

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

PSTBAH 21 (2)  
119-271 (1975)

1975

tom 21 nr 2



PW

PAŃSTWOWE  
WYDAWNICTWO  
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły przeglądowe z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podawanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

**Forma maszynopisu:** Maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie.

**Układ maszynopisu:** strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy, adres pocztowy na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu 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), jego (ich) stanowisko(a) i 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 korzystny jest często podział na rozdziały oznaczone liczbami rzymskimi. Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1975 TOM 21 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Psiboh 21(2)  
119-271(1975)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

## RADA REDAKCYJNA

*Przewodniczący:* K. Zakrzewski (Warszawa)

*Członkowie:* M. Bagdasarian (Warszawa), M. Chorąży (Gliwice),

J. Gregorzczak (Szczecin), W. Mejbaum-Katzenellebogen (Wrocław),

A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (Poznań)

## REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

## SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Landman

## KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardel (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), M. Fikus (Warszawa),

B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa),

S. Lewak (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa),

I. Szumiel (Warszawa)

## Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1975

Nakład 2148+122

Ark. wyd. 12,5 ark. druk. 9,75

Pap. druk. sat. kl. V, 70 g 70×100

Zam. nr 75/75

B-34

Oddano do składania 11.I.75.

Podpisano do druku w kwietniu 1975 r.

Druk ukończono w maju 1975 r.

Cena zł 20.—

DRUKARNIA IM. REWOLUCJI PAŹDZIERNIKOWEJ, WARSZAWA



WITOLD JACHYMCZYK \*)

## Rola kompleksów mRNA z białkiem w regulacji procesu translacji

### The Role of Ribonucleoprotein Complexes of mRNA in Translation

Informacja genetyczna o funkcjonalnej i strukturalnej organizacji komórki, zapisana sekwencją nukleotydów w DNA, dotyczy głównie programu syntezy swoistych białek komórkowych. Ponieważ w czasie podziałów mitotycznych następuje wierna replikacja DNA i każda komórka somatyczna organizmu zawiera całą informację genetyczną, należy przyjąć, że proces różnicowania się i specjalizacji komórek jest wynikiem wyboru tylko pewnych, ściśle określonych informacji i można go sprowadzić do zagadnienia regulacji biosyntezy białka. Początkowo badania nad mechanizmem regulacji biosyntezy białka koncentrowały się na analizie tego procesu u mikroorganizmów i dotyczyły przede wszystkim regulacji syntezy informacyjnego kwasu rybonukleinowego (mRNA). W wyniku tych badań Jacob i Monod (1, 2) zaproponowali powszechnie dziś akceptowany model regulacji zakładający odwracalne blokowanie transkrypcji genów. Zgodnie z tą teorią przyjmowano, że nowo zsyntetyzowany mRNA jest zawsze natychmiast i niejako automatycznie zużywany do produkcji odpowiednich białek. Wkrótce jednak okazało się, że w wielu przypadkach stosunkowo długi okres czasu może dzielić syntezę cząsteczek mRNA od realizacji zawartej w nim informacji. Zjawisko to wskazywało, że w komórkach istnieje sposób okresowego blokowania aktywności gotowych cząsteczek informacyjnego RNA, a więc nie tylko transkrypcja ale także translacja może zachodzić w sposób wybiórczy. Odnosi się to głównie do komórek eukariotów, w których obydwie te procesy są przestrzennie rozdzielone. W wyniku ewolucji organizmów prokariotycznych do

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

Wykaz stosowanych skrótów: mRNA — informacyjny kwas rybonukleinowy; pre-mRNA — jądrowy kwas rybonukleinowy, prekursor mRNA; ml-RNA — kwas rybonukleinowy podobny do informacyjnego (ang. *messenger-like RNA*); HnRNA — heterogenny jądrowy kwas rybonukleinowy; D-RNA — jądrowy kwas rybonukleinowy o składzie zasad podobnym do kwasu dezoksyrybonukleinowego (ang. *DNA-like RNA*); mRNP — kompleksy rybonukleoproteidowe mRNA; poli(U) — kwas poliurydylowy; poli(A) — kwas poliadenylowy; poli(T) — kwas politymidylowy; poli(UC) — kwas poliurydylocytydylowy; poli(UG) — kwas poliurydyloguanylowy.

eukariotycznych nie tylko ogromnie wzrosła ilość informacji, która znajduje się w dyspozycji organizmu, lecz również nastąpiło rozbudowanie i zróżnicowanie systemu regulacyjnego w wysoko wyspecjalizowany mechanizm kierujący syntezą mRNA oraz jego przemianami w czasie transportu w obrębie jądra komórkowego i cytoplazmy, a także procesami właściwej translacji.

W ostatnim okresie pojawiły się różne hipotezy i sugestie dotyczące mechanizmu regulacji aktywności mRNA. Niektóre z nich zostały już wcześniej opisane w artykułach opublikowanych w *Postęпах Biochemii* (3, 4). W niniejszym artykule zostaną omówione wyniki badań nad udziałem połączeń białkowych z mRNA w regulacji jego aktywności. Połączenia te, jak się wydaje, odgrywają główną rolę w regulacji procesu translacji.

## I. Występowanie i charakterystyka białkowych połączeń mRNA

Najwcześniejsze dane o występowaniu cząstek rybonukleoproteidowych zawierających mRNA pochodzą z badań nad biogenezą białek i kwasów nukleinowych w okresie oogenezy i wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego jeźowców morskich oraz niektórych ryb i płazów (5—10). W licznych doświadczeniach wykazano, że w dojrzałych, niezapłodnionych jajach biosynteza białka nie zachodzi lub jej poziom jest bardzo niski (15, 16). Podobnie nieaktywne są wydzielone z nich układy bezkomórkowe (11, 18, 19), co początkowo tłumaczono brakiem lub modyfikacją któregoś ze składników aparatu biosyntezy białka. Wysuwano przypuszczenia o inaktywacji rybosomów (11, 12), modyfikacji cząsteczek tRNA (13), występowaniu w cytoplazmie niezapłodnionych jaj inhibitorów biosyntezy białka (6), a zwłaszcza szeroko dyskutowano możliwość braku mRNA. Za ostatnim przypuszczeniem przemawiały spostrzeżenia wskazujące na brak polisomów w dojrzałych, niezapłodnionych komórkach jajowych (14, 15, 16). Przypuszczenia te nie znalazły jednak potwierdzenia w wynikach późniejszych badań. Tak np. wykazano, że rybosomy wydzielone z niezapłodnionego jaja aktywnie włączają aminokwasy po dodaniu poli (U), poli (UG) lub poli (UC) (12, 13, 18, 19, 20). Okazało się także, że wszystkie czynniki rozpuszczalne biorące udział w syntezie białka są w pełni aktywne w komórkach niezapłodnionych jaj (20, 21). Za występowaniem zaś mRNA w niezapłodnionych jajach przemawiały liczne obserwacje i dane pośrednie. Ustalono, że biosynteza białka rozpoczyna się już w kilka minut po zapłodnieniu lub partenogenetycznym pobudzeniu jaja i przebiega bez syntezy nowego RNA. Tak np. pobudzone do rozwoju bezjądrowe fragmenty jaj jeźowca syntetyzują białko z taką samą szybkością jak zarodki normalne (19, 23, 24). Naświetlanie jaj piskorza (*Misgurnus fossilis*) letalnymi dawkami pro-



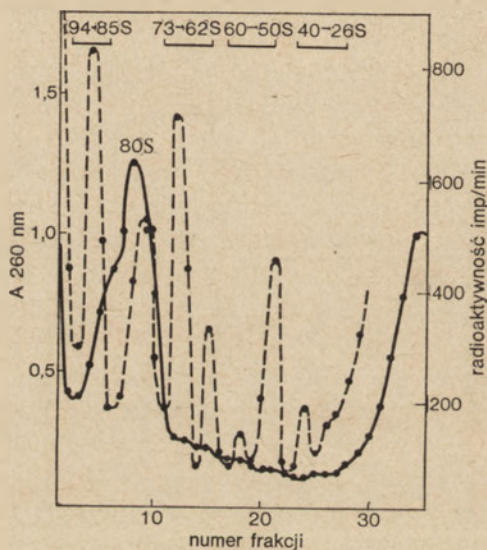
mieni X w okresie pierwszych etapów embriogenezy powodowało przerwanie rozwoju zarodka dopiero po zakończeniu stadium moruli. Do tego etapu rozwój przebiegał zawsze w sposób normalny (25). Podobnie aktynomycyna D dodana w stężeniu całkowicie hamującym syntezę RNA nie miała wpływu na syntezę białka i rozwój zarodków aż do stadium blastuli (15, 16, 17). Nie stwierdzono również różnic w obrazach elektroforetycznych białek komórek zarodków normalnych i rozwijających się w obecności tego antybiotyku (26, 27).

