłem ładunku dodatniego jest zazwyczaj stearyloamina (SA), zaś ujemnego — kwas fosfatydowy (PA) lub fosforan dwucetylu (DCP).

II-2. Podstawy teoretyczne i sposoby tworzenia liposomów

Fosfolipidy wprowadzone do roztworu wodnego, po osiągnięciu stanu równowagi z fazą wodną, tworzą złożone układy określone jako uwodnione ciekłe kryształy fosfolipidowe. W układach takich błony, zbudowane z dwóch warstw fosfolipidów, są oddzielone od siebie warstwami fazy wodnej (20). Hydrofobowe łańcuchy acylowe fosfolipidów są skierowane

Tabela 1

Zestawienie najczęściej stosowanych metod przygotowywania liposomów

Liposomy	Charakterystyka	Metody przygotowywania liposomów	Piśmiennictwo
MLV	wielowarstwowość, stosunkowo mała objętość wewnętrznej fazy wodnej	— wytrząsanie — dializa	7, 20, 21
SUV	duże zakrzywienie powierzchni, mała objętość wewnętrznej fazy wodnej	— sonifikacja — filtracja żelowa — wstrzyknięcie etanolu — prasa francuska	22 23 24 25 26

c.d. tabeli I

LUV	bardzo duża objętość wewnętrznej fazy wodnej	— dializa	usunięcie detergentu z roztworu fosfolipidów przez wymianę na bufor wodny	22
		— filtracja żelowa	usunięcie detergentu z roztworu fosfolipidów przez filtrację na kolumnie z żelu Sephadex	29
		— wstrzyknięcie eteru	wstrzyknięcie roztworu fosfolipidów w eterze do fazy wodnej w temp. 60 C (odparowanie eteru)	30, 31
		— fuzja SUV	indukowana jonami wapnia fuzja SUV (etap pośredni — tzw. spiralne cylindry) i wytworzenie LUV przez usunięcie jonów wapnia przez EDTA	32
		— wytrząsanie i odparowanie	wytrząsanie mieszaniny roztworu fosfolipidów w rozpuszczalniku ograniczonym i fazy wodnej (wytworzenie emulsji chloroformu w wodzie) i odparowanie fazy organicznej; liposomy o średnicy 9 μm	34
		— filtracja pod ciśnieniem	wytrząsanie mieszaniny fosfolipidów i fazy wodnej i przecisnięcie uzyskanej zawiesiny przez filtry poliwęglanowe	35
		— odparowanie rozpuszczalnika organicznego	krótka sonifikacja mieszaniny roztworu fosfolipidów w rozpuszczalniku organicznym i fazy wodnej oraz odparowanie fazy organicznej pod zmniejszonym ciśnieniem	40
		— zamrażanie i sonifikacja	gwałtowne zamrażanie sonifikowanej zawiesiny fosfolipidów w fazie wodnej, rozmrożenie i powtórna sonifikacja	41

do środka dwuwarstwy i związane międzycząsteczkowymi siłami van der Waalsa, natomiast polarne, hydrofilowe fragmenty cząsteczek są wyeksponowane w kierunku środowiska wodnego, w którym ulegają dysocjacji i hydratacji. Formowanie uwodnionych ciekłych kryształów fosfolipidowych zachodzi w temperaturze wyższej od temperatury przejścia fazowego fosfolipidów (T_i), tj. wtedy, gdy łańcuchy acylowe fosfolipidów znajdują się w stanie płynnym i charakteryzują się dużą ruchliwością termiczną (35). T_i poszczególnych fosfolipidów jest tym wyższa, im dłuższe są łańcuchy acylowe i im mniejsza jest liczba wiązań nienasyconych w tych łańcuchach.

Wielkość i kształt uwodnionych ciekłych kryształów zależy od rodzaju użytych fosfolipidów oraz od siły jonowej i pH środowiska wodnego (36, 37). Odległość pomiędzy błonami fosfolipidowymi w omawianych układach wynika z równowagi pomiędzy siłami van der Waalsa przyciągającymi sąsiadujące dwuwarstwy fosfolipidowe, a siłami odpychania wynikającymi z hydratacji polarnych grup fosfolipidów i z ich wypadkowego ładunku elektrycznego (38). Wypadkowy ładunek elektryczny wynika ze stopnia dysocjacji polarnych fragmentów cząsteczek, zależnego od pH środowiska wodnego; wysoka siła jonowa fazy wodnej może powodować maskowanie elektrycznych ładunków fosfolipidów. Proporcjonalnie do ilości ładunków elektrycznych jednakowego znaku wnoszonych przez fosfolipidy, odległość pomiędzy sąsiadującymi błonami rośnie, a tym samym zwiększa się objętość fazy wodnej otoczonej fosfolipidowymi dwuwarstwami. Wielkość uwodnionych ciekłych kryształów fosfolipidowych zależy także od sposobu rozpraszania fosfolipidów w fazie wodnej; bodźce mechaniczne, jak wytrząsanie lub sonifikacja zawiesiny fosfolipidów w roztworze wodnym, powodują fragmentację większych struktur (39). Jedną z form uwodnionych ciekłych kryształów fosfolipidowych są liposomy — jedno- lub wielowarstwowe pęcherzyki, w których przedziały wodne otoczone dwuwarstwami fosfolipidowymi są całkowicie zamknięte i odizolowane od reszty fazy wodnej. Najczęściej stosowane metody przygotowywania liposomów podano w Tabeli 1 (7, 20—26, 29—34, 40, 41).

Podczas powstawania liposomów część fazy wodnej zostaje zamknięta we wnętrzu pęcherzyków. Nawet tak duże struktury, jak jądra komórkowe (42) lub komórki bakteryjne (34) można przy użyciu odpowiednich metod zamknąć wewnątrz liposomów.

O zamknięciu substancji wewnątrz pęcherzyków można mówić jeśli spełnione są następujące kryteria:

- zawartość substancji wzrasta proporcjonalnie wraz ze wzrostem objętości fazy wodnej (43),

- aktywności biologicznej substancji zamkniętej nie można wykazać (latencja) bez zniszczenia struktury liposomu np. działając detergentem (27, 43—45),

— substancja nie przenika do wnętrza uformowanych już liposomów (27, 43—45).

W wielu przypadkach niezbędne jest oddzielenie liposomów wraz z zamkniętą w nich substancją od tej jej części, która nie uległa zamknięciu. Najczęściej stosowane w tym celu metody, to wirowanie (47, 48), dializa (20, 49) lub filtracja na kolumnach z żelów Sephadex (50, 51) lub Sepharose (23, 27, 44, 46, 52, 53). W przypadku, gdy liposomy mają być oddzielone od substancji wysokocząsteczkowych, jak białka, DNA lub RNA, należy przed wirowaniem, dializą lub filtracją żelową przeprowadzić enzymatyczne trawienie preparatu (27, 44, 45, 52). Celem oddzielenia liposomów od niezamkniętego w nich DNA lub innych makrocząsteczek, można też stosować flotację w nieciągłych gradientach polimerów, jak np. Ficoll (28).

Omawiane zamykanie substancji w liposomach odnosi się do związków hydrofilowych, rozpuszczonych w fazie wodnej. Jeżeli natomiast substancja wbudowywana w liposom ma charakter hydrofobowy, to jej cząsteczki ulegają wbudowaniu w strukturę lipidową liposomu i stają się elementami błony liposomalnej.

II-3. Szczelność liposomów

Szczelność liposomów jest największa w temperaturach poniżej T_i tworzących je fosfolipidów; jest to wynikiem ograniczenia ruchliwości łańcuchów acylowych fosfolipidów i tym samym zmniejszenia płynności błony. Pęcherzyki utworzone z fosfolipidów o długich łańcuchach acylowych z małą liczbą wiązań nienasyconych (czyli o wysokiej T_i) zachowują szczelność w szerszym zakresie temperatur, niż liposomy utworzone z fosfolipidów o krótkich łańcuchach i dużej liczbie wiązań nienasyconych (54—56). Znaczny wzrost szczelności liposomów można uzyskać przez włączenie w skład błon liposomalnych cholesterolu (55—62), który polepsza zwartość upakowania elementów tworzących błonę liposomalną. Przepuszczalność liposomów dla substancji posiadających określony ładunek elektryczny można zmniejszyć przez wbudowanie w błonę liposomalną lipidów obdarzonych ładunkiem o takim samym znaku (10).

Na ogół możliwe jest przechowywanie liposomów w temperaturze 4°C przez okres kilku dni (25), a nawet tygodni (63) bez istotnego wzrostu przepuszczalności błon liposomalnych, jak i bez wpływu na właściwości zamkniętych w liposomach substancji. Duże wahania temperatury, np. gwałtowne zamrażanie liposomów, powodują uszkodzenie błony pęcherzyków i wyciekanie ich zawartości (64).

Szczelność liposomów ulega obniżeniu pod wpływem działania surowicy krwi. W temperaturze zbliżonej do T_i dochodzi do wiązania lipo-

somalnej PC do wchodzących w skład surowicy lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL — *high density lipoproteins*) (17, 59, 60, 65, 66). Proces przechodzenia PC z błony liposomu na HDL jest jednokierunkowy, czego skutkiem jest znaczny wzrost przepuszczalności błony liposomu (17). Zmniejszenie szczelności błony w obecności surowicy może być również wynikiem oddziaływania liposomu z albuminą (66, 67) lub globulinami (68, 69).

II-4. Efektywność zamykania substancji w liposomach

Efektywność zamykania substancji w liposomach wyrażana jest za pomocą procentu określającego stosunek ilości substancji zamkniętej do podanej. Porównywanie tak określonych efektywności zamykania wymaga uwzględnienia stosunku ilości lipidów do objętości fazy wodnej podczas formowania liposomów (11). Efektywność zamykania substancji w liposomach jest znacznie wyższa w przypadku liposomów LUV i MLV niż SUV (40). Wynika to stąd, że stosunek objętości fazy wodnej pęcherzyka do ilości lipidów tworzących błonę liposomalną jest znacznie większy w przypadku LUV i MLV niż SUV (40).

Istotny wpływ na efektywność zamykania substancji w liposomach wywierają ładunki elektryczne cząsteczek. Zwiększenie objętości przedziału wodnego liposomów przez włączenie w skład ich błony fosfolipidów obdarzonych ładunkiem elektrycznym, powoduje wzrost ilości substancji zamykanej w pęcherzykach. Zależność ta obserwowana jest do momentu osiągnięcia 10% (70) lub 20% (50, 51) zawartości naładowanych fosfolipidów w błonie. Zamykanie substancji obdarzonych ładunkiem elektrycznym jest najefektywniejsze, gdy błona liposomu posiada wypadkowy ładunek elektryczny o przeciwnym znaku (71).

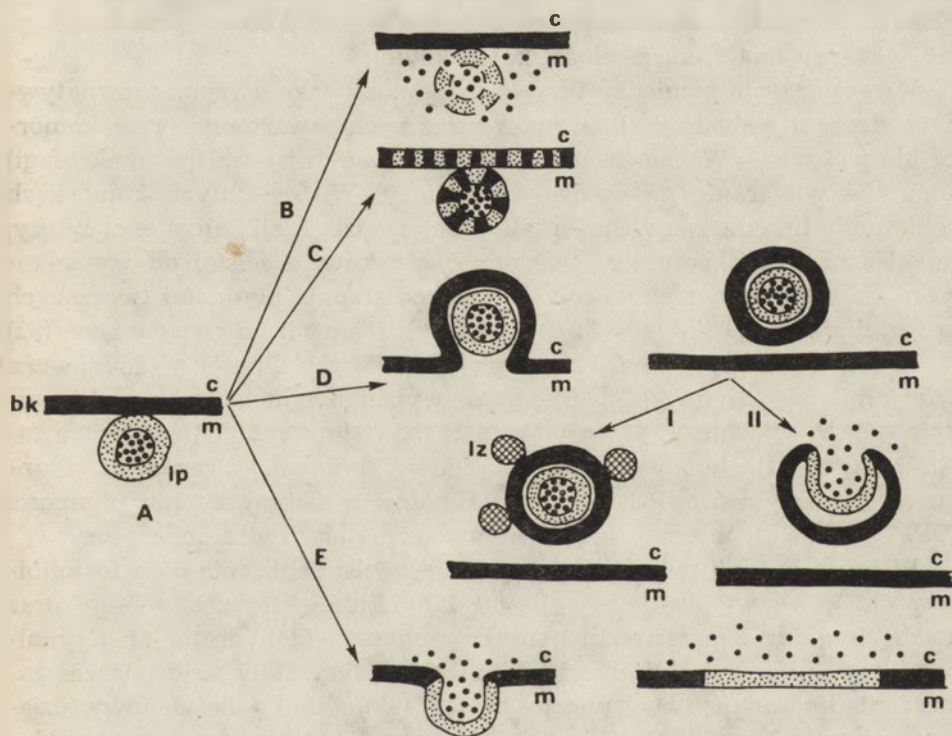
Efektywność zamykania DNA w liposomach zależy od wielkości cząsteczek DNA i zmniejsza się wraz ze wzrostem wymiarów DNA powyżej 10⁶ daltonów (45). Sugerowana jest możliwość zwiększenia efektywności zamykania dużych cząsteczek DNA przez uprzednią kondensację DNA przy użyciu histonów lub związków polikationowych (45).

III. Wprowadzanie substancji do komórek przy użyciu liposomów

III-1. Mechanizmy pobierania liposomów przez komórki

Wprowadzanie zamkniętych w liposomach substancji do komórek jest procesem bardzo złożonym. Pierwszym etapem oddziaływania liposomów z komórkami jest adsorpcja pęcherzyków na błonie komórkowej (16, 72,

73) (Ryc. 2A), nie zawsze prowadząca do pobrania liposomów przez komórkę. Znaczna część zaadsorbowanych liposomów traci szczelność (m.in. na skutek podwyższonej temperatury, zmienionego pH, obecności surowicy oraz kontaktu z błoną komórkową), przez co zawartość ich przedziału wodnego wycieka do medium inkubacyjnego (61, 62, 72, 74—76). Powoduje to powstanie w bezpośrednim sąsiedztwie komórek wysokiego stężenia substancji przenoszonej przez liposomy (Ryc. 2B), a tym samym zwiększenie możliwości ewentualnego jej pobierania przez komórki bez udziału liposomów, np. na drodze dyfuzji lub aktywnego transportu (74). Dość powszechnym zjawiskiem jest wymiana fosfolipidów pomiędzy błoną komórkową a błoną zaadsorbowanych na niej liposomów (Ryc. 2C); wymiana ta nie jest jednoznaczna z przechodzeniem zawartości wodnego przedziału liposomów do wnętrza komórki (77—79).



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie możliwych interakcji liposom—komórka: A) Adsorpcja, B) Wyciekanie, C) Wymiana lipidów, D) Endocytoza, D-I) Fuzja pęcherzyka endocytotycznego z lizosomami pierwszorzędowymi, D-II) Fuzja pęcherzyka endocytotycznego z liposomem, E) Fuzja, c — cytoplazma, m — medium inkubacyjne, lp — liposom, bk — błona komórkowa, lz — lizosom pierwszorzędowy.

Właściwe pobieranie liposomów wraz z ich zawartością przez komórki jest wynikiem dwóch często uzupełniających się procesów — fuzji liposomów z błoną komórkową i endocytozy (16). W procesie endocytozy

(Ryc. 2D) nienaruszone liposomy ulegają pobraniu przez komórkę w wyniku wpuklania błony komórkowej i oderwania się wytworzonego pęcherzyka. W cytoplazmie następuje połączenie pęcherzyka endocytotycznego z komórkowymi lizosomami pierwszorzędowymi (Ryc. 2D-I) i wytworzenie lizosomu drugorzędowego, w którym odbywa się enzymatyczne trawienie zawartości pęcherzyka. W przypadku zahamowania aktywności enzymów lizosomalnych (np. w wyniku potraktowania komórek chlorochinonem lub NH_4Cl), może dojść — jak sugerują Fraley i współautorzy (62) — do fuzji błony liposomu z otaczającym go pęcherzykiem endocytotycznym i wydostania się zawartości liposomu do cytoplazmy (Ryc. 2D-II). W przypadku fuzji z błoną komórkową (Ryc. 2E) zawartość liposomu zostaje uwolniona bezpośrednio do cytoplazmy, z pominięciem systemu lizosomalnego. Błona liposomalna zostaje jednocześnie wbudowana w błonę komórkową, co stwarza możliwość użycia liposomów nie tylko do przenoszenia zamkniętych w nich substancji do wnętrza komórki, ale także do modyfikacji błony komórkowej.

Rozgraniczenie pomiędzy fuzją i endocytozą, jako dwiema alternatywnymi drogami pobierania liposomów wraz z ich zawartością przez komórki, nie jest ściśle. W komórkach aktywnie fagocytykujących (np. makrofagi) dominuje pobieranie na drodze endocytozy. W pozostałych komórkach pobieranie liposomów zachodzi albo na drodze fuzji, albo endocytozy, w zależności od składu lipidowego pęcherzyków, a ściślej od wypadkowego ładunku powierzchniowego błony i od stopnia płynności tworzących ją fosfolipidów (51, 78, 80—82). Poste i Papahadjopoulos (82) wykazali, że w hodowlach komórek zwierzęcych liposomy zbudowane z fosfolipidów „płynnych” o ujemnym wypadkowym ładunku elektrycznym (np. PS) pobierane są w większości (co najmniej 60%) na drodze fuzji. Pozostałe, tj. zbudowane z fosfolipidów „płynnych” o zerowym ładunku wypadkowym (np. PC) lub z fosfolipidów o małym stopniu płynności (DPPC, DSPC), pobierane są prawie wyłącznie na drodze endocytozy.

W procesie fuzji pierwszym etapem jest ściśle zbliżenie błon fosfolipidowych, które wymaga neutralizacji ładunku elektrycznego błon, oraz usunięcia wody z przestrzeni pomiędzy błonami (dehydratacja). Czynniki powodującymi zbliżenie błon mogą być: kryształy lodu podczas zamarzania liposomów (mechaniczny nacisk) (83), glikol polietylenowy (działanie odwadniające) (83—85) lub jony metali dwuwartościowych (86—89) — Mg^{2+} (neutralizacja ujemnego ładunku powierzchniowego błon) i Ca^{2+} (neutralizacja ładunku oraz wytworzenie bezwodnych kompleksów z polarnymi grupami fosfolipidów). Stopień dehydratacji przestrzeni pomiędzy błonami zależy zarówno od składu fosfolipidowego błon (90) jak i od obecności czynników odwadniających. Niezdolność jonów magnezu do tworzenia bezwodnych kompleksów z fosfolipidami sprawia, że Mg^{2+} powoduje jedynie agregację pęcherzyków, a nie ich fuzję; Mg^{2+} może natomiast wspomagać działanie Ca^{2+} , obniżając jego progowe stężenie

konieczne do wywołania fuzji (87, 89, 90). Sama dehydratacja przestrzeni pomiędzy przylegającymi błonami, jakkolwiek konieczna (89, 90), nie jest wystarczająca do wywołania fuzji; dlatego nie wszystkie związki o działaniu odwadniającym powodują fuzję liposomów (83). Kolejnym, koniecznym warunkiem wystąpienia fuzji jest przejściowa destabilizacja dwuwarstwowej organizacji przylegających do siebie błon fosfolipidowych, pozwalająca na wymieszanie składników tych błon (83, 86). Według P a h a d j o p o u l o s a i współautorów (86), wytworzenie bezwodnych kompleksów Ca^{2+} z ujemnie naładowanymi fosfolipidami prowadzi do krystalizacji fosfolipidów, tj. do przejścia ich łańcuchów acylowych ze stanu ciekłego w krystaliczny. Podczas procesu krystalizacji zachodzi grupowanie fosfolipidów w błonie w obszary ciekłe i krystaliczne, na granicy których występuje przejściowa destabilizacja dwuwarstwy fosfolipidowej prowadząca do fuzji. Grupowanie fosfolipidów w obszary ciekłe i krystaliczne występuje m.in. w błonach zbudowanych z PS, natomiast w błonach zawierających 50% lub więcej PC, zjawisko takie nie zachodzi; tłumaczy to różnice w zdolności liposomów zbudowanych z tych fosfolipidów do fuzji.

Dodatkowym czynnikiem ułatwiającym fuzję jest duża krzywizna powierzchni błon fosfolipidowych, w przypadku której występuje zmniejszona regularność upakowania lipidów w błonie, co zwiększa prawdopodobieństwo destabilizacji dwuwarstwy fosfolipidowej (89).

III-2. Efektywność pobierania liposomów przez komórki

Metody stosowane w celu stwierdzenia pobrania liposomów przez komórki polegają na identyfikacji w komórkach lub ich ekstraktach składników liposomalnych: lipidowych — pochodzących z błony liposomu, lub rozpuszczalnych — uprzednio zamkniętych w przedziale wodnym pęcherzyka. Włączenie w skład liposomu substancji lipidowych lub rozpuszczalnych znakowanych izotopami pozwala na autoradiograficzne wykrycie ich w komórkach, które pobrały liposomy lub zaadsorbowały je na swojej powierzchni (15, 16). Zamknięcie w liposomach lub wbudowanie w ich błonę substancji biologicznie czynnych, których aktywność ujawnia się dopiero w obrębie komórki (np. enzymy, kwasy nukleinowe), umożliwia odróżnienie rzeczywistego pobierania liposomów od adsorpcji pęcherzyków na błonie komórkowej. Użycie zamkniętej w przedziale wodnym pęcherzyków karboksyfluoresceiny (CF), pozwala nie tylko na stwierdzenie pobierania liposomów, ale również na określenie drogi ich wprowadzania do komórki (76, 91). Fluorescencja CF, ulegająca samowygaszeniu w wysokich stężeniach tego barwnika, ujawnia się natychmiast po rozcieńczeniu zawartości liposomów w cytoplazmie komórki, która pobrała je na drodze fuzji; w przypadku pobrania liposomów na drodze endocytozy, ujawnienie się

fluorescencji barwnika zależy od szybkości wyciekania stężonej CF z pęcherzyków endocytotycznych (lub lizosomów) do cytoplazmy.