Ponieważ w bezjądrowych fragmentach jaj jak i w zarodkach traktowanych aktynomycyną D nie ma możliwości transkrypcji genów, niezapłodnione jaja muszą więc posiadać mRNA, ale w postaci uniemożliwiającej jego translację; zapłodnienie lub inny sposób pobudzenia do rozwoju komórek jajowych powoduje uruchomienie czynników odblokowujących informację zawartą w mRNA

W ostatnim okresie ukazały się doniesienia wskazujące, że nieaktywne, zablokowane formy mRNA występują powszechnie. Stwierdzono ich obecność w nasionach roślin, gdzie podobnie jak w komórkach jajowych służą do syntezy białek w początkowym okresie rozwoju. Zarodki dojrziałych, suchych nasion podobnie jak niezapłodnione komórki jajowe są metabolicznie nieaktywne. Poziom biosyntezy białka jest w nich bardzo niski, a w preparatach subkomórkowych nie obserwuje się obecności polisomów. Zainicjowanie kiełkowania nasion, podobnie jak zapłodnienie komórek jajowych, powoduje szybki wzrost syntezy białka, czemu towarzyszy wzrost ilości polisomów (28, 29, 30, 31) a aktynomycyna D nie wywiera hamującego wpływu na ten proces (34). Biosynteza białka i związane z tym procesem formowanie się polisomów wyprzedza znacznie syntezę nowego RNA. Np. w zarodkach grochu biosynteza białka rozpoczyna się już w ciągu jednej do dwóch godzin od momentu namoczenia nasion, podczas gdy włączanie radioaktywnej urydyny świadczącej o syntezie RNA rozpoczyna się dopiero po upływie 20 godzin (32, 33). Ta różnica w czasie sugeruje, że w początkowym okresie kiełkowania musi następować aktywacja cząsteczek mRNA znajdujących się w komórkach suchych nasion. Brak wpływu aktynomycyny D na proces biosyntezy białka świadczący o obecności zablokowanych form mRNA obserwuje się także podczas metamorfozy owadów *Tenebrio molitor* (32a). O obecności zablokowanych form mRNA w erytrocytach można wnioskować na podstawie analizy dynamiki syntezy RNA i hemoglobiny w czasie biogenezy erytrocytów. Stwierdzono, że synteza hemoglobiny osiąga maksimum dopiero w normoblastach, to jest już po całkowitym ustaniu syntezy RNA (35). Przesunięcie w czasie między syntezą RNA i syntezą białka, wskazujące na istnienie zamaskowanych form mRNA obserwowano także podczas biosyntezy fibroiny jedwabiu jedwabnika (36), hemoglobiny płodowej (37), białek spor *Bacillus cereus* (38) i *Phycomyces* (40), białek konidiów *Neurospora crassa* (39) i *Neurospora tabacina*

(41) oraz u *Escherichia coli* podczas syntezy proteaz wydalanych do podłoża (42).

Wkrótce po wykryciu zablokowanych form mRNA w komórkach, udało się wykazać, że czynnikiem powodującym zahamowanie aktywności matrycowej mRNA są cząsteczki białkowe. Specyficzne cząsteczki rybonukleoproteidowe zawierające mRNA po raz pierwszy zostały wydzielone przez Spirina z zarodków ryby *Misgurnus fossilis* (5, 6, 9). Wierowanie w gradiencie stężeń sacharozy homogenatów tych zarodków hodowanych do stadium późnej blastuli lub gastruli pozwoliło na wyodrębnienie szeregu frakcji cząstek rybonukleoproteidowych, różnych od rybosomów i ich podjednostek, które sedimentują w zakresie od 20S do około 110S. Kompleksy te zostały nazwane przez Spirina informosomami. Obraz rozdziału tych kompleksów przedstawiono na rycinie 1.



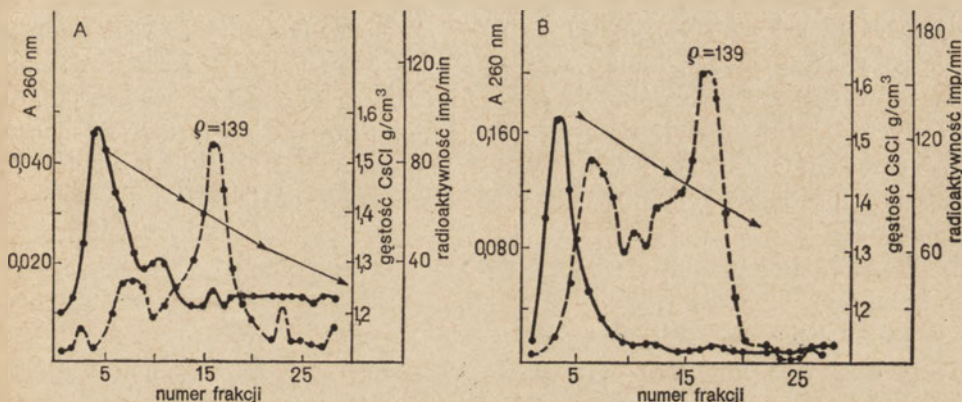
**Ryc. 1.** Analiza stałych sedimentacji w gradiencie stężeń sacharozy ekstraktu cytoplazmatycznego zarodków *Misgurnus fossilis* (43).

● — ● — absorpcja przy 260 nm  
● - - - ● — radioaktywność

Wykryte przez Spirina w rozwijających się zarodkach ryb cząstki rybonukleoproteidowe ulegają szybkiemu znakowaniu po podaniu radioaktywnych prekursorów RNA. Można je również wyznakować przez podanie radioaktywnych aminokwasów, przy czym oba typy radioaktywności występują dokładnie w tych samych miejscach gradientu sacharozy, co świadczy że w skład kompleksów wchodzi zarówno cząsteczki nowo zsyntetyzowanego RNA jak i białka (43). Kompleksy te, po stabilizacji formaldehydem, wykazują w gradiencie chlorku cezu charakterystyczną gęstość pozorną, mieszczącą się w obszarze 1,40—1,45 g/cm<sup>3</sup>, pod-



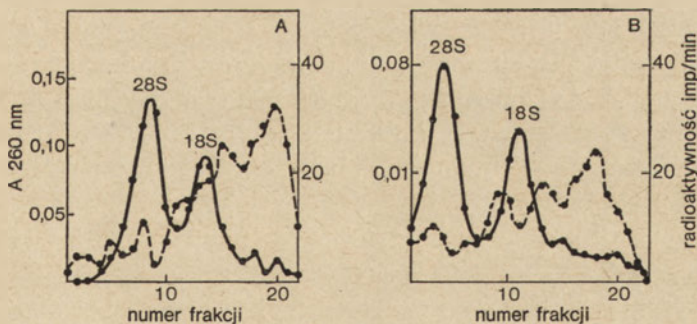
czas gdy gęstość rybosomów i ich podjednostek występuje w zakresie od 1,5 do 1,6 g/cm<sup>3</sup> (10, 44, 45, 46). Różnice w gęstości pozornej wskazują, że w skład tych kompleksów wchodzi większa ilość białka niż w skład rybosomów, przy czym gęstość pozorna nie zależy od wielkości tych kompleksów. Rycina 2 przedstawia wyniki analizy gęstości informosomów o stałych sedimentacji niższych oraz wyższych od rybosomów. W obu przypadkach główny szczyt gęstości pozornej wykazuje tę samą wartość równą 1,39 g/cm<sup>3</sup>.



**Ryc. 2.** Analiza gęstości informosomów w gradiencie stężeń chlorku cezu (10). Informosomy wydzielono z gradientu stężeń sacharozy z obszaru obejmującego cząstki lżejsze od rybosomów sedimentujące w granicach 73—62S (A) oraz cząstki cięższe sedimentujące w granicach 94—85S (B).

● —● — absorpcja przy 260 nm  
● - - - ● — radioaktywność

Analiza własności informosomów wykazała, że zbudowane są wyłącznie z białek i kwasu rybonukleinowego, różnego od rybosomalnego RNA, bardzo podobnego natomiast do mRNA z aktywnych polisomów, o typo-



**Ryc. 3.** Porównanie przebiegu sedimentacji w gradiencie stężeń sacharozy znakowanego RNA wydzielonego z informosomów (A) i polisomów (B) 18-godzinnych zarodków *Misgurnus fossilis* (9).

● —● — absorpcja przy 260 nm  
● - - - ● — radioaktywność

wym dla niego charakterze polidispersyjnym. Porównanie własności sedymentacyjnych w gradiencie sacharozy RNA wydzielonego z informosomów i mRNA polisomów ilustruje rycina 3.

Cechą charakterystyczną informosomów jest ich występowanie w homogenatach cytoplazmatycznych komórek w formie cząstek rybonukleoproteidowych o bardzo zróżnicowanych stałych sedymentacji. Podobny rozkład stałych sedymentacji jak w przedstawionym na rycinie 1 dla informosomów z zarodków *Misgurnus fossilis* można zaobserwować w czasie wirowania w gradiencie sacharozy informosomów zarodków jeżowca morskiego (47), informosomów komórek HeLa (48, 49), komórek wątroby szczura (50), kielków pszenicy i grochu (51, 52) a także tkanek owadów (53). W szczególnych przypadkach, w komórkach wyspecjalizowanych w syntezie tylko jednego typu białka można stwierdzić obecność informosomów o znacznej przewodzie jednego tylko rodzaju cząstek rybonukleoproteidowych, np. w erytrocytach przeważająca część informosomów wykazuje stałą sedymentacji 20S i zawiera mRNA łańcuchów białkowych hemoglobiny (54, 55, 56). W komórkach zarodków kurczęcia zakażonych wirusem Newcastle występują cząstki rybonukleoproteidowe sedymentujące w granicach 40—45S, które zawierają nieć „minus” wirusowego RNA (57). Podobnie homogenne kompleksy o stałej sedymentacji 80S znaleziono w komórkach HeLa zakażonych wirusem polio (58).

Obecnie wiadomo, że z pośród wszystkich rodzajów kwasów rybonukleinowych występujących w komórkach organizmów eukariotycznych jedynie cząsteczki rozpuszczalnego tRNA występują w stanie wolnym, niezwiązanym z białkami. Cząsteczki mRNA zarówno w jądrze komórkowym jak i cytoplazmie występują zawsze w formie kompleksów z białkami, od momentu ich powstania w chromatynie jądra komórkowego poprzez wszystkie etapy przemian zachodzących w obrębie jądra i cytoplazmy aż po proces translacji w polisomach. Bez względu na pochodzenie i lokalizację wewnątrzkomórkową kompleksy mRNA z białkami posiadają następujące właściwości (44):

— stałe sedymentacji zarówno kompleksów białkowych jak i RNA w nich zawartych wykazują zwykle dużą polidispersyjność; RNA charakteryzuje się zawsze składem zasad podobnym do DNA i zdecydowanie różnym od RNA rybosomalnego, ulega szybkiemu znakowaniu radioaktywnymi prekursorami RNA;

— zawartość białek w kompleksach jest większa niż w rybosomach i waha się w granicach od 55 do 80%; białka wchodzące w skład informosomów różnią się zarówno od białek rybosomów jak i białek chromatyny;

— informosomy wykazują dużą wrażliwość na działanie enzymów proteolitycznych i rybonukleazy i ulegają łatwo znakowaniu za pomocą radioaktywnych aminokwasów;



— w odróżnieniu od rybosomów informosomy ulegają częściowej deproteinizacji pod wpływem dezoksycholanu sodu i wysokich stężeń soli, są natomiast odporne na działanie EDTA oraz brak jonów magnezu;

— wykazują charakterystyczną gęstość w gradiencie chlorku cezu — około  $1,4 \text{ g/cm}^3$ , przy czym gęstość ta nie zależy od wielkości wyizolowanych cząsteczek. Wskazuje to na dużą względną przewagę cząsteczek białka nad RNA oraz na stały stosunek RNA do białka;

— informosomy nie zawierają ani DNA ani lipidów (5, 44, 59, 60, 61).