Rozbieżności, jakie mogą wystąpić pomiędzy danymi dotyczącymi efektywności pobierania przez komórki składników lipidowych i składników rozpuszczalnych liposomów, są zwykle wynikiem nieszczelności pęcherzyków (75, 76) lub wymiany fosfolipidów pomiędzy liposomami a błoną komórkową (77—79).

Efektywność pobierania liposomów przez komórki zależy zarówno od rodzaju komórek i składu lipidowego liposomów jak i od warunków inkubacji wpływających na intensywność procesów fuzji i endocytozy. Jednym z istotnych czynników jest temperatura, której wzrost w granicach fizjologicznych stymuluje pobieranie liposomów zarówno na drodze fuzji jak i endocytozy (82). Obecność glikolu polietylenowego (22, 28, 92, 93) lub jonów wapnia (92) w medium inkubacyjnym powoduje zwiększenie efektywności pobierania liposomów na drodze fuzji. Krótkotrwała inkubacja komórek i liposomów z glicerolem wpływa na bardzo silny wzrost efektywności pobierania ujemnie naładowanych liposomów na drodze endocytozy (18, 28, 62, 94).

Etapem, który poprzedza zarówno fuzję jak i endocytozę, jest adsorpcja liposomów na powierzchni komórki (16). Efektywność pobierania liposomów wzrasta więc wraz z dostępnością powierzchni komórki (95), a także wraz z liczbą pęcherzyków przypadających na pojedynczą komórkę (28, 95). Powyżej określonej ilości liposomów w hodowli wzrost ten ustaje, co jest tłumaczone wysyceniem miejsc na powierzchni komórki, zdolnych do oddziaływania z liposomami (28, 62, 63, 94). Przy stałej ilości liposomów przypadających na jedną komórkę, efektywność pobierania substancji zamkniętej w pęcherzykach zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia tej substancji w liposomach (28, 63, 94).

Obecność surowicy zmniejsza pobieranie przez komórki zarówno zawartości przedziału wodnego liposomów (62, 98) jak i liposomalnych fosfolipidów (79, 97). Jest to wynikiem z jednej strony ograniczenia adsorpcji liposomów na powierzchni komórek (79, 97, 98), a z drugiej — zmniejszenia trwałości i szczelności liposomów (61, 74).

Użycie liposomów o dodatnim wypadkowym ładunku elektrycznym zwiększa niespecyficzną adsorpcję pęcherzyków na obdarzonej ujemnym ładunkiem powierzchni komórki (25, 73, 99, 100), lecz nie zawsze prowadzi do pobrania liposomów przez komórkę. Liposomy o ujemnym ładunku wypadkowym wykazują wysokie, lecz nie dające się wytłumaczyć oddziaływaniami elektrostatycznymi powinowactwo do błony komórkowej. Wynika ono prawdopodobnie z istnienia na powierzchni komórki miejsc wiązania ujemnie naładowanych liposomów (62, 95, 101, 102) i prowadzi do pobierania liposomów przez komórkę na drodze endocytozy (62).

Znaczne zwiększenie wydajności etapu wiązania liposomów z powierzchnią komórki można uzyskać przez modyfikację błony liposomalnej

związkami oddziaływującymi specyficznie ze składnikami błony komórkowej. Modyfikacje takie prowadzą zwykle nie tylko do wzrostu adsorpcji liposomów na powierzchni komórki, ale także do selektywnego wiązania pęcherzyków z wybranymi komórkami. Związki modyfikujące mogą być wbudowane w błonę liposomu, sprzęgane chemicznie z lipidami błony lub zaadsorbowane na zewnętrznej powierzchni liposomów. Do najczęściej stosowanych substancji wiążących się z błoną liposomalną należą immunoglobuliny (przeciwciała) (51, 72, 103—113). Zależnie od tego, jaki fragment immunoglobuliny jest wyeksponowany na zewnątrz błony liposomalnej, pęcherzyk może ulegać specyficznemu wiązaniu z komórką posiadającą na swej powierzchni antygeny — rozpoznawane przez przeciwciało (103—105), albo z komórką fagocytyującą (makrofagiem), posiadającą w błonie receptory dla immunoglobulin (50, 51, 106). Inne substancje stosowane do modyfikowania powierzchni liposomów, to glikozydy i glikoproteiny, za pośrednictwem których pęcherzyki ulegają wiązaniu z komórkami posiadającymi na swej powierzchni odpowiednie receptory (103, 110). Niezależnie od sposobu modyfikacji błony liposomalnej, zwiększona efektywność pobierania liposomów przez komórki występuje tylko wtedy, gdy pęcherzyki związane zostaną z powierzchnią komórek fagocytyujących (51, 72, 103, 106), nie jest natomiast obserwowana w przypadku komórek o małej aktywności endocytotycznej (104).

III-3. Cytotoksyczność liposomów

W większości doświadczeń z liposomami nie stwierdzono szkodliwego wpływu pęcherzyków na żywotność inkubowanych z nimi komórek. Cytotoksyczne działanie liposomów obserwowane bywa jedynie w przypadku stosowania dużego nadmiaru pęcherzyków przypadających na jedną komórkę (74) i zależy wprost proporcjonalnie od dostępności powierzchni komórek oraz do czasu inkubacji komórek z liposomami (95). Natężenie szkodliwego wpływu liposomów na komórki zależy też od składu lipidowego błony liposomalnej. Cytotoksyczność liposomów zwiększa się wraz ze wzrostem zawartości stearyloaminy w błonie liposomalnej, co stwierdzono zarówno w hodowlach komórek zwierzęcych (114) i roślinnych (71) jak i w układzie *in vivo* — u myszy (115). Fuzja komórek z liposomami nie zawierającymi cholesterolu w błonie może również być przyczyną zmniejszonej żywotności komórek, prawdopodobnie na skutek zakłócenia właściwych stosunków ilościowych pomiędzy fosfolipidami a cholesterolem w błonie komórkowej (95).

III-4. Praktyczne zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji do komórek

III-4.1. Badania *in vivo*

Najczęściej stosowaną drogą podawania liposomów zwierzętom doświadczalnym są wstrzyknięcia dożylnie. Wprowadzone w ten sposób liposomy są stosunkowo szybko usuwane z krwioobiegu i gromadzone w różnych tkankach. Przeważająca część liposomów jest akumulowana w wątrobie i śledzionie (17, 98, 116—120) i wykrywana przeważnie w lizosomalnej frakcji komórek tych narządów (121, 122). Tylko niewielka część liposomów jest pobierana przez inne tkanki, m.in. serce, płuca, nerki, mózg, mięśnie (119, 123—125). Usuwanie liposomów z krwioobiegu ma charakter dwufazowy (17, 126, 127); większa część pęcherzyków jest usuwana w ciągu kilkunastu minut po podaniu liposomów, pozostała część znacznie wolniej. Podobny, dwufazowy charakter, ma pobieranie liposomów przez wątrobę; wiąże się to — jak wykazali Scherphof i współpracownicy (17) — z udziałem różnych typów komórek wątroby w procesie pobierania liposomów oraz z nietrwałością pęcherzyków w obecności surowicy. Pierwsza faza, szybkiego pobierania przez wątrobę podanych dożylnie liposomów może być przypisana endocytotycznej aktywności komórek Kupfera (makrofagów wątroby) i komórek endotelialnych (śródbłonkowych). Pobieraniu ulegają całe liposomy, tj. zarówno ich składniki błonowe jak i zawartość przedziału wodnego. Komórki mięsaszowe wątroby (hepatocyty) nie biorą udziału w wychwytywaniu liposomów (zwłaszcza liposomów o większych średnicach). Faza druga, wolnego pobierania liposomów przez tkankę wątrobową, a ściślej liposomalnej fosfatydylocholinę przypisywana jest aktywności hepatocytów. Komórki te pobierają fosfatydylocholinę po uprzednim związaniu jej z osocзовymi lipoproteinami o wysokiej gęstości (HDL). Podczas wiązania fosfatydylocholinę z lipoproteinami zawartość pęcherzyków liposomalnych wydostaje się na zewnątrz. Prowadzi więc to do sytuacji, w której poszczególne składniki liposomów pobierane byłyby niezależnie od siebie. Jak wykazano (17), zawartość wodnego przedziału liposomów jest pobierana prawie wyłącznie przez komórki Kupfera i komórki endotelialne — na drodze endocytozy. Liposomalna PC, która występuje w formie kompleksu z HDL, jest pobierana przez hepatocyty nie na drodze endocytozy, ale fuzji. Brak pobierania całych liposomów przez hepatocyty jest wynikiem oddzielenia miąższu wątroby od krwioobiegu warstwą śródbłonka, którego pory nie pozwalają na przechodzenie cząsteczek o średnicy większej niż 0.1 μm . Kompleks PC z HDL ma niewielkie wymiary, dzięki czemu z łatwością pokonuje barierę, jaką stanowi śródbłonek, natomiast obecne w krwioobiegu liposomy o średnicy większej niż 0.1 μm (wszystkie poza SUV) nie wchodzi wcale w kontakt z komór-

kami mięszowymi wątroby. Izolowane hepatocyty hodowane *in vitro* są zdolne, jak wykazano (17), do pobierania całych liposomów wraz z ich zawartością.

Poza wstrzyknięciami dożylnymi stosuje się wiele innych sposobów podawania liposomów do organizmu zwierząt, a mianowicie wstrzyknięcia dootrzewnowe (128—130) i domięśniowe (131—133), wkroplenia do tchawicy (113) lub podawanie do przewodu pokarmowego (131).

Związki biologicznie czynne zamknięte w liposomach podawanych do organizmu zwierząt, zachowują swoją aktywność po pobraniu pęcherzyków przez komórki; stwierdzić to można zarówno badając aktywność tych związków w ekstraktach komórkowych jak i obserwując ich działanie na żywy organizm. Do związków najczęściej wprowadzanych do organizmu zwierzęcego należą enzymy oraz substancje o charakterze leków i regulatorów metabolizmu komórkowego.

Wyniki badań prowadzonych *in vivo* sugerują możliwości wielu klinicznych zastosowań liposomów. Dożylne podawanie zamkniętych w liposomach enzymów pozwala uzyskać znaczne obniżenie wysokiego poziomu rozkładanych przez te enzymy związków (np. wielocukrów) w wątrobie zwierząt doświadczalnych (121, 135, 136). Sugeruje to możliwość użycia liposomów w medycynie (137) w leczeniu chorób związanych z brakiem endogennych enzymów lizosomalnych odpowiedzialnych za rozkład substancji o charakterze zapasowym.

Skuteczność leków przeciwpasożytniczych podawanych w liposomach umożliwia ich wykorzystanie w leczeniu chorób pasożytniczych takich, jak *Leishmaniasis*. Silny wzrost efektywności działania leku zamkniętego w liposomach jest prawdopodobnie wynikiem wybiórczego gromadzenia podanych dożylnie liposomów w wątrobie, gdzie pasożyt przebywa przez dłuższą część swego cyklu życiowego (138, 139).

Zmniejszenie poziomu metali ciężkich w wątrobie zwierząt doświadczalnych, obserwowane po dożylnym podaniu zamkniętych w liposomach związków chelatujących (81, 128, 124), sugeruje możliwość użycia liposomów w terapii zatruc spowodowanych spożyciem soli metali ciężkich.

Obniżenie poziomu cukru we krwi zwierząt, uzyskane w wyniku podania liposomów zawierających insulinę do przewodu pokarmowego zwierząt (131), pozwala żywić nadzieję co do możliwości opracowania w przyszłości metod doustnego podawania insuliny u ludzi.

Wstrzykiwane domięśniowo liposomy mogą być przydatne w lokalnym podawaniu leków, ze względu na opóźnianie absorpcji substancji zamkniętych we wnętrzu pęcherzyków z miejsca podania (131—133). Przedłużenie obecności zawartości liposomów w miejscu ich podania uzyskuje się także w przypadku wstrzyknięcia liposomów do jamy otrzewnowej (130) oraz podawania ich do płuc drogą wkroplenia do tchawicy (134).

Wiele uwagi poświęca się próbom zastosowania liposomów w leczeniu raka. Użycie liposomów do przenoszenia środków przeciwnowotworowych

pozwała w niektórych przypadkach uzyskać przedłużenie przeżywalności chorych zwierząt (128, 129) lub zmniejszenie wzrostu guza (129), jednak skuteczność podawanych w liposomach leków nie zawsze jest w pełni zadowalająca. Korzystne jest niewątpliwie ograniczenie ogólnej toksyczności związków cytostatycznych przez podawanie ich w liposomach (128); wiąże się to z ograniczeniem rozprzestrzeniania się tych związków w organizmie (134). Akumulacja w gruczołach limfatycznych podawanych dootrzewnowo liposomów (130) sugeruje możliwość wykorzystania pęcherzyków w leczeniu nowotworów, które przenoszą się drogą układu limfatycznego. Obiecujące wydaje się również pewne hamowanie przerzutów nowotworowych w efekcie dożylnego podania liposomów zawierających związki aktywujące makrofagi (140).

Skuteczne działanie lecznicze substancji zamkniętych w liposomach podawanych do organizmu zależy bardzo często od tego, do jakich tkanek lub narządów wprowadzona zostanie zawartość pęcherzyków. Preferencyjne pobieranie podanych dożylnie liposomów przez wątrobę i śledzionę ułatwia wprowadzanie zawartości pęcherzyków do tych narządów, równocześnie jednak ogranicza możliwości wybiórczego kierowania liposomów do innych narządów. Modyfikacje wielkości oraz składu lipidowego liposomów wywołują zmiany w szybkości i proporcji ich pobierania przez wątrobę i śledzionę, ostatecznie jednak nie zapobiegają akumulacji pęcherzyków w tych narządach (119, 141). Najbardziej obiecujące wydaje się przejściowe zablokowanie komórek fagocytykujących wątroby i śledziony przez podanie wysycającej dawki „pustych” liposomów przed wstrzyknięciem porcji pęcherzyków zawierających czynnik terapeutyczny (142, 143).

Kierowanie zawartości liposomów do tkanek zapalnych lub nowotworowych, charakteryzujących się wyższą temperaturą niż pozostałe tkanki, można uzyskać przez dożylne podanie liposomów zbudowanych z fosfolipidów o wysokiej temperaturze przejścia fazowego T_i (np. DSPC). Szczelność takich liposomów ulega zmniejszeniu dopiero w podwyższonej temperaturze chorych tkanek, a uwolniona zawartość wodnego przedziału pęcherzyków może być pobierana przez komórki tych tkanek na drodze dyfuzji lub aktywnego transportu (144).

Jeżeli substancja wprowadzana do organizmu zwierzęcego ma charakter antygeny, to podawanie jej za pośrednictwem liposomów może w istotny sposób wpłynąć na reakcje immunologiczne organizmu. Dotyczy to zarówno antygenów lipidowych, wbudowywanych w błonę liposomów jak i rozpuszczalnych, zamkniętych w wewnętrznym, wodnym przedziale pęcherzyków. Liposomy zwiększają zdolność ustroju do odpowiedzi immunologicznej na podawane za ich pośrednictwem antygeny (działanie adiuwantowe). Wprowadzenie do organizmu antygenów lipidowych wbudowanych w błonę liposomu (np. kardiolipiny) powoduje produkcję znacznie większej ilości specyficznych przeciwciał, niż podanie tych samych antygenów w formie wolnej (145). Adiuwantowe działanie liposomów

w stosunku do antygenów zamkniętych w ich przedziale wodnym (146—151) wynika prawdopodobnie z przedłużenia okresu obecności antygenów w organizmie (146, 161); ważnym czynnikiem może być również fagocytoza liposomów zawierających antygen przez makrofagi (147). Bardzo istotną zaletą liposomalnych adiuwantów jest to, że mogą być one przygotowywane z naturalnych fosfolipidów ulegających biodegradacji, dzięki czemu nie akumulują się one trwale w organizmie (146). Duże znaczenie praktyczne ma zapobieganie przez liposomy reakcjom nadwrażliwości na antygen zamknięty w ich wodnym przedziale (118), polegające na wytworzeniu fizycznej bariery pomiędzy podawanym antygenem a krążącymi już w ustroju przeciwciałami. W przypadku antygenów wbudowanych w błonę liposomalną, a więc dostępnych do bezpośredniej reakcji z przeciwciałami, obserwuje się wystąpienie opóźnionej reakcji nadwrażliwości przy podaniu liposomów zwierzętom uprzednio immunizowanym (152).

III-4.2. Badania *in vitro*

Uzupełnieniem wyników uzyskiwanych w doświadczeniach z wprowadzaniem zamkniętych w liposomach substancji do organizmu zwierząt, są wyniki badań prowadzonych *in vitro*. Inkubacja komórek zwierzęcych z liposomami zawierającymi zamknięte w nich enzymy, powoduje obniżenie w komórkach poziomu związków rozkładanych przez te enzymy (153, 154). Związki cytostatyczne podane w liposomach do hodowli komórek zwierzęcych zarówno normalnych jak i nowotworowych hamują wzrost komórek o wiele skuteczniej, niż te same substancje podawane w formie wolnej (80, 155). Antybiotyki zamknięte w liposomach są zdolne do zatrzymania rozwoju szczepów bakteryjnych opornych na te związki (156). Zmiana płynności błon komórek nowotworowych w wyniku ich fuzji z podanymi do hodowli liposomami o dużej zawartości cholesterolu w błonie, powoduje zahamowanie rozwoju nowotworu po zaszczepieniu komórek zwierzętom doświadczalnym (157, 158).

Na szersze omówienie zasługują doświadczenia z zakresu inżynierii genetycznej, polegające na wprowadzaniu do komórek kwasów nukleinowych zamkniętych w liposomach. Doświadczenia takie prowadzono w hodowlach komórek zwierzęcych (28, 42, 46, 49, 62, 99, 159—163), w hodowlach protoplastów komórek roślinnych (22, 92, 93, 164—166) oraz w hodowlach organizmów jednokomórkowych, jak bakterie (77) i niektóre grzyby (167). W większości prac stosowano liposomy typu LUV, o dużej objętości wewnętrznej fazy wodnej, chociaż w przypadku niektórych kwasów nukleinowych o małych masach cząsteczkowych używano także liposomów typu SUV i MLV. Materiał genetyczny, jaki za pośrednictwem liposomów wprowadzano do komórek, to: jądra komórkowe (42), chromosomy metafazalne (160), frakcje RNA o różnych masach cząsteczkowych

(46, 163, 164), plazmidowy DNA (22, 27, 93, 165), wirusowy DNA (63), wirusowy RNA (92, 159, 162, 164), a także mRNA specyficzny dla pojedynczych łańcuchów polipeptydowych (47, 164) oraz pojedyncze geny uzyskane w wyniku klonowania (52, 63, 167, 168). W wielu z wymienionych prac wykazano, że podany w liposomach materiał genetyczny ulega ekspresji w obrębie komórek, które go pobrały (translacji w przypadku RNA, transkrypcji i translacji w przypadku DNA). Przejawami ekspresji są:

- obecność w komórce nowych białek (46, 52, 161),
- zmiany fenotypowe komórek (jak nabycie oporności na antybiotyk, czy zmiana wymagań pokarmowych itp.), wynikające z aktywności enzymatycznej nowych białek (27, 42, 96, 160, 167), oraz
- w przypadku wirusowych DNA lub RNA — namnażanie się wirusa w komórkach zainfekowanych za pośrednictwem liposomów (62, 92, 159, 162, 166).

Wprowadzenie do komórek materiału genetycznego zamkniętego w liposomach jest znacznie efektywniejsze, niż spontaniczne pobieranie wolnych kwasów nukleinowych przez komórki (46, 52, 62, 167), natomiast stosunkowo mało efektywne w porównaniu z takimi technikami, jak transformacja plazmidowym DNA w obecności CaCl_2 (27), technika z użyciem DEAE-dekstranu (62) lub mikroiniekcja (63). Metoda wprowadzania materiału genetycznego do komórek przy użyciu liposomów posiada jednak szereg zalet, które powodują, że w wielu przypadkach jest ona znacznie bardziej przydatna, niż inne metody. Użycie liposomów umożliwia wprowadzanie materiału genetycznego do wielu komórek jednocześnie i przy stosunkowo małym nakładzie pracy (63). Ochrona zamkniętych w liposomach kwasów nukleinowych przed działaniem czynników zewnętrznych powoduje, że obecność enzymów nukleolitycznych w medium inkubacyjnym nie wpływa na zmniejszenie efektywności transformacji komórek (22, 27, 52, 62, 164, 167).

Zaakceptowano do druku 14.07.1983 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Chapman D., (1966), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **137**, 745—754.
2. Sessa G., Weissmann G., (1968), *J. Lipid Res.*, **9**, 310—316.
3. Bangham A. D., (1968), *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 29—95.
4. Bangham A. D., (1970) w *Permeability and Function of Biological Membranes*, red. Bolis L. i wsp., str. 195—206, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
5. Johnson S. M., Bangham A. D., Hill M. W., Korn E. D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 820—826.
6. Bangham A. D., (1972), *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 753—776.
7. Bangham A. D., Hill M. W., Miller N. G., (1974) w *Methods in Membrane Biology*, red. Korn E. D., t. 1, str. 1—68, Plenum Press, New York.
8. Papahadjopoulos D., Kimelberg H., (1973) w *Progress in Surface Science*, red. Davidson S., t. 4, str. 141—232, Pergamon Press, New York.