#### I-1. Kompleksy rybonukleoproteidowe jądra komórkowego jako prekursorzy mRNA

Pierwszych danych o występowaniu w jądrze komórkowym kompleksowych połączeń kwasu rybonukleinowego z białkiem, oraz o udziale tych połączeń w transporcie RNA z jądra do cytoplazmy dostarczyły badania cytologiczne (62, 63, 64). Badania biochemiczne tych kompleksów zostały zainicjowane w początkach lat 60-tych (65, 66). Wydzielony w pracowni Georgieva RNA z jąder komórek wątroby szczura i raka Ehrlicha, ze względu na podobieństwo składu zasad do DNA, został nazwany D-RNA. Szybko postępujące badania jądrowych kompleksów rybonukleoproteidowych prowadzone równoległe w różnych ośrodkach spowodowały, obok znacznego postępu w poznaniu ich budowy i zrozumienia funkcji i metabolizmu, także pewne zamieszanie w ich nomenklaturze. Oprócz najwcześniej wprowadzonych nazw dla zawartego w nich RNA: D-RNA lub jądrowy RNA typu DNA (ang. *DNA-like RNA*) (67), stosowane są również inne nazwy: heterogenny jądrowy RNA (HnRNA) (68, 69, 70), RNA typu messenger (ml-RNA) lub prekursor mRNA (pre-mRNA) (71, 72).

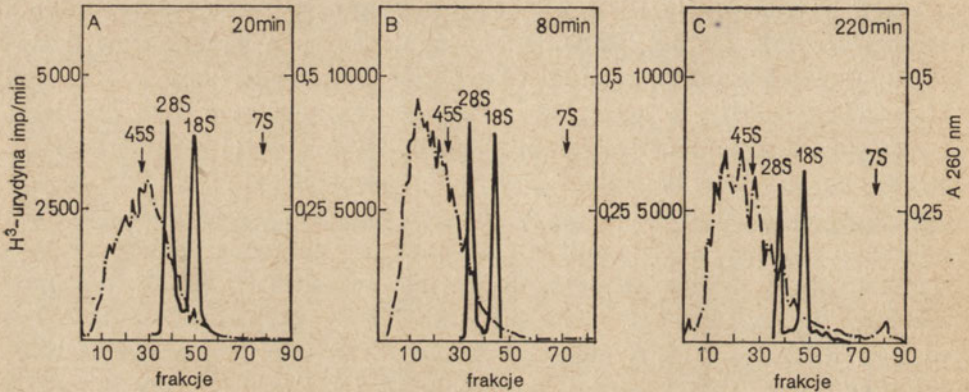
Artykuł przeglądowy poświęcony charakterystyce pre-mRNA oraz innych rodzajów jądrowego RNA został niedawno opublikowany w *Postęпах Biochemii* (73). W niniejszym rozdziale zostaną omówione wyniki ostatnich badań dotyczących tych jądrowych kompleksów rybonukleoproteidowych, które są prekursorami cytoplazmatycznego mRNA.

Powstające w jądrze komórkowym cząsteczki pre-mRNA różnią się zasadniczo od cząsteczek mRNA występujących w cytoplazmie. Jako pierwszy produkt transkrypcji powstają cząsteczki o masie od  $2 \times 10^6$  do  $20 \times 10^6$  daltonów (67, 74, 77). Cząsteczki te łączą się natychmiast w kompleksy ze specyficznymi białkami globularnymi tworząc duże struktury o stałej sedymentacji od 300 do 5000S (78), których obrazy w mikroskopie elektronowym przypominają polisomy (49, 79). Przebieg syntezy tych olbrzymich cząsteczek w erytrocytach kaczki przedstawiono na rycinie 4.

Po 20 min. od podania radioaktywnej urydyny pojawiają się pierwsze ukończone cząsteczki olbrzymiego RNA (Ryc. 4a). Ilość ich wzrasta i osiąga maksimum po 80 min. (Ryc. 4b). Cząsteczki te są bardzo nietrwałe i ulegają szybko rozpadowi do cząsteczek o znacznie mniejszej masie i du-



zo większej stabilności. Dlatego przedłużenie czasu doświadczenia nie prowadzi do wzrostu ilości cząsteczek olbrzymiego RNA (ryc. 4c). Podobne przemiany olbrzymich cząsteczek jądrowego pre-mRNA zaobserwowano w jądrach komórek HeLa (81), wątroby szczura (79, 82) a także w jądrach komórkowych szeregu innych organizmów (67). Obecność sekwencji odpowiadających informacyjnemu RNA w tych olbrzymich cząsteczkach została stwierdzona dopiero niedawno i jak dotychczas tylko w jednym przypadku mRNA kodującego białko erytrocytów — globinę. Wykazano ją za pomocą metody hybrydyzacji (83, 124) oraz przez bezpośrednią syntezę globiny po wprowadzeniu do oocytów *Xenopus* frakcji jądrowego pre-mRNA wyodrębnionego z retikulocytów myszy i kaczki (84, 85).



**Ryc. 4.** Analiza przebiegu syntezy pre-mRNA w erytroblastach kaczki za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (80). RNA wyodrębniano z jąder erytroblastów inkubowanych z  $^3\text{H}$ -urydyną w ciągu: A — 20 min., B — 80 min. i C — 220 min.

Pod wpływem łagodnego działania rybonukleazą białkowe kompleksy pre-mRNA ulegają rozpadowi do stosunkowo jednorodnych, dużo mniejszych cząsteczek, które w gradience stężeń sacharozy sedymentują w granicach 30—40S.

Gęstość w chlorku cezu zarówno wielkich cząstek, jak i powstałych z nich jednostek mniejszych jest taka sama —  $1,41 \text{ g/cm}^3$ , a stosunek ilości białka do RNA wynosi 4:1. Wskazuje to, że fragmentacja dużych kompleksów nie powoduje istotnych zmian w ich budowie chemicznej (50, 79). Składniki białkowe można oddzielić od RNA za pomocą działania 2M NaCl w obecności mocznika, który zapobiega agregacji komponentów białkowych Georgiewa, otrzymuje się białko o masie cząsteczkowej około 40 tys. — „informofer”, który stanowi główny składnik białkowych kompleksów pre-mRNA jądra (79, 86, 90). Obok tego białka występuje około 20 różnego typu komponentów białkowych o masie cząsteczkowej od 32 tys.

do 180 tys. daltonów, różniących się między sobą ładunkiem, przy czym obserwuje się znaczną ilość białek kwaśnych i ufosforylowanych (87, 88, 89, 91). Ostatnio stwierdzono również, że w budowie tych białek występują różnice w zależności od rodzaju tkanek oraz gatunków organizmów, z których kompleksy jądrowego pre-mRNA zostały wyizolowane (46, 87, 88, 92).

Do chwili obecnej bardzo niewiele wiadomo o roli białek występujących w kompleksach z jądrowym pre-mRNA w metabolizmie mRNA w jądrze komórkowym. Niektóre z tych białek wykazują aktywność fosfokinazy proteinowej (91, 93) oraz endonukleazy, która bierze udział w rozkładaniu wielkiej cząsteczki pre-mRNA na mniejsze fragmenty (88, 95). Inne białka towarzyszące cząsteczkom RNA mogą służyć jako specyficzne sygnały kierujące działaniem endonukleazy lub brać udział w selekcji kompleksów w czasie transportu mRNA z jądra do cytoplazmy. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje niedawno wykryta syntetaza poliadenylowa (94). Enzym ten katalizuje reakcję dołączania łańcucha poliadenylowego do odcinków RNA zawierających sekwencje messengera. Proces ten zachodzi już po zakończeniu transkrypcji (121). Łańcuchy poliadenylowe, zbudowane z około 200 nukleotydów, dołączone są do końca 3' łańcucha RNA (103) i występują zarówno w jądrze (pre-mRNA), jak w cytoplazmie (mRNA) (106). Obecność łańcuchów poliadenylowych w cząsteczkach mRNA, wykryta w 1970 roku (104, 105) została obecnie stwierdzona w większości mRNA wyizolowanych z organizmów eukariotycznych (107) za wyjątkiem mRNA odpowiedzialnego za syntezę histonów (108). Sekwencje poliadenylowe nie występują natomiast w mRNA bakterii oraz w RNA wirusów (109). W procesie translacji sekwencje poliadenylowe nie biorą bezpośredniego udziału, odgrywają jednak istotną rolę w stabilizowaniu struktury mRNA w polisomach (109, 110) oraz w przemianach i transporcie mRNA z jądra do cytoplazmy (103, 110—113).

Sekwencje poliadenylowe są silnie związane z białkiem. Blobel (114) oraz Kwan i Brawerman (115) wykazali, że z odcinkiem poli(A) w mRNA komórek zwierzęcych związana jest cząsteczka białka o masie 78 000. Białko to dołączone do odcinka poliadenylowego wewnątrz jądra komórkowego prawdopodobnie przechodzi razem z łańcuchem mRNA przez błonę jądrową do cytoplazmy i nie ulega odszczepieniu nawet w czasie translacji (90). Większość pozostałych białek wchodzących w skład jądrowych kompleksów pre-mRNA najprawdopodobniej nie opuszcza jądra ulegając odszczepieniu od łańcucha mRNA w czasie jego transportu przez błonę jądrową. I tak np. stwierdzono, że białko o masie cząsteczkowej 40 000 występujące w największej ilości w jądrowych kompleksach pre-mRNA nigdy nie towarzyszy cząsteczkom mRNA w cytoplazmie (96, 97). Według Georgiewa białko to jest prawdopodobnie dołączone nie do mRNA lecz do tych odcinków olbrzymiej cząsteczki jądrowego pre-mRNA, które nie opuszczają jądra, ulegając w nim szybkiemu rozkładowi (90, 116).