9. Ryman B. E., (1975) w Proceedings 6th International Congress on Pharmacology, Helsinki, red. Matilla M., t. 5, str. 91—103, Pergamon Press.
10. Colley C. M., Ryman B. E., (1976), *Trends in Biochem. Sci.*, **9**, 293—294.
11. Tyrrel D. A., Heath T. D., Colley C. M., Ryman B. E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 259—302.
12. Poste G., Papahadjopoulos D., Vail W., (1976) w Methods in Cell Biology, red. Prescott D. M., t. 14, str. 33—71, Academic Press, New York.
13. Gregoriadis G., (1977), *New Engl. Med.*, **295**, 704—710.
14. Gregoriadis G., (1977), *New Engl. Med.*, **295**, 765—770.
15. Pagano R. E., Weinstein J. N., (1978), *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, **7**, 433—468.
16. Poste G., (1980) w Liposomes in Biological Systems, red. Gregoriadis G., Allison A. C., str. 101—151, Wiley and Sons, London.
17. Scherphof G., Roerdink F., Hoekstra D., Zborowski J., Wisse E., (1980) w Liposomes in Biological Systems, red. Gregoriadis G., Allison A. C., str. 179—209, Wiley and Sons, London.
18. Fraley R., Papahadjopoulos D., (1981), *Trends in Biochem. Sci.*, **3**, 77—80.
19. Eytan G. T., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **694**, 185—202.
20. Bangham A. D., Standish M. M., Watkins J. C., (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 238—252.
21. Slack J. R., Anderton B. H., Day W. A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **323**, 547—559.
22. Lurquin P. F., (1979), *Nucleic Acid Res.*, **6**, 3773—3784.
23. Huang C., (1963), *Biochemistry*, **8**, 344—352.
24. Brunner J., Scrabal P., Hauser H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **455**, 322—332.
25. Batzri S., Korn E. D., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 1015—1019.
26. Barenholz Y., Amselem S., Lichtenberg D., (1979), *FEBS Lett.*, **99**, 210—214.
27. Fraley R. T., Fornari Ch. S., Kaplan S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3348—3352.
28. Fraley R. T., Subramani S., Berg P., Papahadjopoulos D., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 10431—10435.
29. Enoch H. G., Strittmatter P., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 145—149.
30. Deamer D., Bangham A. D., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 623—634.
31. Deamer D., Hill M. W., Bangham A. D., (1976), *Biophys. J.*, **16**, A111.
32. Papahadjopoulos D., Vail W., Jacobson K., Poste G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 483—491.
33. Gaber B. P., Yager P., Sheridan J. P., Chang E. L., (1983), *FEBS Lett.*, **153**, 285—288.
34. Kim S., Martin G. M., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **646**, 1—9.
35. Chapman D., Fluck D. J., (1966), *J. Cell Biol.*, **30**, 1—17.
36. Papahadjopoulos D., Miller N., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 624—638.
37. Hauser H., Gains N., (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1683—1687.
38. LeNeveu D. M., Raud R. P., Parsegian V. A., (1976), *Nature*, **259**, 601—603.
39. Papahadjopoulos D., Watkins J. C., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **135**, 639—645.

40. Szoka F., Papahadjopoulos D., (1978), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 4194—4199.
41. Pick U., (1981), *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**, 186—194.
42. Kondorosi E., Duda E., (1980), *FEBS Lett.*, **120**, 37—40.
43. Sessa G., Weissmann G., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3295—3301.
44. Ostro M. J., Giacomoni D., Dry S., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 836—842.
45. Mannino R. J., Allebach E. S., Strohl W. A., (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 229—233.
46. Dimitriadis G., (1978), *Nucleic Acid Res.*, **5**, 1381—1386.
47. Johnson S. M., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 160—164.
48. Roseman M., Litman B. J., Thompson T. E., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4826—4830.
49. Kinsky S. C., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 1—23.
50. Cohen Ch. M., Weissmann G., Hoffstein S., Awasthi Y. C., Srivastava S. K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 452—460.
51. Weissmann G., Bloomgarden D., Kaplan R., Cohen Ch. M., Hoffstein S., Collins T., Gotlieb A., Nagle D., (1975), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **72**, 88—92.
52. Wong T.-K., Nicolau C., Hofschneider P., (1980), *Gene*, **10**, 87—94.
53. Dimitriadis G., (1978), *Nature*, **274**, 923—924.
54. Bittman R., Blau B. E., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4831—4839.
55. de Gier J., Mandersloot J. G., van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 666—675.
56. Demel R. A., Kinsky S. C., Kinsky C. B., van Deenen L. L. M., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **150**, 655—665.
57. Scarpa A., de Gier J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **241**, 789—797.
58. Chapman D., Penkett S. A., (1966), *Nature*, **211**, 1304—1305.
59. Damen J., Regts J., Scherphof G., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 538—545.
60. Scherphof G., Morselt H., Regts J., Wilschut J. C., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **556**, 196—207.
61. Mayhew E., Rustum Y. M., Papahadjopoulos D., (1979), *Cancer Treat. Rep.*, **63**, 1923—1928.
62. Fraley R., Straubinger R. M., Rule G., Springer E. L., Papahadjopoulos D., (1981), *Biochemistry*, **20**, 6978—6987.
63. Schaeffer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P. H., (1982), *Science*, **215**, 166—168.
64. Morris G. J., McGrath J. J., (1981), *Cryobiology*, **18**, 390—398.
65. Weinstein J. N., Klauser R. D., Inuerarity T., Ralston E., Blumenthal P., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 270—284.
66. Zborowski J., Roerdink F. H., Scherphof G., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 183—191.
67. Kimelberg H. K., Papahadjopoulos D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **233**, 805—809.
68. Tyrrel D. A., Richardson V. J., Ryman B. E., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 469—480.
69. Weissmann G., Brand A., Franklin E. C., (1974), *J. Clin. Invest.*, **53**, 536—543.
70. Bangham A. D., de Gier J., Greville G. D., (1967), *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 225—246.

71. Lurquin P. F., Sheehy R. E., Rao N. A., (1981), *FEBS Lett.*, **125**, 183—187.
72. Huang L., Ozato K., Pagano R., (1977), *Membr. Biochem.*, **1**, 1—25.
73. Szoka F., Jacobson K., Derzko Z., Papahadjopoulos D., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 1—18.
74. Allen T. M., McAllister L., Manslof S., Gyorffy E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 346—362.
75. Szoka F. C., Jacobson K., Papahadjopoulos D., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 295—303.
76. Van Renswoude A. J., Westenberg P., Scherphof G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **558**, 22—40.
77. Pagano R., Huang L., Wey C., (1974), *Nature*, **252**, 165—167.
78. Pagano R., Huang L., (1975), *J. Cell. Biol.*, **67**, 49—60.
79. Hoekstra D., van Renswoude J. Tomasini R., Scherphof G., (1981), *Membr. Biochem.*, **4**, 129—148.
80. Papahadjopoulos D., Poste G., Mayhew E., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 404—418.
81. Rahman T. E., Wright B. J., (1975), *J. Cell Biol.*, **65**, 112—122.
82. Poste G., Papahadjopoulos D., (1976), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 1603—1607.
83. Hui S. W., Stewart T. P., Boni L. T., Yeagle P. L., (1981), *Science*, **212**, 921—923.
84. Boni L. T., Stewart T. P., Aldefar J. L., Hui S. W., (1981), *J. Membr. Biol.*, **62**, 65—70.
85. Boni L. T., Stewart T. P., Aldefar J. L., Hui S. W., (1981), *J. Membr. Biol.*, **62**, 71—77.
86. Papahadjopoulos D., Vail W., Newton C., Nir S., Jacobson K., Poste G., Lazo R., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **465**, 579—598.
87. Portis A., Newton C., Pangborn W., Papahadjopoulos D., (1979), *Biochemistry*, **18**, 780—790.
88. Uster P. S., Deamer D. W., (1981), *Arch. Bioch. Biophys.*, **209**, 385—395.
89. Wilschut J., Düzgünes N., Papahadjopoulos D., (1981), *Biochemistry*, **20**, 3126—3133.
90. Sundler R., Düzgünes N., Papahadjopoulos D., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **649**, 751—758.
91. Weinstein J. N., Yoshikami S., Hemkart P., Blumenthal R., Hagins W. A., (1977), *Science*, **195**, 489—492.
92. Nagata T., Okada K., Takebe I., Matsui Ch., (1981), *Molecular and General Genetics*, **184**, 161—165.
93. Matthews B. F., Cress D. E., (1981), *Planta*, **153**, 90—94.
94. Wilson T., Papahadjopoulos D., Taber R., (1979), *Cell*, **17**, 77—84.
95. Huang L., Pagano R. E., (1975), *J. Cell Biol.*, **67**, 38—48.
96. Hoekstra D., Scherphof G., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **551**, 109—121.
97. Blumenthal R., Weinstein J. N., Sharrow S. O., Henkart P., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5603—5607.
98. Black C., Gregoriadis G., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 253—256.
99. Graham Jr R. C., Karnovsky N. J., (1966), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291—302.
100. Magee W. E., Miller O. V., (1972), *Nature*, **235**, 339—341.
101. Forge A., Knowles P. F., Marsh D., (1978), *J. Membr. Biol.*, **41**, 249—254.

102. Papahadjopoulos D., Mayhew E., Poste G., Smith S., Vail W., (1974), *Nature*, **252**, 163—166.
103. Gregoriadis G., Neerunjun E. D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 537—544.
104. Weinstein J. N., Blumenthal R., Sharrow S. O., Henkart P. A., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **509**, 272—288.
105. Heath T. D., Fraley R., Papahadjopoulos D., (1980), *Science*, **210**, 539—541.
106. Leserman L. D., Weinstein J. N., Blumenthal R., Terry W., (1980), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**, 4089—4093.
107. Gregoriadis G., Meehan A., (1981), *Biochem. J.*, **200**, 211—216.
108. Endoch H., Suzuki Y., Hashimoto Y., (1981), *J. Immunol. Methods*, **44**, 79—86.
109. Harsch M., Walther P., Weder H., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **103**, 1069—1076.
110. Godfrey W., Doe B., Wallace E. F., Bredt B., Wofsy L., (1981), *Exptl Cell. Res.*, **135**, 137—146.
111. Huang A., Kennel S. J., Huang L., (1981), *J. Immunol. Methods*, **46**, 141—152.
112. Martin F., Hubbel W. L., Papahadjopoulos D., (1981), *Biochemistry*, **20**, 4229—4238.
113. Martin F., Papahadjopoulos D., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 286—288.
114. Dunnick J. K., Kallmann R. F., Kress J. P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 619—624.
115. Adams D. H., Joyce G., Richardson V. J., Ryman B. E., Wisniewski H. M., (1977), *J. Neurol. Sci.*, **31**, 173—179.
116. Gregoriadis G., Ryman B. E., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **24**, 485—491.
117. Gregoriadis G., (1973), *FEBS Lett.*, **36**, 292—296.
118. Gregoriadis G., Allison A. C., (1974), *FEBS Lett.*, **45**, 71—74.
119. Colley C. M., Ryman B. E., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 157—159.
120. Kimelberg H. K., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **448**, 531—550.
121. Gregoriadis G., Ryman B. E., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 123—133.
122. Gregoriadis G., Putman D., Louis L., Neerunjun D., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 323—330.
123. McDougall I. R., Dunnick J. K., McNamee M. G., Kriss J. B., (1974), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **71**, 3487—3491.
124. Jonah M. M., Cerny E. A., Rahman Y. E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **401**, 336—348.
125. Rahman Y. E., Kisieliski W. E., Buess E. M., Cerny E. A., (1975), *Eur. J. Cancer*, **11**, 873—878.
126. Gregoriadis G., Neerunjun D. E., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 179—185.
127. Juliano R. L., Stamp D., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 651—658.
128. Rahman Y. E., Rosenthal M. W., Cerny E. A., (1973), *Science*, **180**, 300—302.
129. Neerunjun D., Gregoriadis G., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 133—134.
130. Parker R. J., Priester E. R., Sieber S. M., (1982), *Drug Metab. Dispos.*, **10**, 40—46.
131. Gregoriadis G., Dapergolas G., Neerunjun E. D., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 256—258.
132. Jackson A. J., (1981), *Drug Metab. Dispos.*, **9**, 535—540.

133. Eppstein D. A., Stewart W., (1982), *J. Virology*, **41**, 575—582.
134. Juliano R. L., McCullough H. N., (1980), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**, 381—387.
135. Colley C. M., Ryman B. E., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 123—133.
136. Patel H. M., Ryman B. E., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 1014—1017.
137. Tyrrel D. A., Keeton B. R., Ryman B. E., Dubovitz V., (1976), *British Med. J.*, **2**, 88.
138. Alving C. R., Steck E. A., (1979), *Trends in Biochem Sci.*, **8**, N175—N177.
139. New R. R. C., Chance M. L., Heath S., (1981), *Parasitology*, **83**, 519—528.
140. Fidler I. J., Barnes Z., Fogler W. E., Kirsh R., Bugelski P., Poste G., (1982), *Cancer Res.*, **42**, 496—501.
141. Abra R. M., Hunt C. A., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **666**, 493—503.
142. Kao Y. J., Juliano R. L., (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 453—461.
143. Ellens H., Mayhew E., Rustum Y. M., (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **714**, 479—485.
144. Weinstein J. N., Magin R. L., Yatwin M. B., Zaharko D. S., (1979), *Science*, **204**, 188—191.
145. Uemura K., Nicolotti R. A., Six H. R., Kinsky S. C., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1572—1578.
146. Allison A. C., Gregoriadis G., (1974), *Nature*, **252**, 252.
147. Heath T. D., Edwards D. C., Ryman B. E., (1976), *Biochem. Soc. Trans.*, **4**, 129—133.
148. Beathy J. P., Beathy B. G., Parashevas F., (1981), *Journal of Surgeon Res.*, **31**, 259—268.
149. van Roijen N., van Nieuwmegen R., Kors N., (1981), *Immunol. Commun.*, **10**, 59—70.
150. Shek P. N., Sabitson B. H., (1982), *Immunology*, **45**, 349—356.
151. Kramp W. J., Howard R. S., Julius A. K., (1982), *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **169**, 135—139.
152. Nicolotti R. A., Kinsky S. C., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2331—2337.
153. Gregoriadis G., Buckland R. A., (1973), *Nature*, **244**, 170—172.
154. Roerdink F. H., Scherphof G., (1974) w Enzyme teraphy in Lysosomal Diseases, red. Tager J. M., Hooghwinkel G. J., Deams W. Th., str. 179—181, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
155. Poste G., Papahadjopoulos D., (1976), *Nature*, **261**, 699—701.
156. Chowdhury M. K. R., Goshwami R., Chakrabarti P., (1981), *J. Appl. Bacteriol.*, **51**, 223—228.
157. Inbar M., Shinitzky M., (1974), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **71**, 2128—2130.
158. Inbar M., Shinitzky M., (1974), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **71**, 4229—4231.
159. Wilson T., Papahadjopoulos D., Taber R., (1977), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 3471—3475.
160. Mukherjee A. B., Orloff Sh., Butler J. D., Triche T., Lalley F., Schulman J. D., (1978), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**, 1361—1365.
161. Ostro M. J., Giacomoni D., Lavella D., Paxton W., Dray S., (1978), *Nature*, **274**, 921—923.
162. Straus S., Wilson T., Raskas H. J., (1981), *J. Virology*, **39**, 290—294.
163. Lavella D., Ostro M. J., Giacomoni D., (1982), *Science*, **217**, 59—61.
164. Matthews B. F., Dray S., Widholm J., Ostro M. J., (1979), *Planta*, **145**, 37—44.
165. Uchimiya H., Harada H., (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 1027—1030.

166. Fraley R. T., Dellaporte S. L., Papahadjopoulos D., (1982), *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **79**, 1859—1863.
167. Radford A., Pope S., Sazci A., Traser M. J., Parish J. H., (1981), *Molecular and General Genetics*, **184**, 567—569.
168. Mercola K., Stang H., Browne J., Salser W., Cline M., (1980), *Science*, **208**, 1033—1035.

KRYSTYNA CZYŻEWSKA *)

Heterogenność gatunkowa i narządowa sulfataz arylowych

Species and Organs Heterogeneity of Arylsulphatases

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Formy cząsteczkowe sulfataz arylowych
- III. Właściwości fizyko-chemiczne arylosulfataz
 - III-1. Optimum pH
 - III-2. Powinowactwo substratowe
 - III-3. Inhibitory i aktywatory
 - III-4. Masy cząsteczkowe i budowa cząsteczek
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Molecular forms of arylsulphatases
- III. Physico-chemical properties of arylsulphatases
 - III-1. Optimum pH
 - III-2. Substrate specificity
 - III-3. Inhibitors and activators
 - III-4. Molecular weight and structure of molecules
- IV. Final remarks

I. Wprowadzenie

Mianem arylosulfataz określa się enzymy zaliczane do grupy sulfohydrolaz arylosiarczanów (E.C.3.1.6.1.), hydrolizujące wiązania estrowe syntetycznych estrów siarczanowych fenoli (1—4). Białka te wyodrębniło z wielu organizmów zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych. Można przytoczyć tu prace informujące o ich występowaniu u bakterii (5—10), w grzybach (11—15) oraz niektórych roślinach wyższych (16—18). Aktyw-

*) Dr, Katedra i Zakład Patofizjologii, Akademia Medyczna, 60-781 Poznań, Świąckiego 6

Wykaz stosowanych skrótów: NCS — siarczan 2-hydroksy-5-nitrofenolu; NPS — siarczan p-nitrofenolu; UDP-GalNAc-4-S — urydyno dwufosfo-N-acetylo-galaktoz-amino-4-siarczan.

Tabela 1

Podstawowe właściwości arylosulfataz I i II typu

Typ arylo- sulfataz	Źródło enzymu	Forma enzymu	K _M (mM)		Optimum pH	% aktywności w obecności jonów*			pI	Masa cząsteczkowa (Da × 10 ³)	Piśmien- nictwo
			NCS	NPS		SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻			
I	Aspergillus oryzae	—	0,32	0,17	5,9 i 6,2	100	96	100	—	90	49,53
	wątroba wołu	C	8,0	2,0	7,5 i 5,7	100	—	100	—	—	3
	łożysko ludzkie	C _α C _β	8,3 2,0	3,3 2,0	6,6 i 7,6 7,3	100 100	84 74	102 105	4,0 —	260 130	3
	jądra królika	A	4,1	brak aktyw- ności	—	45	67	128	4,6	110	118, 124
II	wątroba królika	A	0,79	46,0	—	50	50	63	—	140	102
	wątroba wołu	A B	0,47 1,84	— —	5,0—5,6 5,6	29 63	1 1	120 78	3,4 8,3	107 25 lub 45	3,72

* O stężeniu 20—25 mM

— Brak informacji

Uwaga: Arylosulfatazy typu I z tkanek ssaków określa się jako arylosulfatazy C.

ność sulfataz arylowych zaobserwowano także w tkankach robaków (19), stawonogów (20—22), mięczaków (24—27), szkarłupni (21, 27—29), a także kręgowców, najczęściej ssaków (30—43). Budowa chemiczna i właściwości omawianych enzymów są nadal przedmiotem badań.

Biorąc pod uwagę powinowactwo do szeregu substratów oraz rodzaje działających na nie inhibitorów wyróżniono dwa typy arylosulfataz (por. tabelę 1 oraz 1, 3, 44—49). Dla przykładu enzymy charakteryzujące się dużym powinowactwem do siarczanowych estrów prostszych fenoli, wykazujące niską aktywność względem siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu (NCS) określa się jako arylosulfatazy typu I. Nie hamują ich nieorganiczne siarczany i fosforany, natomiast silnie hamują fluorki i cyjanki (6, 47, 49—59). Enzymy zaś charakteryzujące się wysokim powinowactwem do NCS, których silnymi inhibitorami są siarczany i fosforany, nazywa się arylosulfatazami typu II (45, 48, 51, 60). Ze względu na łatwość przechodzenia w trakcie preparatyki do roztworów wodnych są one często nazywane (w przeciwieństwie do poprzednich) rozpuszczalnymi (54, 55).

Przedstawione niżej rozważania dotyczą wyłącznie drugiego typu arylosulfataz. Aktywność tych enzymów obserwowano w mikrosomach, mitochondriach, cytoplazmie, a także na powierzchni komórek; najwyższą jednak w lizosomach (46, 61—64). Wśród arylosulfataz typu II wyróżniono dalej arylosulfatazę A oraz B, charakteryzujące się m.in. odmienną ruchliwością elektroforetyczną, optimum pH, powinowactwem do NCS oraz wrażliwością na inhibitory (54, 65—72). Wyniki badań arylosulfataz, z zastosowaniem substratów sztucznych (np. NCS), długo nie pozwalały na określenie fizjologicznej funkcji tych enzymów. Dopiero stwierdzenie niedoboru arylosulfatazy A w metachromatycznej leukodystrofii (schorzenie metaboliczne przebiegające ze wzmożoną akumulacją sulfolipidów) oraz niedoboru arylosulfatazy B w zespole Maroteaux-Lamy (mukopolisacharydoza charakteryzująca się wzmożoną akumulacją siarczanu dermatanu) wskazały na naturalne substraty tych enzymów (2—4). Od tej pory fizjologiczną funkcję arylosulfatazy A wiąże się z metabolizmem sulfolipidów, arylosulfatazy B natomiast z metabolizmem mukopolisacharydów.

Zarówno sulfataza A jak i B, pochodzące z tkanek ssaków, występują w materiale biologicznym w kilku formach o odmiennych właściwościach (36, 73—77). Dotyczy to także arylosulfataz typu II z narządów innych kręgowców i bezkręgowców. Niektóre z nich stanowią formy enzymatyczne zbliżone właściwościami do arylosulfataz A i B z narządów ssaków (21, 35, 78—80).

II. Formy cząsteczkowe sulfataz arylowych

Przeprowadzone badania wykazały znacznie większą heterogenność arylosulfatazy B niż A. Nie oznacza to jednak, iż sulfataza A stanowi jednolitą formę enzymatyczną. W mózgu wołu i owcy, śledzionie wieprzo-

wej, wątrobie ludzkiej, fibroblastach skóry człowieka, a także w moczu ludzkim stwierdzono różniące się właściwościami fizyko-chemicznymi dwie formy arylosulfatazy A (1, 3, 40, 81—86). Badania arylosulfatazy A z tkanek ludzkich metodą izoelektrycznego ogniskowania wykazały jej mikroheterogenność, wynikającą z nieznacznych różnic w budowie cząsteczek (77).

Arylosulfataza B, jak już wspomniano, stanowi jeszcze bardziej heterogeny enzym. W trakcie rozdzielania na DEAE celulozie *Wortman* uzyskał trzy frakcje enzymatyczne z rogówki wołu i królika (87). Podobnie *Błęszyński* i *Lewosz* wyodrębnili z mózgu wołu trzy frakcje arylosulfatazy B, określając je jako arylosulfatazy B₁, B₂, B₃ (73, 88—90). Wyizolowano dwie formy arylosulfatazy B: kationową i anionową także z mózgu myszy (91—93). W narządach człowieka, m.in. mózgu, wątrobie, nerkach, łożysku i jądrach, oraz w leukocytach i fibroblastach stwierdzono również po kilka form arylosulfatazy B (36, 40, 41, 94, 95). Wśród nich znajduje się np. enzym określany jako arylosulfataza anionowa mniejsza (B_m), hydrolizująca UDP-N-acetylo-galaktozamino-4-siarczan (UDP-GalNAc-4-S), a różniąca się od arylosulfatazy A szybkością migracji (41). Nie zawsze jednakże arylosulfataza B z tkanek ssaków występuje w kilku formach. Spotyka się także pojedyncze formy tych enzymów (30, 39).