O różnym składzie białek dołączonych do cząsteczek mRNA w jądrze i cytoplazmie świadczą różnice w ich ruchliwości elektroforetycznej, stwierdzone np. w tkance wątroby szczura (98, 117) i w retikulocytach królika, myszy i kaczki (96, 97), a także różnice antygenowe (117). Z drugiej jednak strony niektóre białka kompleksów rybonukleoproteidowych, występujących w retikulum endoplazmatycznym wykazują taką samą ruchliwość elektroforetyczną jak białka kompleksów jądrowych (100, 101), co może świadczyć o możliwości ich przechodzenia razem z mRNA do cytoplazmy. Stwierdzono również, że o ile pre-mRNA jąder komórkowych po uwolnieniu od białek łączy się łatwo z rybosomami stymulując włączanie aminokwasów do polipeptydów, to białkowe kompleksy jądrowego pre-mRNA są niezdolne do łączenia się z rybosomami. Obecność białek zabezpiecza więc jądrowy pre-mRNA przed niekontrolowaną translacją informacji przesyłanej do cytoplazmy (99).

#### I-2. Cytoplazmatyczne kompleksy białkowe mRNA (informosomy)

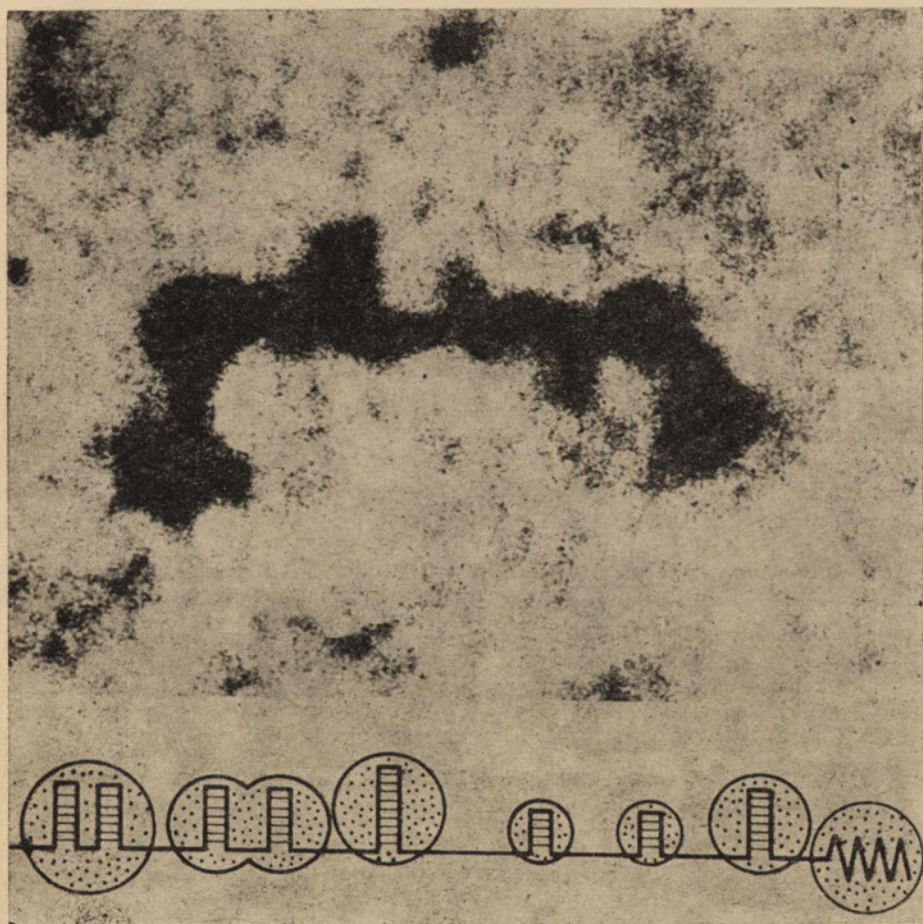
Kompleksy mRNA ze specyficznymi białkami zostały najpierw znalezione w cytoplazmie jako cząstki wolne, nie związane z rybosomami. Początkowo przypuszczano, że wytworzenie aktywnej formy mRNA, która może łączyć się z rybosomami polega na uwolnieniu łańcucha mRNA z kompleksów rybonukleoproteidowych. Wkrótce jednak okazało się, że cytoplazmatyczny mRNA występuje zawsze w połączeniu z białkami, zarówno w postaci wolnych cząstek rybonukleoproteidowych jak i w połączeniu z rybosomami w polisomach aktywnie uczestniczących w biosyntezie białek. Stwierdzenie obecności kompleksów białkowych mRNA w polisomach dostarczyło danych wskazujących, że specyficzne białka dołączone do mRNA są niezbędne w regulowaniu odczytywania informacji genetycznej. Kompleksy mRNA z białkami zostały zidentyfikowane najpierw w polisomach wątroby szczura (45) i komórkach L myszy (102). Wyizolowane z polisomów kompleksy wykazywały takie same własności jak wolne informosomy cytoplazmatyczne (odporność na czynniki chelatujące, heterogenność stałych sedymentacji w gradiencie stężeń sacharozy), jedynie ich gęstość w gradiencie chlorku cezu była większa niż wolnych informosomów (1,46 g/cm<sup>3</sup>), co wskazywało na mniejszą ilość białka dołączonego do mRNA. Analogiczne kompleksy wyizolowano następnie z polisomów różnych organizmów i tkanek jak wątroba szczura (100, 101), komórki HeLa (49), tarczyca owiec (118), retikulocyty królika i kaczki (72, 97, 119, 120, 121), komórki mózgu szczura (122) a także komórki rakowe ludzkie KB (123).

Dotychczas najlepiej zbadano cząstki rybonukleoproteidowe wydzielone z polisomów retikulocytów. Zawierają one około 60% białka, a ich stała sedymentacji w gradiencie stężeń sacharozy wynosi 14S, mogą więc być łatwo oddzielone zarówno od podjednostek rybosomalnych jak i białek



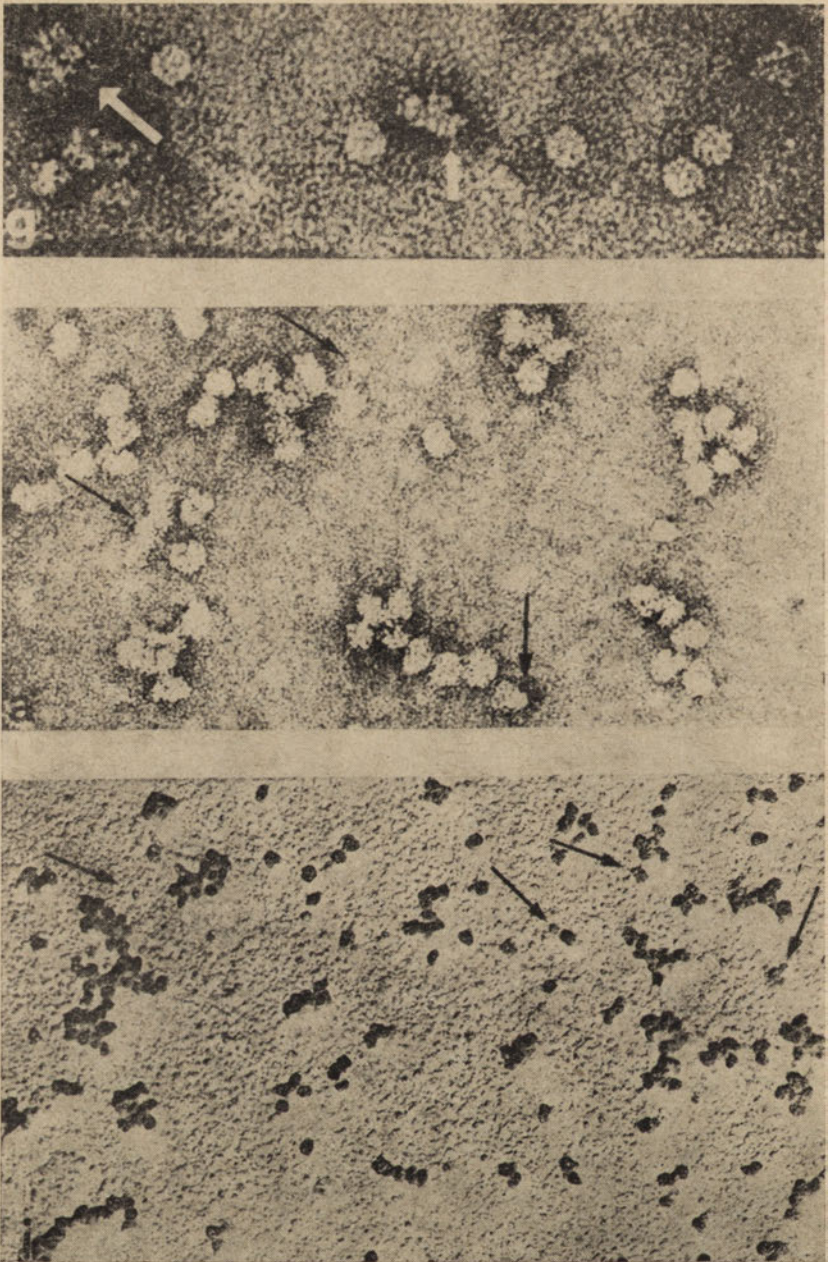
supernatantu (124—127). Białka tych kompleksów zostały wyizolowane z retikulocytów królika (120, 121), kaczki (97, 128, 129) i myszy (84, 95). W każdym z badanych przypadków stwierdzono, że mRNA połączony jest z dwoma głównymi składnikami białkowymi o masie cząsteczkowej 49—52 tys. i 73—78 tys. daltonów.