Arylosulfatazy A i B występują w tkankach ssaków w niejednakowych ilościach. Na przykład w mózgu królika i owcy dominuje arylosulfataza A. Z kolei arylosulfataza B przeważa w mózgu szczura, małpy i człowieka (96). To zróżnicowanie aktywności arylosulfataz wiąże się z zawartością mukopolisacharydów w komórce, które stanowią naturalne substraty arylosulfatazy B (3, 97). Stosunkowo wysokiej zawartości mukopolisacharydów w mózgu szczura, małpy i człowieka towarzyszy wysoka aktywność arylosulfatazy B. Natomiast mózg królika i owcy wykazuje niską zawartość mukopolisacharydów i dominuje w nich arylosulfataza A (96).

Z narządów ptaków i ryb wyizolowano także różne formy enzymów, o właściwościach zbliżonych do właściwości arylosulfataz A i B z tkanek ssaków. Dla przykładu z gonad i śledziony gęsi wyodrębniono sulfatazy ulegające i nieulegające adsorpcji na DEAE celulozie. Dominowały formy enzymu ulegające adsorpcji, zbliżone właściwościami do właściwości arylosulfataz A z tkanek ssaków (98). Przy użyciu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym wyróżniono również kilka frakcji arylosulfataz z plemników koguta (99). Podobnie z wątroby kury wyodrębniono dwie formy enzymu, które wędrowały z różną szybkością do anody; jedną określono jako wolno-, drugą jako szybko-wędrującą. Właściwości pierwszej przypominały właściwości arylosulfatazy A, a drugiej — właściwości arylosulfatazy B z tkanek ssaków (35). Obie formy enzymu zostały także wyizolowane z wątroby i nerki szczupaka (79).

Powyższe dane przeczą do niedawna przyjętemu pogładowi, iż arylosulfatazy A i B pojawiły się w rozwoju filogenetycznym dopiero na szczeblu ssaków (33, 39, 54, 100). Nowsze badania wykazały obecność złożonych form arylosulfataz nawet w tkankach bezkręgowców: pąkli i ślimaka (78, 80). Z jelita tego ostatniego, podczas rozdziału na DEAE celulozie i Sephadex G-200, wyodrębniono cztery frakcje badanych enzymów (por. tabelę 2). Heterogenność arylosulfataz z tkanek bezkręgowców znalazła też potwierdzenie w badaniach M r a z a i w s p. (21). Stosując metodę izoelektrycznego ogniskowania do rozdziału arylosulfataz z tkanek bezkręgowców wykazali oni występowanie form enzymu o charakterze kwaśnym i o charakterze zasadowym. Za dominujące uznali formy kwaśne. W tkankach przedstawicieli *Tunicata* stanowiących ogniwo pośrednie między zwierzętami bezkręgowymi i kręgowymi, stwierdzono arylosulfatazy kwaśne i zasadowe w równych proporcjach. Analiza właściwości kwaśnych form enzymu z bezkręgowców wskazuje na ich podobieństwo z arylosulfatazami A, zaś zasadowych z arylosulfatazami B ssaków (21). Sugeruje to, iż obie formy molekularne arylosulfataz pojawiły się na stosunkowo wczesnym etapie rozwoju filogenetycznego.

III. Właściwości fizyko-chemiczne arylosulfataz

III-1. Optimum pH

Optimum aktywności elektroforetycznie jednorodnych arylosulfataz A z tkanek ssaków przypada na ogół w zakresie pH 4,8—5,6 (3, 40, 69, 72, 88, 101—103). Zaobserwowano jednak różnice w zależności od źródła enzymu (por. tabelę 2). Zauważyć to można zarówno przy porównywaniu optimum pH enzymu z różnych narządów zwierząt jednego gatunku, jak też z tych samych narządów zwierząt różnych gatunków. Dla przykładu wartość optimum pH arylosulfataz A z wątroby, mózgu i łożyska człowieka wynosi kolejno 5,2, 4,5 oraz 4,9 (37, 40). W przypadku enzymu z wątroby kangura optimum pH wynosi 6,9, zaś z wątroby wołu 5,0 lub 5,6 (39, 72, 102, 103). Stwierdzono także zmiany wartości optimum pH arylosulfatazy A w czasie inkubacji przy różnych stężeniach enzymu. Dla przykładu: elektroforetycznie homogenna sulfataza A wyizolowana z wątroby ludzkiej wykazywała podczas inkubacji trwającej 10 min. dwa optima: przy pH 4,4 i 5,2. Przy dłuższym czasie inkubacji lub wyższym stężeniu enzymu wystąpiło jednak tylko jedno optimum przy pH 4,8 (3, 40, 101). Przedstawione tutaj zmiany właściwości arylosulfatazy A być może wynikają ze zmian konformacji cząsteczki enzymu. Będzie o tym mowa w dalszej części pracy.

Arylosulfatazy B pochodzące z tkanek ssaków cechuje optimum pH w zakresie 5,1 do 6,0 (3, 36, 39, 40). W przypadku tych enzymów stwier-

Tabela 2

Niektóre właściwości fizyko-chemiczne sulfataz arylowych pochodzących z tkanek zwierząt o różnej przynależności systematycznej

Przynależność systematyczna	Narząd	Frakcja	K_M^* (mM)	Optimum pH	Aktywatory	Inhibitory	Aktywność właściwa mole./min./mg białka	Masa cząsteczko- wa (Da $\times 10^3$)	Pismien- nictwo
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
OWADY jedwabnik	mózg	—	1,24	6,0	Mn ⁺⁺ , Ca ⁺⁺	SO ₃ ⁻ , PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ , CN ⁻ , F ⁻	0,64	50	104
ŚLIIMAKI Charonia lampas	wątroba	—	0,06	5,0 i 5,5	Cl ⁻	PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻	7,38	56	24, 25, 108
Achatina achatina	jelito	UA ₁ UA ₂ A ₁ A ₂	0,29 0,44 1,00 1,05	6,0 5,8 6,5 6,3	—	PO ₄ ⁻	47,0 42,4 385,5 125,2	110 50 93 110	78
OSŁONICE Microcosmus sulcatus	tkanki miękkie	kwaśne zasadowe	0,8 —	6,1 6,6	— —	PO ₄ ⁻ , SO ₃ ⁻ SO ₄ ⁻	— —	— —	21
RYBY leszcz	wątroba	—	—	5,2 i 6,8	Cl ⁻	F ⁻	4,8	—	33
szczupak	wątroba	—	—	5,8 6,8	—	—	—	100 24	79

c.d. str. nast.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PTAKI	wątroba	wolno-wędrująca	0,8	5,6	—	—	—	145	35
		szybko-wędrująca	2,8	5,9	—	—	—	70	
kura	mózg	—	3,1	5,0—5,5	Ag ⁺	SO ₃ ⁻ , SO ₄ ⁻ , PO ₄ ⁻ , CN ⁻ , F ⁻	1,5	—	34, 96
SSAKI kangur	wątroba	A B	2,61 1,41	6,9 5,8	Cl ⁻ —	PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ , Cl ⁻	13,0 1,4	100 45	39
wół	wątroba	A B _α B _β	0,47 1,84 1,94	5,0 lub 5,6 5,6 5,6	Cl ⁻ — —	PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻ Cl ⁻	— 138,0 121,0	107 25 lub 45	72, 103, 128
mózg		A	2,65	5,4 i 5,7	—	AgNO ₃ , mocznik SO ₃ ⁻ , PO ₄ ⁻ , SO ₄ ⁻	226,0	112	
		A ₁ B ₁	3,41 1,0	5,4 i 5,7 5,2	— octany metali, KNO ₃ , KHCO ₃ , CN ⁻	PO ₄ ⁻ , SO ₃ ⁻ SO ₄ ⁻ , F ⁻	30,6 98,0	50,5 47,5	1, 66, 73, 90
		B ₂	1,2	5,2	octany metali, CN ⁻ , KNO ₃	PO ₄ ⁻ , F ⁻	122,0	50	
		B ₃	—	5,2	octany metali, CN ⁻	PO ₄ ⁻ , SO ₃ ⁻	96,0	49	

— Brak informacji

* Substratem był siarczan-2-hydroksy-5-nitrofenolu

dzono jedynie różnice gatunkowe i narządowe omawianej wartości. Nie zaobserwowano natomiast zmiany wartości optimum pH w czasie inkubacji, co miało miejsce w przypadku arylosulfataz A wyizolowanych z narządów ssaków. Badania wykazały również zmiany optimum pH arylosulfataz pochodzących z narządów ptaków (34, 98, 99). Należy jednak dodać, iż uzyskane preparaty enzymatyczne nie były elektroforetycznie jednorodne. Dotyczy to także arylosulfataz z tkanek ryb i bezkręgowców.

Zróznicowanie optimum pH wystąpiło także podczas badania arylosulfataz pochodzących z tkanek ryb. Enzym z wątroby leszcza wykazywał obecność dwóch optimumów pH: 5,2 i 6,8, zmieniających się wraz ze stężeniem substratu (33). Enzym zbliżony właściwościami do arylosulfatazy A (u ssaków) wyizolowano z wątroby i nerki szczupaka; optimum aktywności osiągał on przy pH 5,8, zaś odpowiednik arylosulfatazy B — przy pH 6,8 (79). Arylosulfatazy wyizolowane z tkanek zwierząt bezkręgowych cechował dość szeroki zakres optimum pH. Np. wyizolowane z jelita ślimaka formy arylosulfataz UA_1 i UA_2 wykazywały optimum aktywności przy pH 6,0 i 5,8, zaś formy A_1 i A_2 przy pH 6,5 i 6,3 (por. tabelę 2). Enzym z mózgu jedwabnika charakteryzowało optimum pH równe 6,0, zaś z tkanek pąkli równe 5,6 (21, 78, 80, 104).

Przedstawione powyżej gatunkowe i narządowe różnice optimum pH sulfataz arylowych zdają się wskazywać na możliwość tkankowego zróznicowania ich form molekularnych (3, 40).

III-2. Powinowactwo wobec substratów

Arylosulfatazy, zarówno A jak i B z narządów ssaków, a także ich odpowiedniki z tkanek innych kręgowców i bezkręgowców hydrolizują kilka różnych substratów sztucznych i naturalnych, takich jak na przykład siarczany p-nitrofenolu, siarczany cerebrozydu, sulfogalaktolicerol, siarczan kwasu askorbinowego, czy też N-acetylogalaktozo-amino-siarczan (por. tabelę 3 oraz 105—112). Stosunkowo wysokie powinowactwo wykazują arylosulfatazy wobec sztucznego substratu siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu (23, 48, 51). Zauważono dość znaczne zróznicowanie narządowe i gatunkowe omawianej właściwości. I tak, formy A, A_1 oraz B_1 , B_2 , B_3 z mózgu wołu charakteryzują się stałymi Michaelisa w granicach 1,0—3,4 mM (por. tabelę 2). Enzym z mózgu kury cechuje K_M równe 3,1 mM (34). Dla porównania arylosulfataza z wątroby kury, zbliżona właściwościami do sulfatazy A z tkanek ssaków, charakteryzowała się K_M o wartości 0,8 mM (35). Brak jest danych odnośnie K_M arylosulfataz wyizolowanych z tkanek ryb. Wiadomo jednak, iż enzym pochodzący z wątroby i nerki szczupaka wykazuje najwyższą aktywność w stężeniu substratu 3 i 10 mM (79). Zróznicowane powinowactwo wobec siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu przejawiają także arylosulfatazy z tkanek różnych gatun-

Tabela 3

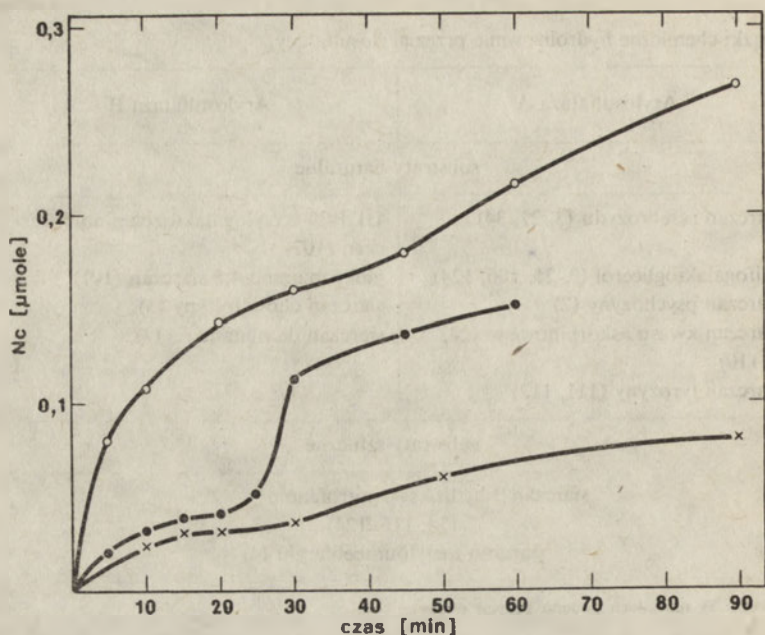
Związki chemiczne hydrolizowane przez arylosulfatazy

Arylosulfataza A	Arylosulfataza B
substraty naturalne	
siarczan cerebrozydu (3, 21, 34)	UDP-N-acetylglaktozamina-4-siarczan (107)
sulfogalaktolicerol (3, 25, 106, 124)	glukozaamina-4,6 siarczan (107)
siarczan psychozyny (2)	siarczan chondroityny (3)
siarczan kwasu askorbinowego (24, 110)	siarczan dermatanu (3)
siarczan tyrozyny (111, 112)	
substraty sztuczne	
siarczan 2-hydroksy-5-nitrofenolu (34, 116, 124)	
siarczan metyloumbeliferylu (4)	

Uwaga: W nawiasach podano pozycje piśmiennictwa

ków bezkręgowców; np. wartości K_M arylosulfataz kwaśnych wahają się od 0,4 do 3,3 mM, zaś form zasadowych od 3,3 do 7,7 mM (21). W podanych przykładach zwraca uwagę na ogół wyższe powinowactwo do NCS w przypadku arylosulfataz A niż B. Zjawisko to jest na tyle wyraźne, iż może być uznane za kryterium podziału arylosulfataz A i B, nie tylko z tkanek ssaków (3, 4), lecz również z tkanek ptaków, ryb i bezkręgowców. Właściwości kwaśnych form enzymatycznych oraz cząsteczek wolno-wędrujących w polu elektrycznym okazały się zbieżne z właściwościami arylosulfataz A u ssaków. Z kolei właściwości form zasadowych oraz cząsteczek szybko-wędrujących odpowiadają właściwościom arylosulfataz B (21, 35).

W literaturze tematu często przedstawiane są anomalie kinetyczne arylosulfatazy A z tkanek ssaków. Polegają one na zróżnicowanej w czasie szybkości hydrolizy siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu. Stwierdzono występowanie trzech etapów hydrolizy NCS (por. Ryc. 1). W pierwszym miał miejsce szybki przebieg reakcji, w drugim następował gwałtowny jej spadek, w trzecim aktywność ponownie wzrastała, jednakże szybkość reakcji nie osiągała wartości początkowej (69, 71, 101, 113—117). Zjawisko to zaobserwowano w przypadku arylosulfatazy A, wyizolowanej m.in. z wątroby wołu, wątroby i jąder królika, mózgu owcy i wołu (31, 88, 103, 118, 119). Natomiast ten sam enzym otrzymany z łożyska ludzkiego wykazywał tylko dwa pierwsze etapy hydrolizy (37). Podobnie dwuetapowy proces hydrolizy, tym razem naturalnego substratu (seminolipidu), wykazywała arylosulfataza A z jąder knura. Przy zastosowaniu jako substratu sulfa-



Ryc. 1. Krzywa aktywności arylosulfatazy A z mózgu kury (●), szczura (×) i owcy (○). Opracowano na podstawie pozycji 96, 34, 31 w bibliografii.

Uwaga: Aktywność arylosulfataz A określano ilością uwalnianego nitrokatecholu (Nc).

tydu, zjawisko to zanikało, a wykres szybkości hydrolizy przyjmował kształt prostoliniowy (120). Podkreślić należy, iż arylosulfatazy B, pochodzące z tkanek ssaków, nie wykazywały opisanych wyżej anomalii kinetycznych, typowych dla sulfataz A (3, 4).

W celach porównawczych wyznaczono także krzywe hydrolizy siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu arylosulfataz pochodzących z tkanek innych kręgowców i bezkręgowców. I tak enzymy pochodzące z mózgu kury charakteryzowały się trójetapowym przebiegiem procesu hydrolizy NCS w czasie (34, 96). W przypadku analizy wspomnianych krzywych, wyznaczonych dla dwóch form arylosulfataz z wątroby tego ptaka, zauważono następujące zależności: tzw. formę wolno-wędrującą cechowała nieliniowa zależność szybkości hydrolizy od czasu trwania reakcji oraz stężenia enzymu; szybkość reakcji nieproporcjonalnie malała wraz ze wzrostem stężenia enzymu. Z kolei w przypadku tzw. formy szybko-wędrującej, zależność ta miała charakter liniowy, zarówno w stosunku do czasu reakcji, jak i stężenia enzymu (35). Arylosulfatazy wyodrębnione z gonad i śledziony gęsi charakteryzował natomiast hiperboliczny przebieg hydrolizy NCS (98).

Analiza arylosulfataz z tkanek bezkręgowców wykazała, iż szybkość hydrolizy siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu była proporcjonalna do cza-

su reakcji co najmniej przez okres 30 min. (21). W przypadku enzymu wyodrębnionego z mózgu jedwabnika, okres ten sięgał aż dwóch godzin (104). Podczas przedłużania czasu hydrolizy zależność ta traciła jednakże charakter prostoliniowy. Zauważono to, badając m.in. enzym wyizolowany z tkanek ślimaka (23). Trudno jednoznacznie określić przyczyny anomalii kinetycznych niektórych form arylosulfataz (121—127). Wyniki badań z zastosowaniem znakowanego substratu, siarczaniu 2-hydroksy-5-nitro-fenolu (^{35}S), wskazują na przekształcenie drugorzędowej struktury białka enzymatycznego podczas reakcji hydrolizy. O zmianie konformacji cząsteczki enzymu w czasie działania katalitycznego świadczy też utrata jej antygenowych determinant (126). Sugeruje się, iż podczas reakcji katalizy w cząsteczce arylosulfatazy A (np. z wątroby królika) uwidacznia się drugie miejsce wiążące substrat (NCS). Wiązanie substratu z tym miejscem powoduje modyfikację cząsteczki enzymu, która prowadzi do częściowej jego inaktywacji. Taki enzym może jednak być częściowo reaktywowany przez jony, które stanowią kompetycyjne inhibitory arylosulfatazy A (np. fosforany, siarczany, arseniany, pirofosforany). Stwierdzono też, iż nietypową kinetyką charakteryzuje się monomeryczna forma omawianego enzymu, która występuje, gdy pH środowiska jest wyższe od 6,5 (por. III-4). Kinetyki takiej nie wykazuje natomiast arylosulfataza A w postaci dimeru (w zakresie pH 4,5—5,0), prawdopodobnie z uwagi na niedostępność drugiego miejsca wiążącego substrat. Można więc przyjąć, iż wewnątrzlizosomalny enzym nie posiada anomalnej kinetyki. Być może nietypowa kinetyka, która charakteryzuje enzym uwolniony już z lizosomu ma znaczenie fizjologiczne (125).

III-3. Inhibitory i aktywatory

Wielowartościowe aniony, np. siarczyny, siarczany i fosforany hamują aktywność arylosulfataz A i B, wyizolowanych z tkanek ssaków, jak też podobnych form enzymów wyodrębnionych z narządów ptaków, ryb i bezkręgowców (3, 21, 73, 80, 118, 120). Stwierdzono np., iż siarczany hamują w sposób współzawodniczy aktywność arylosulfataz A z mózgu wołu, a także z mózgu kury i jedwabnika (1, 34, 66, 104). Zaobserwowano różny stopień hamowania aktywności badanych enzymów. W przypadku arylosulfataz A, był on z reguły niższy niż w przypadku arylosulfataz B (1, 4, 30, 66). Wyjątkowo tylko było odwrotnie (np. enzymy z wątroby kangura, 39). Stwierdzono nawet, iż przy niskich stężeniach siarczanów i długim czasie inkubacji, jony te mogą aktywować arylosulfatazę A pochodzącą np. z mózgu wołu (1).

Zauważono też, iż odpowiedź arylosulfataz na jednowartościowe aniony była bardziej zróżnicowana niż na aniony dwuwartościowe. W odniesieniu do arylosulfataz A i B, pochodzących z narządów ssaków (np. jąder

knura oraz wątroby królika), stwierdzono hamowanie aktywności przez jony fluorkowe, przy czym wyraźniejszy efekt hamowania obserwowano w przypadku arylosulfataz B (1, 66, 102, 120). Jony te były także bardzo silnymi inhibitorami kationowych form enzymatycznych, wyizolowanych z gonad i śledziony gęsi (98). Charakterystyczne, iż enzymy z innych narządów ptaków (np. mózgu kurcząt) hamowane były przez jony fluorkowe w znacznie niższym stopniu (34). Cyjanki działały *in vitro* jako aktywatory sulfatazy A z wątroby królika (102) lub jako inhibitory, np. sulfataz A z mózgu wołu oraz sulfataz B z wątroby i nerki myszy (1, 66, 42). Działanie hamujące cyjanków wykazano także podczas analizy enzymów z narządów ptaków, które stanowiły odpowiedniki arylosulfataz A z narządów ssaków (34, 98).

O heterogenności narządowej sulfataz arylowych świadczy zróżnicowana ich odpowiedź na działanie chlorków. Wyniki niektórych badań wskazują, iż jony chlorkowe aktywują arylosulfatazy B, hamują natomiast aktywność arylosulfataz A z tkanek ssaków. Tak było np. w przypadku arylosulfataz z mózgu wołu (66). Szereg przykładów jednak świadczy o odmiennym typie reakcji, np. arylosulfataza B z wątroby wołowej okazała się niewrażliwa na działanie chlorków (128), z kolei ten sam enzym wyizolowany z wątroby ludzkiej (129) oraz wątroby kangura (39) ulegał inaktywacji. Brak wpływu Cl^- na aktywność enzymu zaobserwowano w przypadku sulfataz arylowych wyizolowanych z jąder królika, mózgu kury, czy też jedwabnika (34, 104, 118). Kationowe formy enzymu z gonad i śledziony gęsi aktywowane były na ogół przez jony chlorkowe, jednakże w różnym stopniu. Podobne zmiany aktywności wystąpiły pod wpływem działania octanów niektórych metali (98). Wykazano, iż octany glinu, ołowiu oraz cynku silnie aktywowały arylosulfatazy B, wyodrębnione z mózgu wołu. Równocześnie hamowały one arylosulfatazę A z tego narządu (66).

Pod działaniem mocznika obserwowano obniżenie aktywności arylosulfataz A z tkanek ssaków, prawdopodobnie na skutek rozpadu enzymu na nieaktywne podjednostki. Zjawiska tego nie stwierdzono w przypadku arylosulfataz B (66). Podczas analizy sulfataz arylowych z narządów ptaków obserwowano znaczne różnice w hamowaniu aktywności form wyizolowanych z tego samego narządu, jak też form wyodrębnionych z różnych narządów tego samego gatunku (98). Odmienna jakościowo i ilościowo odpowiedź arylosulfataz na działanie omówionych wyżej związków chemicznych, wskazuje na zróżnicowaną budowę ich centrum aktywnego. I tak w centrum aktywnym arylosulfatazy A występują m.in. grupy: karbonylowa oraz prawdopodobnie imidazolowa, fenolowa, aminowa (37, 66, 109). Przypuszcza się, iż w centrum aktywnym arylosulfatazy B oprócz grupy imidazolowej występują także grupy karboksylowe kwasu asparaginowego i glutaminowego (3, 73, 129). Dało się też zauważyć, że odpowiedzi badanych enzymów na niektóre związki (np. fosforany, siarczyny, siar-

czany, cyjanki, fluorki) były podobne pomimo różnego pochodzenia enzymów. Potwierdza to przypuszczenie, iż podczas ewolucji centrum aktywne nie ulegało większym zmianom, w przeciwieństwie do pozostałych fragmentów cząsteczki białka enzymatycznego (130).

III-4. Masy cząsteczkowe i budowa cząsteczek

Masy cząsteczkowe sulfataz arylowych z narządów niektórych kręgowców i bezkręgowców są zróżnicowane (por. tabelę 2 oraz 30, 31, 35, 39, 79, 118, 120,). Zwraca uwagę występowanie w wątrobie i nerce szczupaka form enzymatycznych o bardzo różnych masach cząsteczkowych (79). Zasadniczo odbiegała od innych masa cząsteczkowa arylosulfatazy A ze śledziony wieprza i mózgu wołu (3, 90). Wynika to być może ze zdolności arylosulfatazy A do polimeryzacji lub dysocjacji, w zależności od stężenia białka enzymatycznego, wartości pH, czy siły jonowej środowiska (102, 103, 121, 131). Wykazano bowiem obecność kilku form polimerycznych tego enzymu. Arylosulfataza A (o stężeniu wyższym niż 0,5 mg/ml, w buforze o sile jonowej 0,1), stanowi stabilną formę monomeryczną, gdy pH środowiska jest wyższe od 6,5. Masa cząsteczkowa tej natywnej formy wynosi wówczas około 100 000. Zmiana wartości pH poniżej 5,5 prowadzi zazwyczaj do pojawienia się tetrameru o masie cząsteczkowej około 400 000. Stwierdzono, iż nie posiada takiej zdolności np. arylosulfataza A z łożyska ludzkiego oraz wątroby kangura (3, 4, 39). Zarówno forma monomeryczna, jak i tetrameryczna, hydrolizuje siarczan 2-hydroksy-5-nitrofenolu. Stosowanie niskich stężeń arylosulfatazy A w środowisku o pH 5,0 (a także mniejszym) może być przyczyną pojawienia się zarówno monomeru, jak i dimeru (3, 4). Równowaga trzech wymienionych form arylosulfatazy A (tj. tetrameru, dimeru i monomeru) występuje w zakresie pH 5,5 do 6,5. Badania, z zastosowaniem środków wywołujących dysocjację natywnej cząsteczki enzymu (np. siarczanu dodecyłu, czy mocznika z dwutiotreitolem), wykazały, iż złożona jest ona z dwóch nieaktywnych podjednostek o masie cząsteczkowej około 50 000. Połączone są one wiązaniami dwusiarczkowymi. Z kolei każda z nich jest utworzona z dwóch podjednostek elementarnych o masie cząsteczkowej 25 000, spojonych wiązaniami hydrofobowymi (4). Jak dotąd nie udało się wyizolować i scharakteryzować wymienionych podjednostek arylosulfatazy A, ponieważ usunięcie związków dysocjujących wywoływało niespecyficzną ich agregację.

Znacznie mniej jest informacji odnośnie budowy cząsteczki arylosulfatazy B. Masy cząsteczkowe tego enzymu kształtują się najczęściej w granicach 45 000—60 000. Spotyka się jednak formy sulfatazy B o znacznie wyższej masie cząsteczkowej. Wymienić tu można np. enzym z wątroby kota (masa cząsteczkowa 100 000). Stwierdzono w tym przypadku, iż na-

tywny enzym jest dimerem zbudowanym z dwóch identycznych podjednostek (95). Natomiast arylosulfataza B z wątroby ludzkiej okazała się monomerem o masie cząsteczkowej 48 000 (95). Charakterystyczna jest zdolność niektórych form omawianego enzymu (np. arylosulfatazy B z wątroby wołu), do niespecyficznego agregacji i wytwarzania cząsteczek o masie 300 000. Zjawisko to występowało w roztworach o niskiej sile jonowej (128).

Opisane różnicowanie nie zaciemnia jednak podstawowej cechy omawianych enzymów: w tkankach wszystkich zbadanych kręgowców występują dwie zasadnicze formy molekularne sulfataz arylowych; jedna o masie cząsteczkowej w granicach 100 000—145 000, druga w przedziale 45 000—70 000. Stwierdzono również wielość form arylosulfataz, a także różnicowanie mas cząsteczkowych tych enzymów w jelicie ślimaka (78). Wspomina się też o występowaniu już w tkankach bezkręgowców dwóch form arylosulfataz: kwaśnych i zasadowych (21). W niektórych jednakże przypadkach, np. mózgu jedwabnika, stwierdzono obecność tylko jednej formy arylosulfataz, o masie cząsteczkowej w granicach 50 000—56 000 (104).

IV. Uwagi końcowe

Pozostaje w tym miejscu wskazać na źródła heterogenności, jak też jej znaczenie dla lepszego poznania fizjologicznej roli arylosulfataz. Przedstawione właściwości, wskazują na heterogenność gatunkową i narządową sulfataz arylowych, tak z tkanek zwierząt kręgowych, jak i bezkręgowych. Obserwowano przede wszystkim występowanie dwóch, często złożonych, form sulfataz arylowych II typu. U ssaków zostały one określone jako arylosulfatazy A i B, zaś u zwierząt o niższej przynależności systematycznej jako formy zbliżone właściwościami do arylosulfataz A i B. Niektórzy autorzy sugerują możliwość przekształcenia sulfatazy A w B po odłączeniu od tej pierwszej kwasu N-acetylneuraminowego (132). Jest to jednak mało prawdopodobne z uwagi na znaczne różnice w kinetycznych i fizycznych właściwościach tych enzymów (4, 75). Obecnie arylosulfatazy A i B uznawane są za typowe izoenzymy. Wykazano bowiem, iż gen odpowiedzialny za syntezę arylosulfatazy A u człowieka znajduje się w chromosomie 22, zaś arylosulfatazy B w chromosomie 5 (133—137). Udokumentowane powyżej odrębne właściwości tych izoenzymów stanowią punkt wyjścia do badań niektórych schorzeń metabolicznych, a w konsekwencji ustalenia fizjologicznej roli jaką grają omawiane enzymy w organizmie człowieka. Jak już wcześniej wspomniano w tkankach i płynach ustrojowych chorych na metachromatyczną leukodystrofię obserwuje się obniżenie aktywności arylosulfatazy A. W zespole Maroteaux — Lamy (mukopolisacharydoza VI) występuje natomiast niedobór arylosulfatazy B. Zna-

ne jest także schorzenie określane jako wieloraki niedobór sulfohydrolaz, w którym u pacjentów obserwuje się niedobór aktywności arylosulfataz A i B, a także arylosulfatazy C (zaliczonej do I typu sulfataz). Wymienione choroby metaboliczne, dziedziczone w sposób autosomalny, recesywny, były wielokrotnie opisywane (2, 4, 138—141). W wyniku badań tych schorzeń metabolicznych ustalono, iż fizjologiczną rolę arylosulfatazy A należy wiązać z metabolizmem sulfolipidów, natomiast arylosulfatazy B z metabolizmem mukopolisacharydów. Są też podstawy by twierdzić, iż różne ilości arylosulfataz A i B w badanych organizmach są wynikiem zmiennej zawartości wymienionych substratów i mogą być uznane za przejaw heterogenności gatunkowej omawianych enzymów (96).

Dwie formy arylosulfataz pojawiły się w tkankach na dość wczesnym etapie rozwoju filogenetycznego zwierząt, a nie jak sugerowano dopiero u kręgowców (39). Obecność ich stwierdzono bowiem już u zwierząt bezkręgowych (21, 78). Nie wiadomo jednak dokładnie jaką rolę pełnią one w tych organizmach. Sugeruje się ich udział w metabolizmie proteoglikanów i glikoprotein. Wskazuje się też na znaczenie omawianych enzymów w larwalnej morfogenezie oraz w procesie fertylizacji (29, 64, 71, 80). Do wyjaśnienia pozostaje również charakter zmian jakim podlegały cząsteczki arylosulfataz podczas rozwoju filogenetycznego zwierząt. Analiza różnic składu aminokwasowego arylosulfataz A oraz B z narządów ssaków (4) sugeruje, iż powstały one na skutek duplikacji genu, a następnie podlegały rozbieżnej ewolucji. Podobny typ reakcji arylosulfataz, wyizolowanych z tkanek zwierząt o różnej przynależności systematycznej na niektóre związki chemiczne, skłania do sformułowanego wyżej przypuszczenia, iż ewolucja ta dotyczyła w mniejszym stopniu samego centrum aktywnego, niż pozostałych fragmentów cząsteczki enzymu (130).

Zarówno arylosulfataza A, jak i arylosulfataza B, pochodzące z narządów ssaków, a także ich odpowiedniki wyizolowane z tkanek innych zwierząt, występują w kilku formach enzymatycznych. Przedstawione dane wskazują, iż formy te różnią się między sobą dość znacznie. Wydaje się jednak, iż w tym przypadku nie są to typowe izoenzymy (77), chociaż w ten sposób określane są przez niektórych badaczy (38). W odniesieniu do różnych form arylosulfatazy B z narządów ssaków, wysuwa się sugestię, iż są one produktem tego samego genu, a źródłem ich heterogenności mogą być modyfikacje post-translacyjne (41, 77, 92). Mechanizm tych modyfikacji jest kontrolowany przez specjalne loci umieszczone na chromosomie 17, które reguluje podobne procesy w przypadku innych lizosomalnych hydrolaz (42, 92, 142, 143). Uważa się, iż wspomniane modyfikacje polegają na zróżnicowanym stopniu sjałizacji poszczególnych form arylosulfataz, a także fosforylacji lub defosforylacji cząsteczek enzymu (41, 75, 76, 91). Wykazano, iż proces fosforylacji i defosforylacji związany jest z rozwojem ontogenetycznym (94). Ekspresja rozwojowa arylosulfataz B (np. liczba cząsteczek enzymu) podlega regulacji genetycznej,

związanej z As-1 (92). Wymienione modyfikacje warunkują zapewne pojawianie się określonych form arylosulfataz B, o zróżnicowanym lecz specyficznym działaniu w określonych tkankach i są przejawem heterogenności narządowej tych enzymów.

Należy w tym miejscu podkreślić, iż post-translacyjne modyfikacje cząsteczek arylosulfatazy B, tj. przyłączanie różnej ilości kwasu sjałowego i reszt fosforanowych, nie tylko dotyczą organizmu zdrowego. Są dane, które przedstawiają formy arylosulfatazy B znajduwane w tkankach i płynach ustrojowych pacjentów z określonymi schorzeniami. Należy tu wymienić prace opisujące niektóre aspekty procesu karcinogenezy (143—146), a także dane dotyczące wspomnianych wcześniej schorzeń metabolicznych, przebiegających z niedoborem arylosulfatazy B (147). Sugeruje się, iż w procesach chorobowych następują zakłócenia biosyntezy enzymu oraz zmiany struktury jego cząsteczek w wyniku modyfikacji post-translacyjnych.

Arylosulfataza A, na podstawie przedstawionych danych, wydaje się być mniej heterogenną niż arylosulfataza B. Ilość informacji dotyczących jej różnorodności jest mniejsza. Wskazuje się na kilka źródeł tego zjawiska. Przyczyną występowania wielorakich form arylosulfatazy A (podobnie jak B), mogą być post-rybosomalne modyfikacje tego białka. Polegają one np. na różnicach w zawartości kwasu sjałowego, a także w części węglowodanowej cząsteczki (77, 84, 85). Interesująca, z punktu widzenia heterogenności, jest możliwość występowania ufosforylowanych („*high uptake*”) i nieufosforylowanych („*low uptake*”) form arylosulfatazy A. Sugeruje się, iż forma nieufosforylowana stanowi rozpuszczalne białko i może działać katalitycznie. Forma ufosforylowana natomiast związana jest poprzez resztę cukrową ze specyficznym receptorem błonowym. Prawdopodobnie forma ta dopiero w lizosomach zostaje przekształcona w aktywny enzym (83).

W artykule wskazano, iż arylosulfataza A z tkanek ssaków, w przeciwieństwie do arylosulfatazy B, ma budowę podjednostkową (102, 131). W związku z tym w zależności od pH obserwuje się różne stany asocjacji enzymu. Spotyka się więc zarówno formy wysoko, jak i nisko cząsteczkowe (85). Stanowić to może dodatkowe źródło heterogenności arylosulfatazy A. Zaburzenie równowagi między formą wysoko i nisko cząsteczkową tego enzymu, może występować w niektórych formach metachromatycznej leukodystrofii (148).

W piśmiennictwie podkreśla się również możliwość występowania artefaktów arylosulfataz. Mogą one powstawać na drodze degradacji białek natywnych na skutek stosowania drastycznych metod izolowania i oczyszczania (np. autolizy, 41, 75). Możliwe jest, iż podczas takiej procedury dochodzi do oddysocjowania niektórych składników (np. kwasu sjałowego). Ponadto podczas przechowywania (odmrażania i zamrażania) enzymu, formy wysokocząsteczkowe mogą przechodzić w nisko cząsteczkowe lub

zachodzi zjawisko odwrotne (30, 94). Wymienione możliwości mogą być również przyczyną powstawania różnic w cząsteczkach enzymu. Nie powinny być jednak utożsamiane z właściwą heterogennością sulfataz arylo-
wych, typową dla nieuszkodzonej komórki.

Zaakceptowano do druku 26.09.1983 r.

PIŚMIENNICTWO

1. Błęszyński W., (1970), Arylosulfatazy układu nerwowego, UMK, Rozprawy, Toruń.
2. Czyżewska K., Działoszyński L., (1978), *Ped. Pol.*, **9**, 1129—1135.
3. Gniot-Szulżycka J., (1977), Arylosulfatazy (E.C.3.1.6.1.) i ich rola w świetle badań nad genetycznie uwarunkowanymi schorzeniami, UMK, Rozprawy, Toruń.
4. Roy A. B., (1976), *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **54**, 111—135.
5. Delisle J. G., Milazzo F. H., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, 505—508.
6. Delisle J. G., Milazzo F. H., (1972), *Canadian J. Microbiol.*, **18**, 561—568.
7. Flower L. R., Rammler D. H., (1964), *Biochemistry*, **3**, 230—237.
8. Harada T., (1964), *Biochem. J.*, **93**, 373—378.
9. Milazzo F. H., Fitzgerald J. E., (1966), *Canadian J. Microbiol.*, **12**, 735—744.
10. Murooka Y., Yim M. H., Harada T., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 812—817.
11. Benković S. J., Vegara E. V., Havey R. V., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4926—4933.
12. Burns G. R. J., Wynn C. H., (1977), *Biochem. J.*, **166**, 411—414.
13. Burton E. G., Metzenberg R. L., (1973), *J. Bacteriol.*, **113**, 519—520.
14. Lien T., Schreiner O., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 168—179.
15. Rasburn M., Wynn C. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 191—196.
16. Farooqui A. A., Afridi H. M. R. K., (1977), *Planta*, **133**, 157—160.
17. Górską-Brylas A., (1965), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **34**, 589—602.
18. Poux N., (1967), *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 932.
19. Ney K. H., Ammon R., (1958), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **315**, 145—156.
20. James G. T., Kett D., Austin J. H., (1980), *Enzyme*, **25**, 138—131.
21. Mraz W., Jatzkiewicz H., (1974), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**, 33—44.
22. Yang R. S. M., Pelliccia J. G., Wilkinson C. F., (1973), *Biochem. J.*, **136**, 817—820.
23. Dodgson K. S., Powell G. M., (1959), *Biochem. J.*, **73**, 672—679.
24. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., (1975), *Biochem. J.*, **77**, 353—359.
25. Hatanaka H., Egami F., Ishizuko J., Nagai, (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 176—185.
26. Takahashi N., (1960), *J. Biochem.*, (Tokyo), **48**, 508—514.
27. Moriya T., Hoshi M., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 216—223.
28. Cornet D., Jangoux M., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **47B**, 45—52.
29. Hoshi M., Moriya T., (1980), *Develop. Biol.*, **74**, 343—350.
30. Agogbua S. J. O., Wynn C. H., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 415—421.
31. Balasubramanian K. A., Bachhawat B. K., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 113—121.

32. Działoszyński L. M., Wenclewski A., (1963), *Clinica Chim. Acta*, **8**, 565—567.
33. Działoszyński L. M., Kuik K., Leźnicki A., (1966), *Zesz. Nauk. UMK, Nauki Mat.-Przyr.*, Zesz. 15, Biol., IX, 88—100.
34. Farooqui A. A., Bachhawat B. K., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 1025—1033.
35. Feddecka-Bruner B., Croisille Y., (1978), *Biochimie*, **60**, 437—441.
36. Gniot-Szulżycka J., (1972), *Acta Biochim. Pol.*, **19**, 181—190.
37. Gniot-Szulżycka J., (1974), *Acta Biochim. Pol.*, **21**, 247—254.
38. Helwig J. J., Farooqui A. A., Bollack C., Mandel P., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 127—134.
39. Roy A. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 129—138.
40. Shapira E., Nadler H. L., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 179—187.
41. Stevens R. L., Fluharty A. L., Killgrove A. R., Kihara H., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **481**, 549—560.
42. Daniel W. L., Abedin K., Langelan R. E., (1980), *J. Hered.*, **71**, 161—167.
43. Gravel R. A., Leung A., Tsui F., Kolodny E. H., (1982), *Analyt. Biochem.*, **119**, 360—363.
44. Baum H., Dodgson K. S., (1957), *Nature*, **179**, 312—313.
45. Dodgson K. S., Spencer B., (1953), *Biochem. J.*, **53**, 444—451.
46. Dodgson K. S., Spencer B., Thomas J., (1954), *Biochem. J.*, **56**, 177—181.
47. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., (1955), *Biochem. J.*, **61**, 374—380.
48. Dodgson K. S., Spencer B., Wynn C. H., (1956), *Biochem. J.*, **62**, 500—507.
49. Dodgson K. S., Rose F. A., Tudball N., (1959), *Biochem. J.*, **71**, 10—15.
50. Gniot-Szulżycka J., Komoszyński M., (1972), *Enzymologia*, **42**, 11—21.
51. Dodgson K. S., Spencer B., Thomas J., (1955), *Biochem. J.*, **59**, 29—37.
52. Dodgson K. S., Spencer B., Williams K., (1955), *Biochem. J.*, **64**, 216—221.
53. Nicholls R. G., Roy A. B., (1971), w *Enzymes*, red. Glick D., t. 5, str. 21—41; Academic Press, New York.
54. Roy A. B., (1969), w *Advances in Enzymology*, red. Nord F. F., t. 22, str. 205—235; Interscience Publ., New York.
55. Dodgson K. S., Spencer B., (1961), w *Methods of Biochemical Analysis*, red. Glick D., t. 4, str. 211; Inter. Publish. Inc., New York.
56. Roy A. B., (1956), *Biochem. J.*, **64**, 651—657.
57. Gniot-Szulżycka J., (1982), *Acta Biochim. Pol.*, **29**, 205—212.
58. Moriyasu M., Ito A., Omura T., (1982), *J. Biochem.*, (Tokyo), **92**, 1189—1195.
59. Moriyasu M., Ito A., (1982), *J. Biochem.* (Tokyo), **92**, 1197—1204.
60. Dodgson K. S., Powell G. M., (1959), *Biochem. J.*, **73**, 666—671.
61. Leźnicki A., (1972), Biochemiczna charakterystyka i histochemiczna lokalizacja arylosulfataz narządów szczura, Praca doktorska UMK, Toruń.
62. Roy A. B., (1979), *Biochem. J.*, **196**, 380—386.
63. Kirkeby S., (1980), *Acta Histochem. Cytochem.*, **13**, 430—434.
64. Rapraeger A. C., Epel D., (1981), *Develop. Biol.*, **88**, 269—278.
65. Bleszyński W., Działoszyński L. M., (1965), *Biochem. J.*, **97**, 360—364.
66. Bleszyński W., Leźnicki A., (1967), *Enzymologia*, **33**, 373—389.