Ostatnio okazało się, że podobne białka o masach cząsteczkowych 52—54 tys. i 78—82 tys. występują również w powiązaniu z polisomalnym mRNA w mózgu zarodków kurcząt (120) i w wątrobie szczura i myszy (114, 131). Białka te są ufosforylowane (43). Obok nich w rybonukleoproteidowych polisomalnych kompleksach mRNA obserwuje się dodatkowo szereg innych składników białkowych, występujących w dużo mniejszych ilościach.



**Ryc. 5.** Zdjęcie z mikroskopu elektronowego i schematyczny rysunek białkowego kompleksu mRNA globiny wyizolowanego z polisomów erytroblastów kaczki (80). Linia ciągła na rysunku przedstawia łańcuch mRNA. Odcinki zakreskowane w załamaniach linii ciągłej oznaczają dwuniciowe pętle o zorganizowanej strukturze drugorzędowej. Spirala na końcu 3' łańcucha przedstawia sekwencję poliadenylową. Białka dołączone do mRNA zaznaczone są zakropkowanymi kołami. Powiększenie 300 000X.





**Ryc. 6.** Obrazy z mikroskopu elektronowego cząstek rybonukleoproteidowych występujących w cytoplazmie (49)

Zdjęcie pierwsze od góry przedstawia cząstki wolne. Cząstki te są zbudowane ze zwiniętych spiralnie łańcuchów rybonukleoproteidowych w kuliste struktury, łatwe do odróżnienia od podjednostek rybosomalnych (zaznaczonych białymi strzałkami). Zdjęcia następne przedstawiają cząstki rybonukleoproteidowe dołączone do polisomów (w miejscach zaznaczonych czarnymi strzałkami). Powiększenie 100 000X.

ciach. Niektóre z nich zawierają również reszty fosforanowe. Obrazy w mikroskopie elektronowym polisomalnych kompleksów informacyjnego RNA wykazały, że białka te grupują się tylko w pewnych miejscach cząsteczki mRNA, tworząc charakterystyczne zgrubienia (72, 80, 132). Zgrubienia te znajdują się w miejscach, w których w łańcuchu mRNA występują odcinki o charakterystycznej strukturze drugorzędowej. W tych miejscach łańcuch mRNA ulega pofałdowaniu tworząc dwuniciowe pętle rozmieszczone wzdłuż całego łańcucha, a szczególnie zagęszczone blisko końca 5'. Wydaje się, że poprzez ten właśnie fragment łańcucha, o długości około 50—60 nukleotydów, następuje dołączenie cząsteczki mRNA do rybosomu. Według najnowszych poglądów (80) ten odcinek łańcucha mRNA nie zawiera sekwencji informacyjnych, stanowiąc pozostałość sekwencji programujących proces dojrzewania mRNA, a odłączanych od mRNA jeszcze w jądrze komórkowym.

Udział białek dołączonych do mRNA w regulowaniu aktywności polisomów jest w chwili obecnej przedmiotem intensywnych badań. Stwierdzono, że odgrywają one ważną rolę w inicjacji wiązania peptydowego (56) oraz w dołączaniu mRNA do mniejszej podjednostki rybosomu (120). Białka te występują w cytoplazmie również w stanie wolnym, o czym może świadczyć fakt prawidłowej translacji odbiałczonego mRNA kodującego syntezę globiny w układach *in vitro* w obecności białek supernatantu erytrocytów (55).

Badania kinetyki włączania radioaktywnych prekursorów do mRNA wykazały, że cząsteczki mRNA pojawiają się w cytoplazmie najpierw jako wolne kompleksy rybonukleoproteidowe a dopiero w dalszej kolejności zostają wbudowane do polisomów. Włączaniu wolnych kompleksów mRNA do polisomów towarzyszy szereg przekształceń ich komponentów białkowych (128). Taka kolejność przemian białkowych kompleksów mRNA w cytoplazmie została wykazana doświadczalnie w komórkach wątroby szczura (66), w komórkach HeLa (49), zarodkach jeźowca (110) oraz w erytroblastach embrionów kaczki (129). Jak stwierdzono za pomocą mikroskopu elektronowego wolne kompleksy mRNA wydzielone w komórkach HeLa tworzą charakterystycznie zwinięte struktury. Można je zaobserwować zarówno w stanie wolnym jak i w trakcie łączenia się z rybosomami w polisomy. Obrazy tych kompleksów przedstawia rycina 6 (49).

## II. Blokowanie i aktywacja mRNA

Ostatnie lata przyniosły znaczny postęp w badaniu metabolizmu mRNA w komórkach. O ile jednak udało się bardzo udoskonalić metody wyodrębniania zablokowanych form mRNA, co pozwoliło na częściowe zbadanie ich budowy, to jednak funkcje biologiczne składników białkowych tych kompleksów oraz mechanizm blokowania i aktywowania informacji gene-



tycznej w nich zawartej poznano dotąd w bardzo niewielkim stopniu. Stosunkowo najlepiej zbadano proces regulacji aktywności matrycowej wirusów typu f. Wirusy te mają prostą budowę, a ich RNA stanowi policistronowy mRNA trzech białek: białka kapsydu, białka dojrzwania (białka A) i specyficznej, fagowej polimerazy RNA. W skład cząsteczki wirusa, obok RNA wchodzi dwa pierwsze białka, tworząc razem typowy kompleks rybonukleoproteidowy. W czasie syntezy białek wirusa w komórce bakteryjnej obserwuje się ścisłą polarność procesu translacji. Najpierw powstaje cząsteczka białka kapsydu, a dopiero po jej ukończeniu rozpoczyna się synteza polimerazy (133—135). Synteza białka kapsydu stanowi więc w pierwszym okresie rozwoju wirusa proces aktywujący syntezę polimerazy. Jednakże po nagromadzeniu się większej ilości cząsteczek białka kapsydu następuje zablokowanie przez nie odcinka RNA odpowiedzialnego za inicjację syntezy polimerazy tak, że w późniejszym etapie rozwoju wirusa cząsteczka RNA służy tylko jako matryca dla syntezy białek kapsydu. W ten sposób białko kapsydu jest specyficznym czynnikiem blokującym syntezę polimerazy poprzez utworzenie nieaktywnych kompleksów z odcinkiem RNA odpowiedzialnym za inicjację tej syntezy (136—138), przy czym specyficzność hamującego działania białka kapsydu jest bardzo wysoka (134, 139).

Tabela 1.

Wpływ trypsyny na włączanie radioaktywnych aminokwasów przez frakcję rybosomalną z niezaplodnionych jaj jeżowca morskiego (8)\*

Aminokwasy	Dodatek RNA	imp./min./mg. rybosomalnego RNA	
		Rybosomy kontrolne	Rybosomy traktowane trypsyną
[ <sup>14</sup> C] AA	—	18	448
[ <sup>14</sup> C] AA	RNA, jaja niezapl.	9	644
[ <sup>14</sup> C] AH	—	25	260
[ <sup>14</sup> C] AH	RNA blastuli	0	475
[ <sup>14</sup> C] Fen	—	0	72
[ <sup>14</sup> C] Fen	Poli(U)	360	2200

\* Układ do biosyntezy białka był wyodrębniony z jaj niezaplodnionych. Symbol <sup>14</sup>C AA oznaczał sztuczną mieszaninę radioaktywnych aminokwasów, symbol <sup>14</sup>C AH — hydrolizat białek *Chlorella*.

Podobnie dokładne badania prowadzone nad kompleksami białek i mRNA z organizmów wyższych w obecnej chwili są jeszcze niedostępne i z konieczności ograniczają się do poszukiwania czynników odblokowujących nieaktywne formy mRNA. Pierwsze takie doświadczenia zostały przeprowadzone przez Monroya (7, 8) nad uaktywnianiem frakcji rybosomalnej z niezaplodnionych jaj jeżowca morskiego. Frakcja rybosomo-

malna wyizolowana z niezapłodnionych jaj jest niezdolna do włączania radioaktywnych aminokwasów. Frakcja ta poddana krótkotrwałemu działaniu trypsyny odzyskuje aktywność, przy czym wzrost aktywności we włączaniu aminokwasów następuje spontanicznie bez dodania egzogennej mRNA (Tabela 1).

Doświadczenie to sugeruje możliwość udziału enzymów proteolitycznych w uruchamianiu informacji genetycznej zawartej w zamaskowanym mRNA komórek jajowych. Za tym przypuszczeniem przemawia przejściowy, krótkotrwały wzrost aktywności enzymów proteolitycznych w komórkach jajowych bezpośrednio po zapłodnieniu (145), który, jak stwierdzono w przypadku jaj jeżowca morskiego, występuje we frakcji informosomów (140).

Podobne wnioski wynikają także z analizy dynamiki syntezy białek w czasie podziału komórek HeLa (141). W komórkach tych, w okresie metafazy trwającej ok. 15-tu minut, biosynteza białka ulega krótkotrwałemu zahamowaniu. Zahamowanie to jest konsekwencją okresowego zablokowania translacji; polisomy ulegają wówczas degradacji do monorybosomów ale bez rozkładu mRNA, gdyż jego okres półtrwania wynosi conajmniej kilka godzin. Badając układy bezkomórkowe wyodrębnione z komórek HeLa stwierdzono również, że układy wydzielone z komórek metafazalnych są niezdolne do syntezy białka, natomiast łagodna hydroliza trypsyną przywraca im tę zdolność (146). Aktywność frakcji rybosomalnej potraktowanej trypsyną osiąga poziom równy obserwowanemu w doświadczeniu kontrolnym, do którego użyto frakcji rybosomalnej wydzielonej z komórek w stadium interfazy, charakteryzującym się wysokim poziomem biosyntezy białka. Aktywujące działanie trypsyny sugeruje też, że w blokowaniu aktywności matrycowej mRNA biorą udział białka zasadowe, bogate w argininę lub lizynę (8).

Przedstawione dane pozwalają zatem przyjąć, że jeden z mechanizmów regulacji procesu translacji może polegać na łączeniu się białka z mRNA i blokowaniu w ten sposób możliwości jego odczytywania oraz na aktywowaniu tych form przez enzymatyczną degradację blokującego składnika białkowego. Dlatego też w ostatnich latach podjęto badania charakteru oddziaływań białek zasadowych na proces translacji w układach *in vitro*. Ustalono, że istotnie histony (142, 143, 147, 148, 149), zasadowe białka mikrosomalne (149) a także inne związki o charakterze polikationowym, takie jak poli-L-lizyna (148) silnie hamują biosyntezę białka w układzie bezkomórkowym. W tabeli 2 zestawiono wyniki doświadczeń ilustrujących wpływ różnych rodzajów białek zasadowych na stopień włączania aminokwasów w układach bezkomórkowych roślinnych i zwierzęcych.

Jak widać z przedstawionych w tabeli danych zasadowe polipeptydy o stosunkowo dużej masie cząsteczkowej (od 3 tys. do 6 tys.) (149) nie hamują biosyntezy białka. Wskazuje to, że w procesie hamowania istotne



znaczenie posiada nie tylko charakter zasadowy, ale wielkość i kształt cząsteczki blokującego białka. Okazało się ponadto, że histony nie zmieniają aktywności syntetaz aminoacylo-tRNA, jak również nie inaktywują cząsteczek tRNA (147), oraz, że inhibicja wywołana histonami może być cofnięta przez dodanie do układu heparyny tj. związku o charakterze silnie polianionowym (148). Dane te jak również stwierdzana na przykładzie komórek HeLa możliwość okresowego przechodzenia polisomów z formy

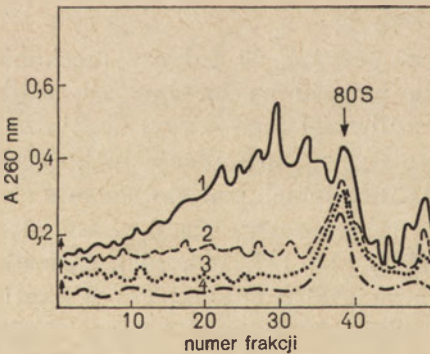
Tabela 2.

Wpływ białek zasadowych na proces translacji *in vitro* w układzie wydzielonym z wątroby szczura i kielków grochu\*

	Wątroba szczura		Kielki grochu	
	imp/min/mg rybosomów	% hamowania	imp/min/mg rybosomów	% hamowania
Układ kontrolny	8421	0	6320	0
+ 200 $\mu$ g histonów	1083	87	1260	80
+ 200 $\mu$ g białek mikroso- malnych	4740	47	2910	35
+ 200 $\mu$ g zasadowych polipeptydów	8642	—	6730	—

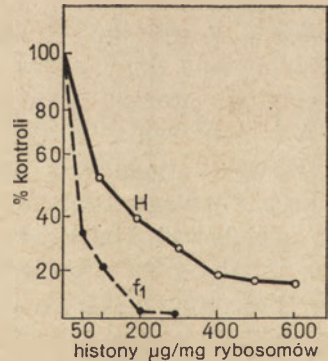
\* Rybosomy były inkubowane przez 10 min. w 0° z białkami lub polipeptydami. Włączenie radioaktywnych aminokwasów było prowadzone w temp. 37° w ciągu 1 godz. (142, 149).

aktywnej w nieaktywną (141, 146) nasunęły pomysł wykorzystania zdolności inhibujących histonów do zbadania mechanizmu odwracalnego blokowania polisomów w układzie modelowym (142, 143). Jako źródło po-



Ryc. 7. Wpływ histonów na profile preparatów rybosomalnych wątroby szczura w gradiencie stężeń sacharozy (143).

1 — preparat natywny (1 mg); ten sam preparat po inkubacji z: 2 — 100  $\mu$ g histonów, 3 — 200  $\mu$ g histonów, 4 — 300  $\mu$ g histonów.



Ryc. 8. Wpływ histonu  $f_1$  i mieszaniny pozostałych histonów na inkorporację radioaktywnych aminokwasów w układzie bezkomórkowym wydzielonym z wątroby szczura (W. Jachymczyk — dane nieopublikowane).

H — mieszanina histonów pozbawionych histonu  $f_1$ ,  $f_1$  — histon  $f_1$



lisomów wybrano wątrobę szczura z której, dzięki obecności naturalnego inhibitora rybonukleazy, można łatwo wyizolować duże polisomy zachowujące przez dłuższy czas aktywność we włączaniu aminokwasów *in vitro*. W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że histony łączą się z polisomami w ściśle określonym stosunku wagowym (około 1:1), a całkowite zahamowanie aktywności polisomów następuje już przy trzykrotnie mniejszym stężeniu histonów. Inaktywacja polisomów polega na łączeniu się ich z histonami w duże kompleksy, które szybko sedymentują w czasie wirowania w gradiencie stężeń sacharozy (Ryc. 7) (143).

Szczególnie silne własności inhibujące wykazuje histon  $f_1$ , (Ryc. 8), który w odróżnieniu od pozostałych histonów, posiada inny, wydłużony kształt cząsteczki, a ponadto wykazuje specyficzność tkankową i gatunkową (150, 151, 164, 165, 166).

Histony wykazują znacznie większe powinowactwo do polisomów niż do wolnych rybosomów. Z ryciny 7 wynika, że dodatek histonów w ilości, która powoduje zablokowanie wszystkich obecnych w roztworze polisomów

Tabela 3.

Wpływ mRNA, rybosomalnego RNA (rRNA) i poli (U) na włączanie radioaktywnych aminokwasów przez frakcję rybosomalną wątroby szczura natywnej i traktowaną histonami (142).

Rybosomy (1 mg.) traktowane:	Dodatek			imp./min./mg. rybosomów
	mRNA μg	rRNA μg	poli U μg	
— (kontrola)	—	—	—	2433
A —	50	—	—	3675
+ 300 μg histonów	—	—	—	420
+ 300 μg histonów	50	—	—	2670
— (kontrola)	—	—	—	2183
B —	—	50	—	2200
+ 300 μg histonów	—	—	—	265
+ 300 μg histonów	—	50	—	275
— (kontrola)	—	—	—	5185
C* —	—	—	100	8743
+ 300 μg histonów	—	—	—	920
+ 300 μg histonów	—	—	100	8131

\* W doświadczeniu z poli (U) zamiast mieszaniny znakowanych aminokwasów stosowano  $^{14}\text{C}$  fenyloalaninę (0,5 μCi).

mów wpływa tylko w niewielkim stopniu na zmniejszenie się ilości wolnych rybosomów w roztworze. Mimo obecności histonów w układzie, wolne rybosomy zachowują pełną aktywność włączania aminokwasów po uzupełnieniu układu egzogennym mRNA lub kwasem poliurydylowym, o czym świadczą dane z tabeli 3.

Z danych tabeli 3 wynika ponadto, że wzrost aktywności układu po-traktowanego uprzednio histonami po dodaniu egzogennej mRNA nie

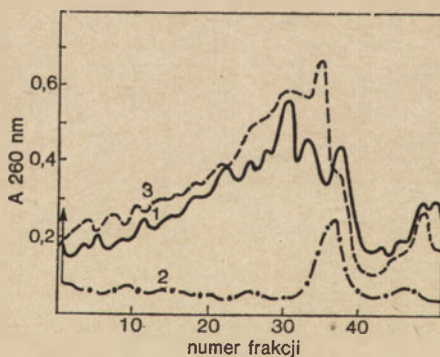
polega na reaktywowaniu zablokowanych polisomów, lecz jest wynikiem tworzenia się nowych polisomów z obecnych w roztworze wolnych rybosomów. Dodanie rybosomalnego RNA nie posiadającego aktywności matrycowej nie powodowało bowiem stymulacji włączania radioaktywnych aminokwasów w układzie zablokowanym przez histony.

Tabela 4.

Wpływ trypsyny na aktywowanie frakcji rybosomalnej wątroby szczura zablokowanej przez histony (143)

Nr doświadczenia	Rybosomy (1 mg) traktowane:		Aktywność %
	histonami $\mu\text{g}$	trypsyną $\mu\text{g}$	
1	— (kontrola)	—	100
2	100	—	55
3	200	—	38
4	300	—	14
5	300	2,7	81

Zablokowane polisomy można natomiast uaktywnić przez podziałanie trypsyną (143). Enzym ten nie tylko przywraca prawie całkowitą, pierwotną aktywność polisomów (Tabela 4) lecz również obraz reaktywowanych polisomów w gradiencie stężeń sacharozy jest niemal identyczny jak polisomów natywnych otrzymanych bezpośrednio z komórek wątroby szczura (Ryc. 9).



Ryc. 9. Wpływ trypsyny na reaktywowanie polisomów w preparacie rybosomalnym wątroby szczura inkubowanym z histonami (143).

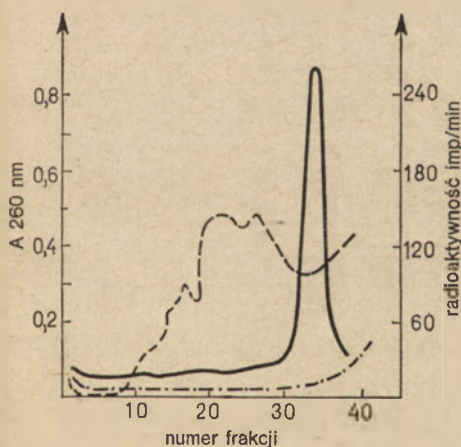
1 — preparat natywny (1 mg); 2 — preparat inkubowany z 300  $\mu\text{g}$  histonów; 3 — preparat inkubowany z histonami po działaniu trypsyny.

Ponieważ w blokowaniu polisomów istotną rolę odgrywa nie tylko charakter zasadowy białka lecz również kształt i wielkość cząsteczki, reaktywacja zablokowanego układu nie musi polegać na całkowitej degradacji cząsteczki blokującego białka. Wydaje się, że wystarcza rozszczepienie przez trypsynę tylko niewielkiej liczby wiązań peptydowych w cząsteczkach histonów aby spowodować przywrócenie aktywności matrycowej polisomalnego mRNA (142).