67. Działoszyński L. M., Gniot-Szulżycka J., Jaguszyn Z., (1966), Zesz. Nauk. UMK, Zesz. 15, Biol. IX, 61—74.
68. Nagadowska J., (1981), Oczyszczanie i charakterystyka rozpuszczalnych sulfataz arylowych z jąder bydłych. Praca doktorska UAM, Poznań.
69. Roy A. B., (1953), *Biochem. J.*, **55**, 653—661.
70. Roy A. B., (1954), *Biochem. J.*, **57**, 465—470.
71. Roy A. B., (1956), *Biochem. J.*, **62**, 35.
72. Roy A. B., Trudinger P. A., (1970), w *The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur*, str. 106—189; Cambridge University Press.
73. Błęszyński W., Roy A. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 164—171.
74. Dubois G., Turpin J. C., Bauman W., (1975), *Biomedicine*, **23**, 116—119.
75. Farooqui A. A., (1976), *Biochimie*, **58**, 759—761.
76. Farooqui A. A., Roy A. B., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 431—439.
77. Stevens R. L., Fluharty A. L., Killgrove A. R., Kihara H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 661—671.
78. Agogbua S. J. O., Anosike E. O., Ugochukwa E. N., (1978), *Comp. Biochem. Physiol. B.*, **59**, 169—174.
79. Kuik K., (1972), X Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, C-37, 116, Poznań.
80. Shimony T., Nigrelli R. F., (1972), *Mar. Biol.*, **14**, 349—358.
81. Stevens R. L., Hartman M., Fluharty A. L., Kihara H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **302**, 338—344.
82. Stevens R. L., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 249—250.
83. Das P. K., Bishayee S., (1980), *FEBS Lett.*, **11**, 43—46.
84. Ishibashi T., Maru A., Imai Y., Makita A., Tsuji I., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **616**, 218—227.
85. Luijten J., van der Heijden H., Rijkssen G., Staal G., (1978), *J. Mol. Med.*, **3**, 213—225.
86. Harben A. M., Krawiecki N., Marcus F. A., (1982), *Clinica Chim. Acta*, **125**, 351.
87. Wortman B., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 70—74.
88. Błęszyński W., (1967), *Enzymologia*, **32**, 169—181.
89. Błęszyński W., Leźnicki A., Lewosz J., (1969), *Enzymologia*, **37**, 314—324.
90. Lewosz J., (1971), Badania nad strukturą arylosulfataz mózgu wołowego, Praca doktorska UMK, Toruń.
91. Harrison B. W., Daniel W. L., Abbas K. J., (1982), *Experientia*, **38**, 73—75.
92. Daniel W. L., Harrison B. W., Nelson K., (1982), *J. Hered.*, **73**, 24—28.
93. Daniel W. L., Caplan H. S., (1980), *Biochem. Genet.*, **18**, 625—642.
94. Lakshmi S., Balasubramanian A. S., (1980), *Biochem. Biophys. Acta*, **446**, 458.
95. McGovern M. M., Vine D. T., Haskins M. E., Desnick R. J., (1982), *J. Biol. Chem.*, **257**, 12605.
96. Farooqui A. A., Bachhawat B. K., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 635—646.
97. O'Brien J. F., Cantz M., Spranger J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **60**, 1170—1177.
98. Czyżewska K., Działoszyński L., (1981), *Acta Biochim. Pol.*, **28**, 367—377.
99. Droba M., Droba B., (1981), *J. Exp. Zool.*, **218**, 301—303.
100. Roy A. B., (1958), *Biochem. J.*, **68**, 519—628.
101. Baum H., Dodgson K. S., Spencer B., (1958), *Biochem. J.*, **69**, 567—572.

102. Lee G. D., van Etten R. L., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **166**, 280—294.
103. Nichol L. W., Roy A. B., (1964), *J. Biochem.*, (Tokyo), **55**, 645—651.
104. Farooqui A. A., Yusufi A. N. K., (1976), *J. Neurochem.*, **27**, 1191—1195.
105. Farooqui A. A., (1976), *Experientia*, **32**, 1242—1244.
106. Fluharty A. L., Stevens R. L., Miller R. T., Kihara H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 348—354.
107. Fluharty A. L., Stevens R. L., Fung D., Peak S., Kihara H., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **64**, 955—962.
108. Hatanaka H., Ogawa Y., Egami F., Ishizuka J., Nagai Y., (1975), *J. Biochem.*, (Tokyo), **78**, 427—429.
109. Jerfy A., Roy A. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 178—190.
110. Roy A. B., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **377**, 356—363.
111. Tsuji M., Nakanishi Y., Habuchi H., Ishihara K., Suzuki S., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **612**, 373—383.
112. Fluharty A. L., Stevens R. L., Goldstein E. B., Kihara H., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 321—326.
113. O'Fagain C., Bond U., Orsi B. A., Mantle T. J., (1982), *Biochem. J.*, **201**, 345—352.
114. Waley S., (1980), *Biochem. J.*, **185**, 771—773.
115. Baum H., Dodgson K. S., (1958), *Biochem. J.*, **69**, 573—582.
116. Fluharty A. L., Glick J. A., Samaan G. F., Kihara H., (1982), *Analit. Biochem.*, **121**, 310.
117. Roy A. B., (1957), *Experientia*, **XIII/1**, 32—34.
118. Yang Cheel-Halc, Srivastava P. N., (1976), *Biochem. J.*, **159**, 133—142.
119. Nicholls R. G., Roy A. B., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 141—151.
120. Yamato K., Handa S., Yamakawa T., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 1241—1247.
121. Waheed A., van Etten R. L., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 215—225.
122. Roy A. B., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 488—490.
123. Roy A. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 489—506.
124. Stinshoff K., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 475—488.
125. Waheed A., van Etten R. L., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 248—251.
126. Waheed A., van Etten R. L., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.*, **203**, 11—24.
127. Prosser C. J., Roy A. B., (1980), *Biochim. Biophys. Acta*, **613**, 130—139.
128. Allen E., Roy A. B., (1968), *Biochem. Biophys. Acta*, **168**, 243—251.
129. Dodgson K. S., Wynn C. H., (1958), *Biochem. J.*, **68**, 385—395.
130. Szumiel J., (1963), *Post. Biochem.*, **9**, 154—172.
131. Draper K. R., Fiskun G. M., Edmond J., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 528—538.
132. Goldstone A., Konecny P., Koenig H., (1971), *FEBS Lett.*, **13**, 68—72.
133. Deluca Ch., Brown A. J., Shows T. B., (1979), *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, **76**, 1957—1961.
134. Franke U., Tetri P., Taggart R. T., Oliver N., (1981), *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**, 58—69.
135. Bruns G. A. P., Mintz B. J., Leary A. C., Regina V. M., Gerald P. S., (1979), *Biochem. Genet.*, **17**, 1031.
136. van Kessel G., Westerveld A., De Groot P. G., Meera Khan P., Hagemeijer A., (1980), *Cytogenet. Cell Genet.*, **28**, 169—172.

137. Hellkuhl B., Grzeschik K.-H., (1978), *Cytogenet. Cell Genet.*, **22**, 203—206.
138. Gniot-Szulżycka J., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 17—26.
139. Haskins M. E., Jeżyk P. F., Desnick R. J., Patterson P. F., (1981), *Am. J. Pathol.*, **105**, 191.
140. Waheed A., Hasilik A., von Figura K., (1982), *Europ. J. Biochem.*, **123**, 317—321.
141. Farooqui A. A., Mandel P., (1977), *Clin. Chim. Acta*, **74**, 93—100.
142. Daniel W. L., Abedin K., Langelan R., (1980), *J. Hered.*, **71**, 161—167.
143. Gasa S., (1981), *Jpn. J. Thorac. Dis.*, **19**, 102—110.
144. Gasa S., Makita A., Kameya T., Kodama T. S., Koide T. T., Tsumuraya M., (1981), *Eur. J. Biochem.*, **116**, 497—504.
145. Gasa S., Makita A., Kameya T., Kodama T., Araki E., Yoneyama M., Hirama M., Hashimoto M., (1980), *Cancer Res.*, **40**, 3804—3809.
146. Wasserman S. J., Austen K. F., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7074—7080.
147. Youtaka T., Okada S., Kato T., Imui K., Yabuuchi H., (1981), *Clin. Genet.*, **20**, 296—303.
148. Luijten J., van der Heiden H., Rijksen G., Staal G., (1978), *J. Mol. Med.*, **3**, 227—246.

Nie mając możliwości opublikowania swojej odpowiedzi na recenzje mojej książki „Genetyka fizjologiczna zwierząt” (PWN, Warszawa, 1980) ogłoszone przez A. Putrament i M. Chorążego w Postęпах Biochemii (1981), uprzejmie informuję, iż została ona wydrukowana w Postęпах Nauk Rolniczych, 1983, 3, 123—128 i 1983, 2, 157—163 odpowiednio.

Adam Kołtataj

XIX ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

Szczecin 26-28 września 1983 r.

W dniach 26—28 września 1983 obradował w Szczecinie XIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W obradach brało udział 481 osób z kraju oraz goście z NRD, Bułgarii, RFN, Szwecji i Wielkiej Brytanii. Otwarcie Zjazdu odbyło się w Auli Pomorskiej Akademii Medycznej, na które przybyli oprócz członków Towarzystwa, przedstawiciele Władz wojewódzkich, miejskich oraz szkół wyższych Szczecina. W czasie uroczystości otwarcia Prezes Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr Kazimierz Zakrzewski wręczył coroczne nagrody Towarzystwa za najlepsze opublikowane prace oraz podziękował organizatorom za przygotowanie XIX Zjazdu. Poinformowano także zebranych, że następny XX jubileuszowy Zjazd odbędzie się w Olsztynie, a przedstawiciel Komitetu Organizacyjnego z Olsztyna otrzymał symboliczny klucz w celu otwarcia podwoi miasta na następne naukowe spotkanie. Na zakończenie uroczystości otwarcia Zjazdu prof. dr Bogusław Halikowski, Dyrektor Instytutu Pediatrii PAM, wygłosił wykład pt.: „Wrodzona, dziedzicznie uwarunkowana kwasica mleczanowa”.

Obrady naukowe Zjazdu rozpoczęły się w godzinach popołudniowych dnia 26 IX 1983 r. równoległe w dwóch salach. W sali Centralnego Klubu Studenckiego „Trans”, Al. Powstańców Wlkp. 20 i w sali Kopernikańskiej przy Państwowym Szpitalu Klinicznym Al. Powstańców Wlkp. 72. Na program XIX Zjazdu złożyły się 4 sympozja oraz sekcja plakatów o różnej tematyce (analityka biochemiczna, biochemia człowieka, zwierząt, roślin, nowotworów, enzymologia oraz inne doniesienia nie mieszczące się w wyżej podanej tematyce).

Sympozjum fluorowe rozpoczęło się od przedstawienia sylwetki i działalności naukowej, zmarłego w 1982 roku dr George Waldbotta, założyciela International Society for Fluoride Research i długoletniego redaktora znanego w świecie kwartalnika „Fluoride”. Na program sympozjum fluorowego (organizator doc. dr Z. Machoy) złożyło się 8 referatów kierunkowych z kraju i z zagranicy. Obradom ogólnym przewodniczyli: doc. dr T. Gumiński (Kraków) i prof. dr M. Kobyłańska (Poznań). W sekcji plakatowej przedstawiono 38 doniesień związanych z toksykologią, terapią, profilaktyką i innymi aspektami metabolizmu fluoru. Sympozjum fluorowe, jako jedyne miało swoją sesję podsumowującą, prowadzoną przez prof. dr M. Gumińską (Kraków). W ożywionej, często kontrowersyjnej, dyskusji starano się wyjaśnić założeń metabolizmu fluoru, zbliżyć stanowiska zwłaszcza w sprawie dylematu fluorować czy nie fluorkować wodę pitną oraz postanowiono kontynuować także w przyszłości sympozja o tematyce fluorowej, z udziałem różnych specjalistów w tym i z zagranicy.

Organizatorem sympozjum „Biochemia miażdżycy” był prof. dr J. Gregorczyk (Szczecin). Sympozjum to prowadzone było sposobem konwencjonalnym. Dwa referaty programowe oraz 13 komunikatów przedstawiono ustnie bez ograniczenia czasu na dyskusję. Podstawowym problemem interesującym biochemików w ostatnim czasie są interakcje w układzie wieloenzymatycznym, jak i wielosubstratowym warunkujące powstawanie miażdżycy oraz określenie sytuacji metabolicznych jako

czynników zagrożenia miażdżycą. W dyskusji brały udział 23 osoby. Ogólnie postulowano, aby co najmniej raz na dwa lata organizować monotematyczne spotkania dotyczące postępów badań nad miażdżycą.

Symposium „Kwasy nukleinowe” prowadził doc. dr T. Gałamon (Szczecin). W programie sympozjum wygłoszono 4 referaty oraz przedstawiono 54 plakaty. W dyskusji nie wyeksponowano problemów dominujących w polskich laboratoriach jak i nie wytyczono nowych kierunków badań na przyszłość. Jednym z kontynuowanych nadal tematów badawczych są poszukiwania nowych antybiotyków jako inhibitorów syntezy RNA oraz stosowanie inżynierii genetycznej dla uzyskania nowych odmian zbóż asymilujących azot z powietrza. Trudności w uzyskaniu odpowiednich izotopów i brak możliwości stosowania szybkich metod analitycznych są przyczyną opóźnień w stosunku do ośrodków zagranicznych.

Organizatorami sympozjum bioenergetycznego byli: prof. dr L. Wojtczak (Warszawa), prof. dr M. Żydowo (Gdańsk) i doc. dr Z. Machoy (Szczecin). Przedstawiono 10 referatów sympozjalnych z kraju i z zagranicy. Obradom przewodniczyli prof. dr M. Żydowo i prof. dr L. Wojtczak. Dyskusje odbywały się po każdym z wygłoszonych referatów. Jak można się zorientować z zamieszczonych w programach tytułów referatów, były to wybrane zagadnienia z transportu przez błony, z fosforylacji, funkcjonowania łańcucha oddechowego i metabolizmu mitochondriów. W sekcji plakatowej prezentowano 53 doniesienia o różnej tematyce. Były one dyskutowane jeszcze przed rozpoczęciem referatów programowych i pochodziły głównie z Gdańska, Warszawy, Wrocławia i Szczecina.

W czasie Zjazdu odbyło się walne zebranie Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, na którym wybrano Władze Towarzystwa. Prezesem został ponownie prof. dr Kazimierz Zakrzewski. Skład Zarządu, jak i podział kompetencji, zostanie zapewne ogłoszony osobnym komunikatem.

Siedziby oddziałów	Ilość referatów i komunikatów	Udział procentowy w stosunku do liczby członków
Warszawa	80	22
Poznań	65	48,5
Łódź	46	33,6
Wrocław	43	46
Lublin	35	51
Szczecin	35	81
Gdańsk	33	67
Białystok	26	66,7
Kraków	20	25
Śląsk	21	33
Olsztyn	12	29
Toruń	4	18

W dniach Zjazdu w salach Klubu „Trans” miała miejsce skromna wystawa zagranicznych firm: Koch-Light Laboratories Ltd, Farmacia, Metrimpex, Oxoid i Inter-Nova oraz stoisko książkowe Szczecińskiego Towarzystwa Naukowego. Towarzystwo to wydrukowało w całości materiały sympozjum fluorowego z 1979 roku („Metabolizm Fluoru” 220 stron). Obszerne streszczenia referatów tegorocznego sympozjum fluorowego ukażą się w numerze 9, 1983 Czasopisma Stomatologicznego. Odrębne omówienie sympozjum fluorowego ma się ukazać w czasopismach „Bromatologia i Chemia Toksykologiczna” oraz „Fluoride” (w języku angielskim). Przewi-

duje się opublikowanie referatów programowych sympozjum bioenergetycznego w „Postęпах Biochemii” w 1984 roku. Zjazdowi towarzyszyło zorganizowanie kilku imprez rozrywkowo-kulturalnych, jak: spotkanie towarzyskie, dyskoteka, filmy kolonowe o tematyce przyrodniczej, autokarowa wycieczka po mieście i zwiedzanie portu statkami Żegluga Szczecińskiej.

W Zjeździe brali udział członkowie ze wszystkich oddziałów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Polsce. W indeksie nazwisk autorów odnotowano 757 osób, gdy w poprzednim Zjeździe w 1970 roku 296 osób. W biurze Zjazdu zarejestrowano 420 osób przyjezdnych a 75 osób zrezygnowało w ostatniej chwili z udziału w Zjeździe. Poniżej przedstawiono ilości referatów i komunikatów z poszczególnych oddziałów prezentowanych w Szczecinie oraz ich procentowy udział w stosunku do liczby członków oddziałów (dane dotyczące liczby członków pochodzą z 1981 roku i zostały opublikowane w „Postęпах Biochemii” tom 27, 2, str. 243).

Pozostałe doniesienia pochodziły z następujących miejscowości: Kielce, Biała Podlaska, Puławy, Siedlce, Bydgoszcz, Kórnik, Jabłonna, Chorzów, Busko-Zdrój, Brwinów, Würzburg i Heidelberg (RFN), Erfurt (NRD), Sofia (Bułgaria), Zürich (Szwajcaria), Szeged (Węgry), Moskwa (ZSRR), Durham, Bethesda i Warren (USA).

Zjazd obradował w okresie jubileuszu 35-lecia istnienia Pomorskiej Akademii Medycznej.

Z. Machoy

Wyciąg z protokołu z XI Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbytego w dniu 27 września 1983 r. w Szczecinie

W zebraniu uczestniczyło 137 członków Towarzystwa. Zebranie otworzył Prezes Towarzystwa, prof. Kazimierz Zakrzewski, proponując na przewodnictwo zebrania prof. Lecha Wojtczaka. Obejmując przewodnictwo prof. Wojtczak poprosił o uczczenie chwilą ciszy pamięci zmarłych zasłużonych biochemików polskich, prof. S. Pożnańskiego, prof. J. Hellera, prof. M. Szymony i prof. W. Drabikowskiego.

Przyjęto następujący porządek obrad.

- Wybór przewodniczącego Walnego Zebrania
- Wybór sekretarza zebrania i powołanie protokółantów
- Wybór Komisji Matki
- Wybór Komisji Skrutacyjnej
- Wybór Komisji Wnioskowej
- Sprawozdanie ustępującego Zarządu Głównego
- Sprawozdanie Komisji Rewizyjnej
- Wybory nowych władz Towarzystwa
- Nadanie godności członka honorowego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego prof. dr Wandzie Mejbaum-Katzellenbogen oraz prof. dr Zofii Zielińskiej
- Ustalenie wysokości składki członkowskiej i związane z tym sprawy organizacyjne w latach 1983—1986
- Kalendarz następnych Zjazdów PTBioch
- Wolne wnioski.

Na Sekretarza zebrania wybrano doc. Z. Wojciechowskiego, na protokółantów dr E. Lenartowicz i dr M. Balińską. Do Komisji Matki zebrani powołali dr A. Jerzmanowskiego, dr J. Stępińskiego i dr K. Zwierza. Przewodniczącym Komisji Skrutacyjnej został doc. J. Popinigis, a do Komisji Wnioskowej wybrano doc. D. Hulanicką, dr L. Paśś i doc. J. Kędziore.

Następnie prof. Zakrzewski przedstawił sprawozdanie ustępującego Zarządu Głównego. Stwierdził w nim, że X kadencja Zarządu Głównego PTBioch rozpoczęła się w roku 1980 w okresie b. trudnym. Trwające od 5 lat ograniczenia finansowe nie tylko uniemożliwiały zakup aparatury, odczynników i części zamiennych, ale objęły również dopływ czasopism i możliwość udziału biochemików w zjazdach i sympozjach nawet krajowych. Polskie Towarzystwo Biochemiczne, całość sytuacji naszej dyscypliny ujęło w MEMORIALE, który wszedł na obrady Sejmowej Komisji Nauki i Postępu Techniki. Tezy Memoriału stanowiły również ogólną wytyczną, którą kierował się w czasie X kadencji Zarząd Główny.

Z przyczyn od Towarzystwa niezależnych liczba zebrań naukowych bardzo zmalała. Jednocześnie jednak Zarząd Główny rozpoczął organizowanie mini-sympozjów z aplikacyjnych dziedzin biochemii. Odbyły się 3 takie spotkania na temat: acylazy penicylinowej, interferonu i wrodzonych kwasów dziecięcych.

Nie mogąc wpłynąć na poprawę zaopatrzenia bibliotek, sporządzono ewidencję dostępności 11 głównych międzynarodowych czasopism biochemicznych o charakterze ogólnym i przekazano ją do poszczególnych oddziałów celem ułatwienia poszukiwań bibliograficznych piśmiennictwa z lat 1980—1982.

Znacznie pogorszyły się finansowe warunki pracy Towarzystwa. Ze względów statutowych składka członkowska nie mogła być podniesiona aż do najbliższego Walnego Zebrania (wrzesień 1983 r.). Dotacja PAN w latach 1981—1982 wzrastała w przybliżeniu proporcjonalnie do wzrostu cen i płac; natomiast w roku 1983 została obniżona do 190 tys. złotych, co jest wartością (numerycznie) najmniejszą na przestrzeni ostatnich 10 lat.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w okresie minionych 3 lat dążył do utrzymania funkcjonowania Towarzystwa i dostosowywania jego działalności do zmieniających się warunków zewnętrznych. Wysiłki Zarządu Głównego X kadencji zmierzały przede wszystkim do zabezpieczenia minimum elementów koniecznych dla pracy intelektualnej, takich jak uczestnictwo w zjazdach, specjalistyczne narady i sympozja oraz informacje biblioteczne.

Po wystąpieniu Prezesa prof. L. Kłyszejko-Stefanowicz odczytała protokół Komisji Rewizyjnej i zgłosiła wniosek o udzielenie ustępującemu Zarządowi absolutorium.

Następnie rozpoczęto dyskusję nad sprawozdaniem i wnioskami Komisji Rewizyjnej. Jako pierwszy zabrał głos prof. M. Żydowo proponując wyrażenie uznania ustępującemu Zarządowi za wydatną i pełną poświęcenia pracę w trudnym okresie. W dalszym ciągu dyskusji prof. J. Augustyniak zapytał o kontakty Zarządu Głównego PTBioch z innymi Towarzystwami Biochemicznymi oraz Federacją Europejskich Towarzystw Biochemicznych. W odpowiedzi prof. K. Zakrzewski stwierdził, że kontakty były utrzymywane, choć utrudnione ze względu na ogólną sytuację. Na ostatnim posiedzeniu Rady FEBS-u obecny był przedstawiciel Towarzystwa, doc. P. Chomczyński.

W dalszym ciągu dyskusji zabrała głos prof. Z. Zielińska, Redaktor Naczelny kwartalnika „Postępy Biochemii”, która poinformowała o niezależnych od Redakcji trudnościach związanych z wydawaniem wymienionego kwartalnika. Powiadomiła również o staraniach Redakcji o wprowadzenie nowych form artykułów (Nowe w biochemii, Z historii biochemii) apelując o dostarczanie tego typu materiałów.

Prof. L. Wojtczak poinformował następnie o liście prof. J. Opieńskiej-Blauth, w którym napisała, że opracowuje historię polskiej biochemii i proponuje utworzenie w PTBioch Sekcji historii biochemii. Popierając inicjatywę prof. Opieńskiej-Blauth, prof. L. Wojtczak stwierdził, że inicjatywa jest cenna, a o potrzebie utworzenia oddzielnej Sekcji zadecyduje Zarząd PTBioch.

W dalszym ciągu dyskusji dr L. Torliński krytycznie ustosunkował się do sesji plakatowych na zjazdach PTBioch i zaproponował organizowanie w przyszłości dyskusji okrągłego stołu. Dr A. Jerzmanowski poinformował o inicjatywie grupy pracowników Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN wydawania dla warszawskiego środowiska biochemicznego biuletynu informacyjnego zawierającego m.in. ogłoszenia o miejscach pracy dla biochemików, krótkie notatki metodyczne, informacje o możliwościach zakupu lub wymiany odczynników, aparatury itp.

Na zakończenie dyskusji prof. L. Wojtczak zaproponował głosowanie nad udzieleniem absolutorium ustępującemu Zarządowi wraz z wyrazami uznania zgłoszonymi przez prof. M. Żydowo. Zebrani jednomyślnie przyjęli wniosek (w głosowaniu nie brali udziału członkowie ustępującego Zarządu).

Następnie przewodniczący Komisji Matki przedstawił listę kandydatów do nowego Zarządu i Komisji Rewizyjnej uzupełnioną zgłoszeniami z sali. Przed rozpoczęciem głosowania prof. K. Zakrzewski, proponowany na Prezesa Towarzystwa na drugą kadencję przedstawił najważniejsze kierunki przyszłego działania Towarzystwa. Są to: działania na rzecz integracji środowiska biochemicznego, zacieśnienia współpracy i zwiększenia przepływu informacji, poszerzenie kontaktów pomiędzy biochemikami a badaczami z dziedzin pokrewnych (genetyka, medycyna, biofizyka), podjęcie działań na rzecz wyjaśnienia sytuacji finansowej Towarzystwa.

Następnie odbyły się wybory, w których w tajnym głosowaniu wybrano:

- | | |
|-------------------------------|--|
| na Prezesa Towarzystwa | — prof. dr Kazimierza Zakrzewskiego z Warszawy |
| na Vice-Prezesa | — doc. dr Magdalenę Fikus z Warszawy |
| na Członków Zarządu: | — doc. R. Wierzbickiego z Łodzi |
| | — prof. J. Kwiatkowską z Wrocławia |
| | — prof. L. Wojtczaka z Warszawy |
| | — doc. T. Wilusza z Wrocławia |
| | — dr W. Janiszowską z Warszawy |
| | — prof. J. Augustyniaka z Poznania |
| | — doc. Z. Żaka z Krakowa |
| | — doc. A. Leonowicza z Lublina |
| | — dr L. Paśś z Warszawy |
| | — doc. H. Wierzbicką z Poznania |
| | — dr B. Skoczylas z Warszawy |
| | — prof. J. Gregorczyka ze Szczecina |
| | — dr T. Wesołowską ze Szczecina |
| | — dr J. Stępińskiego z Gdańska |

Do Komisji Rewizyjnej wybrano:

- doc. Z. Machoya ze Szczecina
- dr B. Czartoryską z Warszawy
- prof. Z. Zielińską z Warszawy.

W imieniu ustępującego Zarządu Głównego prof. K. Zakrzewski zaproponował nadanie godności Członków Honorowych Towarzystwa prof. W. Mejbaum-Katzenellenbogen i prof. Z. Zielińskiej. Prof. K. Zakrzewski przedstawił sylwetki naukowe Kandydatek podkreślając doniosłe osiągnięcia naukowe i wielki wkład w rozwój polskiej biochemii. W dyskusji prof. B. Morawiecka uwypukliła zasługi prof. W. Mejbaum-Katzenellenbogen w stworzeniu wrocławskiej szkoły biochemicznej. Prof. T. Borkowski i doc. D. Hulanicka zwrócili uwagę na wielkie zaangażowanie prof. Z. Zielińskiej w działalność PTBioch. a także działalność w redakcji „Postępów Biochemii”. Na podstawie tajnego głosowania obu Kandydatkom nadano godność Honorowego Członka PTBioch.

W toku dalszej dyskusji ustępujący Skarbnik Towarzystwa, dr W. Janiszowska przypomniała, że składka członkowska wynosi 40 zł. i nie była podwyższana od 1977

roku. W tym czasie nastąpił poważny wzrost kosztów działania Towarzystwa (wzrost cen usług, opłat pocztowych, materiałów biurowych itp.) przy niewystarczającym wzroście dotacji ze strony Polskiej Akademii Nauk. Dr W. Janiszowska zaproponowała podwyższenie składki do 240 zł. Dr Popiński zaproponował składkę w wysokości 200 zł. Prof. Z. Kasprzyk zasugerowała odstąpienie od zasady obowiązkowej prenumeraty „Postępów Biochemii”, motywując tę propozycję wysoką ceną prenumeraty. Prof. Z. Zielińska i prof. K. Zakrzewski sprzeciwili się tej sugestii argumentując, że w sytuacji utrudnionego dostępu do czasopism naukowych, obowiązkowa prenumerata pozwala na utrzymanie ściślejszego kontaktu z najnowszymi osiągnięciami biochemii, szczególnie przez młodych pracowników nauki. Prof. K. Zakrzewski zapewnił, że Zarząd Główny stosował i będzie stosował zasadę obowiązkowej prenumeraty w sposób elastyczny wobec członków nie będących w stanie wносить opłat za prenumeratę. W tej sytuacji prof. Z. Kasprzyk wycofała swój wniosek o zniesienie obowiązkowej prenumeraty „Postępów Biochemii”. Na zakończenie dyskusji prof. L. Wojtczak zaproponował głosowanie nad podniesieniem składki członkowskiej do 200 zł. Wniosek o podwyższenie składki przyjęto przy jednym głosie wstrzymującym się.

Prof. L. Wojtczak z kolei poinformował o propozycjach zorganizowania w następnych latach Zjazdów Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w: Olsztynie — 1984 r.; Krakowie — 1985 r.; Katowicach — 1986 r. Dr Kostyra (przedstawiciel Oddziału w Olsztynie) poinformował, że następny XX Zjazd PTBioch odbędzie się w dniach 18—20 września 1984 r. na terenie Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie-Kortowie. Tematyką zjazdu będzie szeroko pojęta technologia produkcji białka.

Ponieważ wolne wnioski zostały wyczerpane w ogólnej dyskusji Prof. L. Wojtczak zamknął zebranie dziękując w imieniu uczestników organizatorom XIX Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Szczecinie, a w szczególności Przewodniczącemu Komitetu Naukowo-Organizacyjnego, doc. dr Zygmuntowi Machoyowi, za sprawne zorganizowanie Zjazdu i obrad.

SPRAWOZDANIA

Międzynarodowe Sympozjum „Mechanizmy ekspresji genów nowotworowych”, Smolenice (Czechosłowacja), 23—27 maja 1983 r.

W dniach 23—27 maja 1983 r. w Smolenicach odbyło się kolejne Sympozjum Europejskiego Towarzystwa do Badań nad Rakiem. Organizatorami byli pracownicy Instytutu Onkologii w Bratysławie i Instytutu Genetyki Molekularnej w Pradze. W Sympozjum wzięli udział naukowcy z Anglii, Belgii, Bułgarii, Czechosłowacji, Danii, Francji, Holandii, Polski, Stanów Zjednoczonych, Szwecji, Węgier i Związku Radzieckiego. Tematyka Sympozjum dotyczyła onkogenów wirusowych i ich homologów komórkowych (dwie sesje), mechanizmów transformacji komórek (jedna sesja), transformujących genów nowotworowych wirusów DNA (jedna sesja) i wirusów raka sutka (jedna sesja). Zagadnieniom tym poświęcono 18 referatów. Wyniki kilkudziesięciu prac przedstawiono w formie plakatowej.

W przedstawionym sprawozdaniu umieszczono dane i informacje, które zgodnie z odczuciami własnymi, wydają się szczególnie interesujące.

Doskonałym układem modelowym do prób oceny zależności między obecnością genów wirusowych a stanem nowotworowym są nowotwory indukowane przez wirus Rousa (wirus mięsaka kurzego). Wydaje się, że do utrzymania stanu nowotworowego wystarcza obecność niekompletnych prowirusowych sekwencji (Swoboda, Czechosłowacja). Układ ten pozwala również na badania wzajemnych oddziaływań między proonkogenami komórkowymi a cząsteczkami wirusa. Wirus Rousa tracąc w wyniku delekcji transformujący onkogen *src* traci jednocześnie właściwości indukowania nowotworów. Niektóre pozbawione genu *src* mutanty wirusa Rousa w wyniku rekombinacji z onkogenami komórek kurzych mogą przekształcać się w pełnowartościowe wirusy transformujące (rASV). Jest interesujące, że wirus Rousa (szczep Schmidta-Ruppina) powoduje transformację nowotworową tylko niektórych hodowli komórek ludzkich (Rabotti i inn., Francja), prawdopodobnie komórek o określonych cechach genetycznych. Opierając się na danych z badań dotyczących komórek kurzych, autorzy sądzą, że — per analogiam — w niektórych komórkach ludzkich może mieć miejsce rekombinacja genów wirusa Rousa z genami komórkowymi.

Wiele uwagi poświęca się obecnie zagadnieniu identyfikacji proonkogenów w nowotworach ludzkich i określaniu ich funkcjonalnego stanu. Jednym z dowodów aktywacji onkogenów jest zwiększenie ilości wytwarzanych specyficznych RNA. Grupie naukowców radzieckich (Kissieljow i inn.) udało się wykazać, że w licznych nowotworach ludzkich w stanie aktywacji znajduje się przede wszystkim gen *myc*, a ponadto geny *sis* i *ras*.

W komórkach, które uległy transformacji nowotworowej rejestruje się zmiany w procesach metabolicznych, związanych przynajmniej częściowo z różnicowaniem i kontrolą wzrostu. Forchhammer (Dania) zwrócił uwagę na możliwość, że odbiciem zmian w tych procesach mogą być zmiany w strukturze czy ilości białek komórkowych. Współczesne badania w tym zakresie są ukierunkowane dwutorowo. Dotyczą one białek kodowanych przez wirusy i ich funkcji jak i komórkowych białek strukturalnych. Obecne techniki badawcze pozwalają na ilościowe oznaczenie ponad 1000 polipeptydów komórkowych i ocenę różnic w stopniu ich fosforylacji czy gliko-

zylacji. Dotychczas zarejestrowane różnice ilościowe w komórkach nowotworowych mysich, szczurzych lub ludzkich, dotyczą przede wszystkim winkuliny, wimentyny, tropomyozyny i cytokeratyn. W innym z referatów sympozjalnych Ponten (Szwecja) przedstawił współczesne poglądy na rolę czynników wzrostowych. Zwrócił uwagę na ważny fakt, że również komórki nowotworowe wytwarzają czynniki wzrostowe. Może to mieć decydujące znaczenie dla sposobu ich proliferacji.

W ramach sesji poświęconej wirusom DNA zur Hausen (RFN) omawiał różnorodne możliwości udziału tych wirusów w transformacji nowotworowej. Wydaje się, że niektóre wirusy DNA mogą działać jako promotory procesów nowotworowych. Kwas retynowy, który hamuje działanie chemicznych promotorów karcynogenezy hamuje również proces indukcji guzów przez wirus brodawczaka.

Interesujące są wyniki badań uzyskiwane w oparciu o metodę transfekcji. Na przykład DNA wyizolowane z ludzkich nowotworów mózgu transformuje komórki hodowane *in vitro* (Sauer i inn., RFN). Częstość transformacji jest wysoka, a cechy fenotypowe komórek stransformowanych są stabilne. Czynniki transformujące znajduje się w pozachromosomowej frakcji DNA.

W chwili obecnej przedmiotem znacznego zainteresowania jest funkcja antygenu jądrowego występującego w komórkach, w których obecny jest genom wirusa Epstein-Barra. Zagadnienia związane z różnorodnymi właściwościami tego antygenu (EBNA) w aspekcie badań biochemicznych i immunologicznych omówił Vonka (Czechosłowacja). Jest prawdopodobne, że ten niewirusowy, ale kodowany przez wirus antygen, odgrywa kluczową rolę w transformacji blastycznej indukowanej przez wirus Epstein-Barra.

Omawiając zagadnienia związane z wirusem MMTV (wirusem raka sutka u myszy) Dickson (Anglia) przedstawił interesującą koncepcję działania wirusów RNA, które nie posiadają własnych genów transformujących. Tego rodzaju wirusy mogą działać jako czynniki mutagenne lub czynniki aktywujące proonkogeny komórkowe. Konsekwencją przypadkowej inkorporacji wirusa w pobliżu komórkowego proonkogeny jest wzmożona ekspresja tego właśnie proonkogeny. Wirus MMTV nie posiada własnego genu transformującego. W zgodzie z powyższą koncepcją jego udział w przemianie nowotworowej polega na indukowaniu mutacji (lub aktywacji) odpowiedniego genu komórkowego. Według danych naukowców węgierskich (Boldogh i inn.) podobny mechanizm jest odpowiedzialny za transformację nowotworową komórek przez wirus cytomegalii (ludzki wirus DNA). Jest interesujące, że w komórkach myszy o niskiej zapadalności na raka sutka (na przykład C57Bl/10) znajdują się pojedyncze sekwencje wirusa MMTV. W nowotworach indukowanych u tych myszy hormonami liczba sekwencji prowirusowych jest zwiększona (Swec, Czechosłowacja i Michalides, Holandia), co wskazuje na możliwość współudziału prowirusów w indukowaniu nowotworów przez rakotwórcze czynniki niewirusowe.

W trakcie dyskusji ogólnej, którą zakończono obrady w Smolenicach, podsumowano wiadomości dotyczące liczby potencjalnych onkogenów komórkowych, omawiano mechanizmy odpowiedzialne za przekształcenie potencjalnych onkogenów komórkowych w geny onkotwórcze, zastanawiano się nad tym czy ogólne koncepcje dotyczące procesów nowotworowych są zgodne z koncepcją wirusowej etiologii nowotworów, wymieniano również wirusy podejrzane o współudział w etiologii nowotworów ludzkich. Podsumowując pokrótce, wydaje się, że identyfikacja komórkowych proonkogenów nie została jeszcze zakończona. Są przesłanki doświadczalne, że o przemianie proonkogenów w onkogeny może decydować ich aktywacja lub amplifikacja, zmiana w genach aktywnych przez czynniki działające bezpośrednio lub za pośrednictwem zmian w procesach regulacyjnych. Wirusy mogą działać jako czynniki mutagenne, mogą być inicjatorami procesów nowotworowych i promotorami, zakażenie wirusowe może prowadzić do immunosupresji. Na liście wirusów

podejrzanych o współudział w etiologii ludzkich nowotworów znajdują się m.in. wirus Epstein-Barra, wirus hepatitis B, wirus brodawczaka, wirus cytomegalii, wirus krowianki i wirus grypy.

Organizatorom należą się podziękowania za świetny program, sprawną organizację i miłą atmosferę.

J. H. Koziorowska

Kurs FEBS na temat „Enzymy, receptory i przenośniki błon biologicznych” w Szwajcarii (Gwatt, 18–24 września 1983 r., Berno, 26–30 września 1983 r.)

Tegoroczny kurs biochemiczny Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych zorganizowała Szwajcarska Akademia Nauk (SNG) reprezentowana przez profesorów: A. Azziego, U. Brodbecka i P. Zahlera z Uniwersytetu w Bernie. Program kursu składał się z dwóch części: teoretycznej, obejmującej wykłady i eksperymentalnej. W pierwszej z nich wzięło udział ponad 140 biochemików z 21 krajów świata, natomiast w drugiej uczestniczyło ponad 50 osób, w tym 5 z Polski. Zajęcia seminaryjne odbywały się w Centrum Kongresowym w Gwatt położonym u stóp Alp, nad jeziorem Thun. Wykładowcy z czołowych ośrodków biochemicznych Europy i Stanów Zjednoczonych wygłosili 31 około godzinnych wykładów w 6 grupach tematycznych:

- 1) Kodowanie, ekspresja i transport białek błonowych (6 wykładów),
- 2) Struktura błon biologicznych (6 wykładów),
- 3) Enzymy błonowe (3 wykłady),
- 4) Techniki stosowane do badania białek błonowych (6 wykładów),
- 5) Enzymy i przenośniki błonowe (6 wykładów),
- 6) Receptory błonowe (4 wykłady).

W przerwach pomiędzy wykładami toczyły się dyskusje dotyczące komunikatów przedstawionych w czasie trzech sesji plakatowych. Dodatkową możliwość wymiany zdań na temat: białek, lipidów, receptorów oraz genetycznych aspektów błon biologicznych stworzyły tzw. „dyskusje okrągłego stołu”.

Drugi tydzień kursu odbywający się w Uniwersytecie w Bernie wypełniony był pracą eksperymentalną mającą na celu umożliwienie młodym biochemikom zapoznania się z najnowszymi technikami współczesnej biologii błon. Każdy dzień zajęć praktycznych poprzedzony był wykładem dotyczącym jednego z następujących zagadnień metodycznych:

- 1) Określania asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonach (J. A. F. Opden Kamp),
- 2) Znakowania składników błonowych (J. Brunner),
- 3) Włączania błonowych systemów transportu do sztucznych cząstek fosfolipidowych (A. Anner),
- 4) Immunologicznych metod badania błon (G. Bron),
- 5) Krystalizacji białek błonowych (H. Michel).

Eksperymenty odbywały się w 6 grupach tematycznych i dotyczyły:

- 1) Techniki analitycznego rozdziału składników błonowych (m.in. immunoelektroforezy i gazowej chromatografii podziałowej),
- 2) Struktury białek (m.in. krystalizacji białek) i interakcji pomiędzy składnikami błonowymi,
- 3) Specyficznego znakowania składników błonowych (m.in. bakteriorodopsyny i translokazy ADP (ATP),

- 4) Rekonstytucji (m.in. Na,K-ATP-azy, oksydazy cytochromowej),
- 5) Technik spektralnych (m.in. elektronowego rezonansu paramagnetycznego, fluorymetrii),
- 6) Receptorów (m.in. receptora acetylocholinoesterazy).

Duża różnorodność ćwiczeń dawała uczestnikom możliwość wyboru eksperymentów, które mogą stać się pomocne w ich pracy.

Ze względu na duże zainteresowanie wielu osób receptorami prof. M. D. Hollenberg wygłosił dodatkowy nie przewidziany programem wykład na temat receptorów insulinowych.

Organizatorzy kursu wyszli z założenia, że stworzenie okazji do mniej oficjalnych kontaktów może też być okazją do wymiany doświadczeń naukowych. Zorganizowano dwie piękne wycieczki górskie: na Schynige Platte (1967 m n.p.m.) i na Jungfrauoch (3454 m n.p.m.) oraz do skansenu w Ballenberg.

J. Gemel

RECENZJE

Biochemistry

J. D. Rawn, Harper and Row Publishers, New York, 1983, stron 1139.

Czytelnik, który przezwycięży odruch naturalnej niechęci do zbyt opasłych tomów (1139 stron dużego formatu) i weźmie do ręki te trzy kilogramy wiedzy biochemicznej — otrzymuje nagrodę w postaci kontaktu z podręcznikiem o wyjątkowych walorach dydaktycznych.

Przy dzisiejszym stanie wiedzy biochemicznej napisanie pełnego, ogólnego podręcznika biochemii jest zadaniem uciążliwym i niewątpliwie nie istnieje idealny schemat układu materiału, który by był pozbawiony wad i zadowolił wszystkich czytelników. J. D. Rawn wrócił w tym względzie niejako do układu tradycyjnego, poświęcając pierwszą część podręcznika problemom konformacji i funkcji makrocząsteczek biologicznych, a część drugą — metabolizmowi. Trzecia i ostatnia część — biologia molekularna obejmuje problematykę replikacji DNA, transkrypcji, translacji oraz regulacji ekspresji genów.

Podręcznik jest adresowany do czytelnika mającego przygotowanie z chemii organicznej, jego lektura nie wymaga natomiast znajomości chemii fizycznej. Książka charakteryzuje się nowoczesnym ujęciem materiału, zarówno jeśli chodzi o stronę merytoryczną, jak i sposób opisu, czemu towarzyszy jasność wykładu.

Podręcznik wyposażony jest w dużą liczbę rysunków i fotografii modeli cząsteczek przeznaczonych do oglądania przez załączone stereo-okularki w sposób trójwymiarowy (novum, jeśli chodzi o podręczniki o charakterze kursu podstawowego!). Dzięki temu czytelnik w części I podręcznika otrzymuje, oprócz formalnego zapisu subtelności konformacyjnych (np. nukleozydów), przestrzenne obrazy opisywanych małych cząsteczek biologicznych, a następnie — także modele biologicznych makromolekuł, śledząc jednocześnie korelację ich struktury z funkcją.