Przedstawiony sposób oddziaływania histonów na translację, a przede wszystkim możliwość reaktywowania polisomów zablokowanych histonami przy pomocy trypsyny, wskazuje na znaczne podobieństwo przebiegu procesów regulacji aktywności mRNA obserwowanych w układach wyizolowanych z niezapłodnionych komórek jajowych jeźowca i metafazalnych komórek HeLa oraz w badanym układzie modelowym.

Ostatnio udało się przeprowadzić *in vitro* aktywację zablokowanych form mRNA występujących w nasionach roślin, a mianowicie w układach wydzielonych z zarodków pszenicy (30, 152) i grochu (33, 144). W zarodkach tych nasion mRNA występuje w formie wolnych kompleksów rybonukleoproteidowych i można go wykryć we frakcji mikrosomalnej. Wyizolowany z tej frakcji RNA poddany elektroforezie w żelu poliakrylamidowym rozdziela się na szereg charakterystycznych prążków (153, 154). Wśród nich można wyróżnić obok RNA rybosomalnego o wartościach S równych 24, 17 i 5 obecność szeregu słabiej zarysowanych prążków, których wartość S wynosi średnio około 10. RNA występujący w tych prążkach wykazuje wyraźną aktywność matrycową w układach *in vitro*, co stwierdzono badając RNA wydzielony z suchych nasion pszenicy (153) i grochu (33). Co więcej rozmieszczenie tych prążków na elektroforogramach było identyczne z położeniem szybko znakującego się RNA wydzie-



**Ryc. 10.** Wpływ trypsyny na formowanie się polisomów w preparacie rybosomalnym wydzielonym z suchych nasion grochu (33).

— absorpcja przy 260 nm. Włączenie radioaktywnych aminokwasów przez frakcję rybosomalną: - - - - - przed inkubacją z trypsyną, . . . . . po inkubacji z trypsyną.

lonego z frakcji rybosomalnej zarodków nasion kielkujących, co jest dodatkowym potwierdzeniem występowania w nich mRNA (153, 154).

W celu zaktywowania zablokowanej formy mRNA i wykazania jej aktywności w układzie bezkomórkowym konieczne jest odłączenie cząsteczek blokujących białek lub ich modyfikacja. Aktywację zablokowanej formy mRNA z kielków pszenicy uzyskano przez inkubację z ATP (152). W układzie wyizolowanym z zarodków suchych nasion grochu potrzebne było uprzednie traktowanie frakcji zawierającej nieaktywny mRNA ni-

skimi stężeniami trypsyny (33, 144). Efekt działania trypsyny jest największy w przypadku traktowania frakcji rybosomalnej wydzielonej z zarodków nasion suchych i szybko maleje wraz z upływem czasu kiełkowania, co świadczy o malejącej ilości mRNA występującego w formie zablokowanej, w miarę upływu czasu kiełkowania. W wyniku aktywowania zablokowanego mRNA przez trypsynę, można zaobserwować nie tylko wzrost aktywności preparatów rybosomalnych we włączaniu radioaktywnych aminokwasów lecz również powstawanie *in vitro* polisomów aktywnych w biosyntezie białka (Ryc. 10).

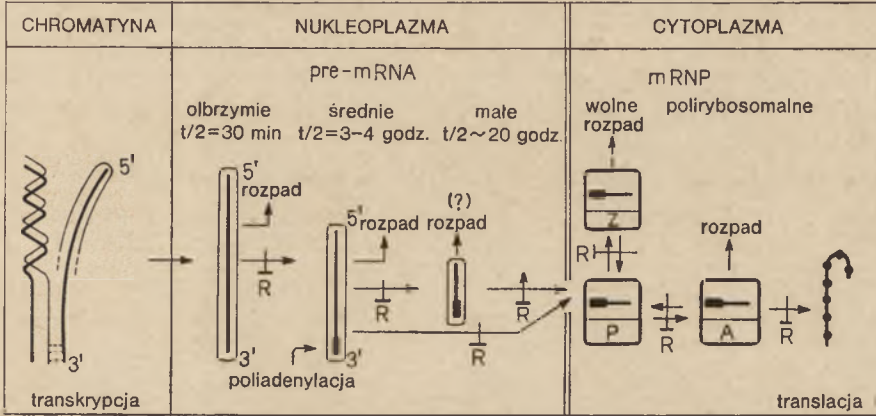
Tworzenie się polisomów *in vitro* stanowi przekonujący dowód, że stymulowanie włączania radioaktywnych aminokwasów obserwowane w zarodkach suchych nasion grochu pod wpływem trypsyny (33) a w zarodkach suchych nasion pszenicy tylko pod wpływem inkubacji z ATP (152) jest wynikiem rzeczywistego odblokowania mRNA obecnego w tych zarodkach. Aktywujące działanie ATP wskazuje na bardzo ważną rolę białek ufosforylowanych, wykrytych ostatnio w informosomach cytoplazmatycznych, w regulacji aktywności mRNA w komórkach. Zmiany w ufosforylowaniu tych białek w obecności ATP i pod działaniem kinaz białkowych, których aktywności zostały ostatnio zidentyfikowane w białkach informosomów jądrowych i cytoplazmatycznych (91, 93) mogą powodować odblokowanie aktywności matrycowej łańcuchów mRNA i udostępniać je rybosomom poprzez zmianę ładunku w blokujących cząsteczkach białka. Mechanizm aktywacji byłby więc podobny do mechanizmu aktywowania łańcuchów DNA w chromatynie poprzez zmiany w ufosforylowaniu, metylowaniu czy acylacji białek chromatyny (155—159). W przypadku kiełków grochu, które jak wszystkie nasiona rodziny *Papilionaceae* gromadzą duże ilości białka jako materiału zapasowego, aktywowanie zablokowanych form mRNA musi zachodzić przy udziale enzymów proteolitycznych. Wniosek ten potwierdzają także wyniki badań, w których wykazano, że we wczesnych etapach pęcznienia i kiełkowania nasion grochu, następuje szybki wzrost aktywności proteazy typu trypsyny, połączony z obniżeniem aktywności inhibitora trypsyny (160). Powstawanie polisomów w układzie bezkomórkowym pod wpływem łagodnego działania trypsyny odzwierciedla więc prawdopodobnie przebieg fizjologicznego procesu aktywowania zablokowanych form mRNA podczas kiełkowania nasion grochu.

### III. Model wielostopniowej (kaskadowej) regulacji informacyjnego RNA w komórkach eukariotów

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki doświadczeń wskazują, że translacja informacji genetycznej w komórkach eukariotycznych podlega skomplikowanym procesom kontroli realizowanej poprzez wielostopniowe przekształcanie informacyjnego RNA. Procesy te zachodzą zarówno na



terenie jądra komórkowego jak i cytoplazmy. Podstawową rolę w tej kontroli odgrywają białka dołączone do mRNA, jakkolwiek dane eksperymentalne pozwalające na kolerację konkretnego oddziaływania regulacyjnego z danym białkiem są jeszcze bardzo fragmentaryczne. Przebieg syntezy i wieloetapowych przekształceń cząsteczek mRNA w czasie przenoszenia informacji genetycznej z DNA do białka, zgodnie z modelem zaproponowanym przez Scherrera (80, 81), przedstawia schemat I.



**Schemat 1.** Schemat syntezy i wewnątrzkomórkowego transportu informacyjnego RNA w organizmach eukariotycznych (80 i 103)

Powstająca w wyniku transkrypcji olbrzymia cząsteczka pre-mRNA może zawierać jedną lub kilka sekwencji informacyjnych. Natychmiast po utworzeniu łańcucha pre-mRNA następuje dołączenie do niego cząsteczek białkowych. Nowopowstała olbrzymia cząsteczka ulega bardzo szybkiemu rozpadowi do cząsteczek mniejszych o dłuższym okresie półtrwania. W tym czasie następuje dołączenie reszt poliadenylowych do końca 3' łańcuchów zawierających sekwencje informacyjne. Ponadto w jądrze występują także cząsteczki rybonukleoproteidowe o dużo mniejszej masie i długim okresie półtrwania, których rola nie została dotąd wyjaśniona. W czasie przejścia mRNA z jądra do cytoplazmy następuje wymiana dołączonych do niego cząsteczek białkowych. W cytoplazmie mRNA pojawia się najpierw w formie przejściowej (P), z której przechodzi bądź do formy aktywnej w polisomach (A) i ulega translacji, bądź też do formy zamaskowanej (Z), w której jest przechowywany. Literami R zaznaczone są prawdopodobne miejsca regulacji tego procesu.

#### **Etap 1.** Synteza prekursorów mRNA (pre-mRNA)

W pierwszym etapie powstają olbrzymie cząsteczki RNA, które ulegają natychmiastowemu połączeniu z cząsteczkami specyficznych białek (informoferami), różnych od białek chromatyny. Tylko niewielka część cząsteczki pre-mRNA jest nośnikiem informacji dla syntezy łańcuchów peptydowych. Pozostały jej fragment, który nie ulega translacji, może zawierać sekwencje programujące część informacyjną lub sekwencje o jeszcze niepoznanym znaczeniu genetycznym. Olbrzymia cząsteczka pre-mRNA może zawierać większą liczbę cistronów, które w procesie dalszych przekształceń zostają rozdzielone i ulegają translacji oddzielnie. Zgodnie z najnowszymi wynikami badań Pedersona (89) białka dołączone do cząsteczki pre-mRNA są bardzo heterogenne i różnią się w zależności

od rodzaju tkanki i gatunku organizmu, z którego zostały wyodrębnione. Powstający w chromatynie kompleks rybonukleoproteidowy charakteryzuje się więc nie tylko specyficzną sekwencją nukleotydów w łańcuchu pre-mRNA, lecz również specyficznym rodzajem i ilością dołączonych białek.

#### **Etap 2. Przemiany wewnątrzjądrowe prekursora mRNA**

Po oddzieleniu się cząsteczek pre-mRNA z chromatyny rozpoczyna się natychmiast proces „dojrzwania” polegający na degradacji olbrzymiej cząsteczki za pomocą endo- i egzonukleaz, oraz na dołączaniu do sekwencji nukleotydowych mRNA łańcuchów poliadenylowych. Pozostałe odcinki olbrzymiej cząsteczki pre-mRNA, wśród których występują sekwencje współdziałające w procesie dojrzwania mRNA (sekwencje programujące), ulegają rozkładowi z uwolnieniem białka informoferowego.