Sposób przedstawienia przez autora poszczególnych szlaków metabolicznych i ich regulacji w części II podręcznika pozwala czytelnikowi na wyrobienie sobie ogólnej wizji metabolizmu bez zubożenia dokładności opisu, który operuje mechanizmami elektronowymi poszczególnych reakcji, schematami przemian i trójwymiarowymi modelami reagujących cząsteczek.

Na szczególne uznanie zasługuje część III podręcznika. Niezwykle szybki rozwój genetyki molekularnej sprawia, że tej właśnie problematyce poświęcone fragmenty podręczników biochemii starzeją się najszybciej, zmuszając nie tylko dydaktyków, ale również studentów do sięgania po opracowania typu monograficznego. Omawiana część podręcznika Rawn prezentuje stan wiedzy w tej dziedzinie z roku 1982, a czyni to w sposób równie atrakcyjny, poglądowy, przystępny i stosunkowo obszerny, jak części poprzedzające. Czytelnik znajduje tu omówienie szeregu zagadnień, których do niedawna na próżno szukałby w podręcznikach biochemii o charakterze kursu podstawowego, jak np. regulacja syntezy białka na poziomie translacji, dojrzewanie różnych rodzajów RNA (*processing*), geny mozaikowe i składanie transkrybowanego RNA z fragmentów (*splicing*), reperacja DNA, lub — z dziedziny nowocześniejszej metodyki — automatyczna synteza chemiczna fragmentów genów.

Każdy z dwudziestu siedmiu rozdziałów podręcznika kończy się krótkim streszczeniem, które skutecznie pomaga czytelnikowi uporządkować w pamięci obszerny materiał. Czytelnik głębiej zainteresowany zagadnieniem znajduje również po każdym z rozdziałów bibliografię oraz interesujące „Problemy” do samodzielnego rozwiązania.

Na osobną wzmiankę zasługuje przejrzysty układ graficzny podręcznika, duża liczba doskonałych schematów, starannie dobrany materiał fotograficzny i bardzo obszerny indeks.

Książka Rawna ma wszelkie dane po temu, aby stać się niezwykle cenną pomocą zarówno dla dydaktyków, jak i dla studentów i doktorantów różnych kierunków przyrodniczych, przede wszystkim biochemicznych. Pomimo, że obszerność tego podręcznika może nieco ograniczyć krąg jego czytelników, jednak jego wyjątkowe walory dydaktyczne sprawiają, że jest on niewątpliwie wart spolszczenia, zwłaszcza w obecnej sytuacji, gdy jedyny wydany w języku polskim podręcznik, z którym można by porównywać książkę Rawna, „Biochemia” A. Leningera jest tłumaczeniem wydania sprzed lat jedenastu. Nie trzeba chyba dodawać, że warunkiem podjęcia tłumaczenia omawianego podręcznika winno być zapewnienie możliwie krótkiego cyklu wydawniczego, w innym bowiem przypadku podręcznik ten utraci jedną ze swych głównych zalet — nowoczesność, podobnie jak to się niestety stało z szeregiem innych tłumaczonych u nas podręczników biochemii.

Ewa Kulikowska

L. A. Blumenfeld

Problems of Biological Physics

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1981, str. 224, cena 60 DM.

Jest to monografia traktująca o wybranych zagadnieniach współczesnej biofizyki, głównie o roli metod statystycznych w badaniu mechaniki procesów biologicznych.

Autor na początku stwierdza, że wszystkie znane prawa fizyki są wystarczające dla pełnego opisu i zrozumienia struktury oraz funkcjonowania wszystkich istniejących systemów biologicznych. Wychodząc z tego założenia, w siedmiu kolejnych rozdziałach książki autor omawia zasadę uporządkowania struktur biologicznych, termodynamicznie niezrównoważone zależności fenomenologiczne, zastosowania statystyki do badania struktury linearnych biopolimerów, ich konformacyjne i konfiguracyjne przemiany, dalej mówi o zagadnieniach fizyki w katalizie enzymatycznej, o transporcie elektronów w układach biologicznych oraz o wewnątrzkomórkowej akumulacji i transformacji energii. Jak widać autor wybrał do dyskusji te podstawowe zagadnienia współczesnej biofizyki, które jest stosunkowo łatwo poddać statystyczno-fizycznemu opisowi i interpretacji.

We współczesnej biologii stawia się jednak pytania o znaczeniu fundamentalnym, które nie zawsze daje się wyjaśnić za pomocą konwencjonalnej matematyki i fizycznych zasad mechaniki kwantowej. Na przykład, jak powstała pierwsza komórka jako całkowicie zintegrowany ustrój z jej mechanizmem replikacyjnym i całym systemem procesów autokatalitycznych? Albo, jakim podejściem matematycznym wyjaśnić niehomogenność, indywidualność molekularną materii żywej? Jakie numeryczne wartości można by zastosować określające średniego osobnika, klasę, gatunek, itd.? Ilość odchyień na poziomie molekularnym jest tak wielka, że operacje uśredniające byłyby tu bezsensowne.

Podobnych pytań jest więcej — choćby na temat różnicowania się komórek, kształtowania informacji, adaptacja, autonomiczność materii żywej itd. W wyjaśnianiu tych zagadnień niezbędne jest podejście zarówno ewolucyjne jak i holistyczne, których jednak nie daje się ująć w formę matematyczną, tzn. traktować je za pomocą konwencjonalnej analizy matematycznej. W rozdziale II, „The ordering of biological structures” (str. 17) autor pisze, że „zdolność do tworzenia nowej informacji, tj. nadanie znaczenia określoneemu porządkowi, jest prawdopodobnie niezbędną właściwością materii żywej... Nazywamy takie systemy żywymi, które są samoreprodukujące się i zdolne do tworzenia informacji, która bądź bezpośrednio lub pośrednio wpływa na ich zdolność samoodtworzenia się”. Ileż w tych dwóch zdaniach problemów do wyjaśnienia, które jednak nie należą do zasad fizyki. W zakończeniu tego rozdziału autor przyznaje, że w biologii liczy się jakość informacji a nie ilość i, że rozszyfrowanie tego zagadnienia będzie miało zasadnicze znaczenie w rozwoju teoretycznej biologii, ale równocześnie wyraża sceptycyzm czy uda się tego dokonać. Trzeba przyznać, że autor w wielu miejscach książki wskazuje na tzw. „problemy” w biologii, dla których rozwiązania na razie nie znajduje się stosownego podejścia.

Najciekawsze z punktu widzenia teoretycznej biologii są rozdziały 3, 4 i 6, choć pozostałe zawierają więcej szczegółowych informacji na temat omawianych procesów fizykochemicznych w komórce. Książka napisana jest z dużym znanstwem zagadnień biologicznych, wyjaśnia w sposób przystępny te wszystkie procesy fizykochemiczne w systemach biologicznych, które dobrze tłumaczą zasady ich właściwości i funkcjonowania, wskazując równocześnie, że wiele obecnych koncepcji jest niejasnych i nieadekwatnych do stopnia komplikacji zjawisk życiowych. Wydana w Springerowskiej serii „Synergetyka” jest doskonałą lekturą dla wszystkich zajmujących się biologią teoretyczną, a zwłaszcza zagadnieniami fizykochemicznymi w odniesieniu do kształtowania informacji poprzez strukturę biopolimerów, wytwarzania i wykorzystania energii dla użytecznej pracy w komórce, oraz zagadnień fizycznych w katalizie enzymatycznej.

W. S. Ostrowski

Subcellular Biochemistry
Red. D. B. Roodyn

Tom 9, Plenum Press, 1983, New York i London, stron XVI+425, cena 52,50 \$

Tom 9, podobnie jak inne tomy tej serii przynosi artykuły heterogenne tematycznie i objętościowo. Założeniem wydawnictwa jest bowiem prezentowanie różnych zagadnień i technik z zakresu biochemii i biologii komórki.

Tom otwiera obszerny, bo liczący aż 236 strony, artykuł H. Plattnera i H. P. Zingsheima omawiający zastosowanie różnych technik mikroskopii elektronowej w dziedzinie badań określanej jako biologia komórki oraz w biologii molekularnej. Celem artykułu, jak piszą jego autorzy, jest krytyczne przedstawienie używanych obecnie standardowych metod ze szczególnym zwróceniem uwagi na te spośród nich, które będą służyć w rozwiązywaniu perspektywicznych problemów badawczych. Szczegółowo omówiono w artykule zastosowanie mikroskopii elektronowej do badań nad cytochemiczną lokalizacją enzymów, wykrywania wewnątrzkomórkowych połączeń przy użyciu różnych substancji znacznikowych, w immunocytochemii (lokalizacja antygenu), w badaniach z użyciem lektyn oraz w wykrywaniu receptorów wiążących specyficzne ligandy. Przedstawiono także korzyści, jakie daje zasto-

sowanie mikroskopii elektronowej i autoradiografii oraz mikroskopii i mikroanalizy rentgenowskiej. Oprócz podstaw teoretycznych stosowanych metod czytelnik znajdzie w artykule szereg informacji technicznych dotyczących utrwalania, dehydratacji i zatapiania preparatów, a także technik kriogennych, a wśród nich techniki mrożenia-rytowania (ang. *freeze-etching*). Osobno omówiono zastosowanie mikroskopii elektronowej w badaniach kwasów nukleinowych.

Rozdział drugi tomu napisany przez R. J. Ellisa z Uniwersytetu w Warwick (Anglia) dotyczy syntezy białek chloroplastów. Autor omawia w nim podstawowe problemy dotyczące tego zagadnienia. Przedstawione dane świadczą że: 1. większość białek (polipeptydów) jest kodowana przez geny jądrowe i synteza ich zachodzi na rybosomach cytoplazmatycznych; 2. polipeptydy jako wolne przedostają się do chloroplastów poprzez ich błonę w procesie post-translacyjnym; 3. genom chloroplastowy jest odpowiedzialny za kodowanie ok. 100 polipeptydów i jest istotny dla funkcji fotosyntetycznej; 4. białka i RNA kodowane przez genom chloroplastowy nie są eksportowane na zewnątrz; 5. światło nie jest konieczne dla syntezy i transportu polipeptydów, ale wpływa stymulująco na ich akumulację wewnątrz chloroplastów.

Rozdział trzeci tomu dotyczy nowego rodzaju nukleoprotein, których obecność stwierdzono w oocytach płazów w okresie prewitellogenezy. W okresie tym powstaje znaczny nadmiar 5S RNA w stosunku do 28S i 18S RNA. Nadmiar 5S RNA nie wbudowany do rybosomów tworzy kompleksy z białkami i tRNA sedymentujące przy 7S i 42S. Kompleksy te autorzy (H. Denis i M. la Maire z Centrum Genetyki Molekularnej z Gif-sur-Yvette) nazywają „*thesaurisomes*” przypisując im rolę swoistych śpichlerzy w których cząsteczki RNA byłyby chronione przed enzymami degradującymi.

W kolejnym rozdziale tomu, R. F. A. Zwaal i E. M. Bevers z Uniwersytetu Limburskiego w Maastricht zajmują się kwestią asymetrycznego rozmieszczenia fosfolipidów w błonie plazmatycznej płytek krwi oraz znaczenia zmian składu fosfolipidowego w zewnętrznej warstwie monomolekularnej, jakie występują podczas „aktywacji” płytek dla proces krzepnięcia.

Rozdział ostatni napisany przez F. S. Sjöstranda z Uniwersytetu Kalifornijskiego w Los Angeles poświęcony jest analizie strukturalnej błon biologicznych o różnej funkcji. Rozdział ten stanowi dobrą ilustrację i uzupełnienie rozdziału pierwszego traktującego o nowoczesnych technikach mikroskopii elektronowej. Sjöstrand omawia strukturę i funkcję mitochondriów, tzw. dysków zawierających element światłoczuły oraz błony plazmatycznej zwracając uwagę, iż przyjmowane ich modele są znacznym uproszczeniem stanu rzeczywistego. Szereg jego stwierdzeń budzi kontrowersje. Jako przykład może posłużyć proponowane przez niego ułożenie kompleksu ATP-azy mitochondrialnej („grzybka”) równoległe do płaszczyzny błony wewnętrznej.

Tom uzupełnia wprowadzenie oraz krótkie omówienie kilku wybranych nowych książek napisane przez jego Redaktora. Czy tom 9 Subcellular Biochemisty spełnia zamierzenia wydawnictwa i przyczyni się do bardziej całościowego spojrzenia na komórkę? Sądzę, że tak.

J. Zborowski

XXI ZJAZD POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

K O M U N I K A T

Polskie Towarzystwo Biochemiczne informuje, że kolejny XXI Ogólnopolski Zjazd Biochemiczny odbędzie się w Krakowie w dniach od 25 do 27 września 1985 r.

Program naukowy Zjazdu

- I. Temat wiodący — Zmiany struktury biologicznych makrocząsteczek związane z ich funkcją
organizator — Zdzisław Żak

Sympozja

- A. Cukrzyca doświadczalna jako model cukrzycy klinicznej
organizator — Maria Sarnecka-Keller
- B. Fizjologiczne peptydy — struktura i działanie na komórki docelowe
— hormony przewodu pokarmowego i peptydy neuroregulacyjne
— peptydowe czynniki wzrostu komórkowego
— peptydy immunoregulacyjne
organizator — Andrzej Klein
- C. Fosfohydrolazy
organizator — Włodzimierz Ostrowski
Przewidywany jest udział gości zagranicznych
- D. Biochemia leukocytów i makrofagów — enzymy proteolityczne i mechanizmy niszczenia bakterii
organizatorzy — Aleksander Koj, Jerzy Naskalski, Jan Maciej Zgliczyński
Przewiduje się udział gości zagranicznych oraz druk materiałów przedstawionych podczas Zjazdu
- E. Ekotoksyny i biochemiczne mechanizmy ich działania
organizator — Maria Gumińska

II. Sesja plakatowa na tematy różne.

Zainteresowanych udziałem w XXI Zjeździe P. T. Bioch. prosimy uprzejmie o nadsyłanie odpowiedzi na Karcie Zgłoszenia. Komunikat II, informujący o trybie nadsyłania streszczeń, wnoszenia opłat za uczestnictwo, rezerwacji hoteli i udział w imprezach towarzyszących zostanie przesłany osobom, które dokonają zgłoszenia w nieprzekraczalnym terminie do dnia 15 listopada 1984 r.

Komitet Organizacyjno-Naukowy
XXI Zjazdu
Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
Doc. dr hab. Zdzisław Żak
Instytut Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

<http://rcin.org.pl>

KOMUNIKAT

Polskiego Towarzystwa Medycyny Nuklearnej

Komitety Założycielski uprzejmie informuje, że zostało założone i rozpoczęło działanie Polskie Towarzystwo Medycyny Nuklearnej.

Celem Towarzystwa jest rozwijanie i propagowanie polskiej medycyny nuklearnej, inspirowanie członków do twórczej pracy naukowej i stałego podnoszenia ich kwalifikacji zawodowych, oraz wykorzystywanie nowych zdobyczy nauki w praktyce.

Członkiem zwyczajnym Towarzystwa może być lekarz zainteresowany lub działający w dziedzinie medycyny nuklearnej, jak również osoba o wykształceniu medycznym średnim, bądź też wykształceniu niemedycznym wyższym lub średnim, zajmująca się zawodowo tą dyscypliną.

Zainteresowanych prosimy o nadsyłanie zgłoszeń na adres:

Doc. dr hab. med. Anna Tarkowska
Zakład Medycyny Nuklearnej AM
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8
Tel. 77-63-91.

SPIS TREŚCI

Sylwetka Profesora Witolda Drabikowskiego 3

Nowe w Biochemii:

A. D. Inglot—Kilka uwag o kontroli wzrostu i różnicowania komórek przez hormono-podobne czynniki tkankowe 5

R. Farbiszewski—Hormono-podobne czynniki tkankowe transformujące wzrost komórek 9

J. Fronk—Krystalograficzne uszczegółowienie struktury peroksydazy glutationowej 13

Minireviews:

T. Jakubowicz—Genetyczna regulacja wiązania wolnego azotu . . . 15

M. Barciszewska—Ogólna metoda analizy sekwencji nukleotydów w transferowych kwasach rybonukleinowych 19

Artykuły przeglądowe:

M. Boguta, A. Putrament—Geny globinowe człowieka: ich budowa i układ w chromosomach 27

J. Jaruzelska, R. Słomski—Geny niskocząsteczkowych jądrowych RNA 53

J. Ciesiołka, W. J. Krzyżosiak—Dynamiczne aspekty struktury częsteczki drożdżowego tRNA^{phe} 71

S. Pikula, M. G. Sarzała—Asymetria błon biologicznych — rozmieszczenie lipidów i niektórych białek enzymatycznych w płaszczyźnie poprzecznej błony 107

E. Ziętkiewicz, R. Słomski—Zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji o znaczeniu biologicznym do komórek 149

K. Czyżewska—Heterogenność gatunkowa i narządowa sulfataz arylowych 173

Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:

XIX Zjazd P.T.Bioch. 195

Wyciąg z protokołu z XI Walnego Zebrania Członków P.T.Bioch. 197

Sprawozdania:

Międzynarodowe Sympozjum „Mechanizmy ekspresji genów nowotworowych”, Smolenice (Czechosłowacja), 1983 (J. H. Koziorowska) 201

Kurs FEBS na temat „Enzymy, receptory i przenośniki błon biologicznych”, Gwatt, Berno, Szwajcaria, 1983 (J. Gemel) 203

Recenzje:

Biochemistry (rec. E. Kulikowska) 205

Problems of Biological Physics (rec. W. S. Ostrowski) 206

Subcellular Biochemistry (rec. J. Zborowski) 207

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1984

ARTICLES IN POLISH

Volume 30

Number 1—2

Professor Witold Drabikowski (obituary)	3
Biochemical News	5

Minireviews:

T. Jakubowicz—Genetic Regulation of Free Nitrogen Binding (Dept. Mol. Biol., Microb. Inst., Lublin)	15
M. Barciszewska—General Method of Transfer Ribonucleic Acids Sequence Analysis (Dept. Bioorg. Chem. Pol. Acad. Sci., Poznań)	19

Articles:

B. Boguta, A. Putrament—Human Globin Genes: Their Structure and Organization in Chromosomes (Inst. Bioch. Bioph. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	27
J. Jaruzelska, R. Słomski—Genes Coding for Small, Nuclear RNA (Dept. Human Genetics, Poznań)	53
J. Ciesiołka, W. J. Krzyżosiak—Dynamic Aspects of the Structure of the Yeast tRNA ^{Phe} Molecule (Dept. Bioorg. Chem. Pol. Acad. Sci., Poznań)	71
S. Pikuła, M. G. Sarzała—Asymmetry of Biological Membranes—Localization of Lipids and Some Enzymatic Proteins in the Transversal Plane of Membrane (Dept. Muscle Bioch. and Contractive Systems, Inst. Exp. Biol. Pol. Acad. Sci., Warszawa)	107
E. Ziętkiewicz, R. Słomski—Use of Liposomes as Carriers in the Transfer of Substances of Biological Importance into Cells (Dept. Human Genetics, Poznań)	149
K. Czyżewska—Species and Organs Heterogeneity of Arylsulphatases (Dept. Patophysiol., Med. Academy, Poznań)	173
Cronicle of the Polish Biochemical Society	195
Meeting Reports	201
Book Reviews	205

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

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

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

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

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

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

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

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

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

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

Piśmienictwo: w artykule należy cytować prace oryginalne z ostatnich kilku lat oraz najważniejsze artykuły przeglądowe omawiające przedstawioną dziedzinę z uwzględnieniem artykułów opublikowanych w „Postęпах Biochemii”. W tekście należy podawać jedynie nazwiska badaczy, których prace mają podstawowe znaczenie w przedstawianej dziedzinie. Omawiane prace trzeba numerować w kolejności ich cytowania w tekście. Wykaz piśmiennictwa zatem obejmuje prace opatrzone kolejnymi numerami, ale nie uporządkowane alfabetycznie. Odnosniki bibliograficzne winny mieć formę zalecaną przez Komisję Wydawców Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemików (IUB) według *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 271, 1 np.

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

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

Dixn M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co., London;
Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1–58; Academic Press, London.

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

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

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

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

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

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

SPIS TREŚCI

Sylwetka Profesora Witolda Drabikowskiego	3
Nowe w Biochemii:	
A. D. Inglot—Kilka uwag o kontroli wzrostu i różnicowania komórek przez hormono-podobne czynniki tkankowe	5
R. Farbiszewski—Hormono-podobne czynniki tkankowe transformujące wzrost komórek	9
J. Fronk—Krystalograficzne uszczegółowienie struktury peroksydazy glutationowej	13
Minireviews:	
T. Jakubowicz—Genetyczna regulacja wiązania wolnego azotu	15
M. Barciszewska—Ogólna metoda analizy sekwencji nukleotydów w transferowych kwasach rybonukleinowych	19
Artykuły przeglądowe:	
M. Boguta, A. Putrament—Geny globinowe człowieka: ich budowa i układ w chromosomach	27
J. Jaruzelska, R. Słomski—Geny niskocząsteczkowych jądrowych RNA	53
J. Ciesiołka, W. J. Krzyżosiak—Dynamiczne aspekty struktury cząsteczki drożdżowego tRNA ^{Phe}	71
S. Pikuła, M. G. Sarzała—Asymetria błon biologicznych—rozmieszczenie lipidów i niektórych białek enzymatycznych w płaszczyźnie poprzecznej błony	107
E. Ziętkiewicz, R. Słomski—Zastosowanie liposomów w przenoszeniu substancji o znaczeniu biologicznym do komórek	149
K. Czyżewska—Heterogenność gatunkowa i narządowa sulfataz arylowych	173
Kronika Polskiego Towarzystwa Biochemicznego:	
XIX Zjazd P.T.Bioch.	195
Wyciąg z protokołu z XI Walnego Zebrania Członków P.T.Bioch.	197
Sprawozdania:	
Międzynarodowe Sympozjum „Mechanizmy ekspresji genów nowotworowych”, Smolenice (Czechosłowacja), 1983 (J. H. Koziowska)	201
Kurs FEBS na temat „Enzymy, receptory i przenośniki błon biologicznych”, Gwatt, Berno, Szwajcaria, 1983 (J. Gemel)	203
Recenzje:	
Biochemistry (rec. E. Kulikowska)	205
Problems of Biological Physics (rec. W. S. Ostrowski)	206
Subcellular Biochemistry (rec. J. Zborowski)	207