Jak już wspomniano wyżej szereg białek związanych z cząsteczką pre-mRNA wykazuje aktywności enzymatyczne, jak np. aktywność specyficznego rybonukleazy czy syntetazy poli(A) (92, 95), biorąc w ten sposób udział w przemianach tej cząsteczki wewnątrz jądra komórkowego.

#### **Etap 3. Transport mRNA do cytoplazmy**

W wyniku przemian zachodzących w jądrze tylko cząsteczki RNA zawierające sekwencje informacyjne (mRNA) zostają przetransportowane do błony jądrowej a następnie poprzez błonę do cytoplazmy. Mechanizm tego transportu jest nieznany. W czasie przechodzenia przez błonę jądrową następuje wymiana białek dołączonych do mRNA. Prawdopodobnie jedynie białko dołączone do odcinków poliadenylowych przechodzi poprzez błonę razem z mRNA. Pozostałe białka są zatrzymywane wewnątrz jądra i mogą brać udział w kolejnym cyklu syntezy pre-mRNA.

#### **Etap 4. Przemiany mRNA w obrębie cytoplazmy**

Cząsteczki mRNA przechodzące do cytoplazmy ulegają natychmiastowemu połączeniu ze specyficznymi białkami i w formie kompleksów rybonukleoproteidowych występują w cytoplazmie bądź w stanie wolnym (*masked mRNA*, *blocked mRNA*) bądź zostają wbudowane w polisomy ulegając translacji. Jak wynika z badań Scharffa i Robbinsa (141) procesy te są odwracalne; w zależności od stanu fizjologicznego komórki, mRNA z formy zamaskowanej może przechodzić w formę aktywną w polisomach lub odwrotnie, mRNA polisomów może przechodzić w formę nieaktywną w celu przechowania i wykorzystania informacji w późniejszym etapie rozwoju. Aktywacja (lub inhibicja) jak również stabilizacja cząsteczek mRNA realizowana poprzez udział specyficznych białek dołączonych do odpowiednich sekwencji mRNA może zachodzić poprzez zmiany w trzeciorzędowej strukturze białka pod wpływem efekto-



rów allosterycznych lub zmiany stężenia jonów, zmian chemicznych w cząsteczkach białkowych oraz przez odłączenie znacznej części czy nawet wszystkich białek i dołączenie nowych. Na szczególną uwagę zasługują doświadczenia wskazujące na udział fosforylacji oraz działania proteaz w regulowaniu aktywności mRNA w cytoplazmie. Wykrycie ufosforylowanych białek dołączonych do cytoplazmatycznego mRNA (80, 128) jak również obserwowany u różnych organizmów gwałtowny wzrost aktywności proteaz towarzyszący przejściu komórki ze stanu pasywnego w aktywny wskazują sposób, w jaki może następować wymiana białek towarzyszących mRNA przy przejściu z formy zamaskowanej w aktywną. Wydaje się, że nie zawsze cała ilość informacji genetycznej występującej na terenie cytoplazmy zostaje wykorzystana. Część nieaktywnych form mRNA może ulegać rozkładowi bez przechodzenia przez etap translacji (80, 81).

### Uwagi końcowe

System regulacji transportu i wykorzystywania informacji genetycznej w komórkach eukariotycznych musi być z natury rzeczy bardziej złożony niż u bakterii. Jest to konsekwencją znacznie większej ilości informacji, którą taka komórka posiada oraz rozdzielenia w niej miejsc transkrypcji i translacji. W organizmach wielokomórkowych o zróżnicowanych tkankach, wymagania stawiane systemom regulacyjnym jeszcze bardziej się komplikują, przede wszystkim ze względu na konieczność włączania odpowiednich sygnałów w określonym czasie, co ma szczególne znaczenie podczas procesów różnicowania komórek. Opracowany przez Scherrera wielostopniowy model regulacji (71, 80, 81) przedstawiony w tym artykule zakłada możliwość pobierania informacji z centralnej pamięci komórki (DNA) i przechowywania jej w miejscu, w którym będzie użyta w przyszłości. System ten jest znacznie skuteczniejszy, jak również wymaga mniejszych nakładów energii niż taki system, który zmusza do odwoływania się zawsze do pamięci centralnej. Przedstawione w artykule wyniki doświadczeń wykazały, że zarówno w początkowej fazie rozwoju embrionalnego organizmów zwierzęcych (10, 44, 161, 162, 163) jak i początkowej fazie kiełkowania roślin (28, 29, 30, 31, 33, 152), podczas przeobrażenia owadów (32a, 36) a także w czasie sporulacji u mikroorganizmów (38, 39, 40), informacja potrzebna we wczesnych etapach rozwoju jest rzeczywiście przechowywana w cytoplazmie, gdzie ulega aktywacji natychmiast po przerwaniu stanu spoczynku. Przechowywane cząsteczki mRNA muszą być zdolne do rozpoznawania sygnałów przenoszonych zarówno przez makrocząsteczki jak też przez efekторы o niskim ciężarze cząsteczkowym. Ponadto łańcuchy mRNA muszą być chronione przed wpływem różnych czynników zawartych w komórce, które mogłyby wy-

wolać ich uszkodzenie lub translację w nieodpowiednim czasie. Jedynie cząsteczki białkowe są zdolne do pełnienia tak różnorodnych funkcji, jak też do precyzyjnego rozpoznawania pierwszo- i drugorzędowej struktury mRNA w czasie łączenia się w kompleksy. Wielka różnorodność białek informosomów oraz obserwowane zmiany w składzie tych białek w czasie przechodzenia mRNA z jądra do cytoplazmy i z formy pasywnej w aktywną stanowią dodatkowy, ważny argument przemawiający za ich rolą jako regulatorów aktywności templacyjnej mRNA.

Przedstawiona hipoteza regulacji syntezy i aktywności mRNA posiada w chwili obecnej dość skromny materiał doświadczalny na poparcie swej słuszności. Wobec trudności w identyfikacji cząsteczek mRNA o funkcji białek towarzyszących można tylko wnioskować na drodze pośredniej. Wydaje się jednak, że te trudności zostaną niebawem przezwyciężone dzięki zastosowaniu nowych technik wydzielania mRNA przy pomocy chromatografii na poli(U) i poli(T), celulozie oraz oddzielania rybonukleoproteidowych kompleksów mRNA od białek wiązanych w sposób niespecyficzny.

*Artykuł otrzymano 16.11.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 17.12.1974.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Jacob F., Monod J., (1961), *J. Mol. Biol.* **3**, 318—356.
2. Jacob F., Monod J., (1963), *Cytodifferentiation and Macromolecular Synthesis*, red. M. Locke, Academic Press, New York and London str. 30—64.
3. Szumiel I., (1969), *Post. Biochem.*, **15**, 565—589.
4. Zagórska L., (1968), *Post. Biochem.* **14**, 537—549.
5. Belitsina N. V., Ajthozhin M. A., Gavrilova L. P., Spirin A. S., (1964), *Biochim.* **29**, 363—375.
6. Spirin A. S., Nemer M., (1965), *Science* **150**, 214—217.
7. Monroy A., Maggio R., Rinaldi A. M., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 107—111.
8. Monroy A., (1967), *Comprehensive Biochemistry*, wyd. M. Florin i E. H. Stolz, Elsevier Amsterdam, London, New York. **28** str. 1—22.
9. Spirin A. S., (1966), *Curr. Topics in Dev. Biol.*, red. A. Moscona i A. Monroy, Acad. Press New York and London **1**, str. 1—38.
10. Spirin A. S., (1969), *Eur. J. Biochem.* **10**, 20—35.
11. Hultin T., (1961), *Exp. Cell Res.* **25**, 405—417.
12. Maggio R., Vittorelli M. L., Rinaldi A. M., Monroy A., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 436—441.
13. Nemer M., Bard S. G., (1963), *Science* **140**, 664—666.
14. Rinaldi A. M., Monroy A., (1969), *Developmental Biol.* **19**, 73—86.
15. Gross P. R., Cousineau G. H., (1964), *Exp. Cell Res.* **33**, 368—396
16. Gross P. R., (1964), *J. Expt. Zool.* **157**, 21—38.
17. Gross P. R., Malkin L. J., Moyer W. A., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 407—417.
18. Wilt F. H., Hultin T., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 313—317
19. Tyler A., (1963), *American Zool.* **3**, 109—126.



20. Brachet J., Decroly M., Ficq A., Quertier J., (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **72**, 660—662.
21. Stavay L., Gross P. R., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **57**, 735—742
22. Maggio R., Catalano C., (1963), *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 164—168.
23. Denny P. C., Tyler A., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**, 245—249.
24. Brachet J., Ficq A., Tencer R., (1963), *Exp. Cell Res.* **32**, 168—170.
25. Neyfakh A. A., (1961), *Zurn. Obszcz. Biol.* **22**, 42—48.
26. Spiegel M., Ozaki H., Tyler A., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 135—140.
27. Terman S. A., Gross P. R., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**, 595—601.
28. Jachymczyk W. J., Cherry J. H., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **157**, 368—377.
29. Cherry J. H., Kanabus J., Jachymczyk W. J., Anderson M. B., (1972), *Symp. Seed. Proteins*, red. Inglett G. E., The AVI Publishing Comp. Inc., str. 99—113.
30. Marcus A., Feeley J., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 1675—1680.
31. Barker G. R., Rieber M., (1967), *Biochem. J.* **105**, 1195—1201.
32. Sieliwanowicz B., Chmielewska I., (1973), *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl II*, **21**, 399—404.
- 32a. Ilan J., Ilan J., Quastel J. H., (1966), *Biochem. J.* **100**, 441—447.
33. Jachymczyk W. J., Sieliwanowicz B., Chlebowicz E., (1974), *Acta Biochim. Polon.* **21**, 137—143.
34. Dure L., Waters L., (1965), *Science* **147**, 410—412.
35. De Bellis R. H., Gluck N., Marks P. A., (1964), *J. Clin. Invest.* **43**, 1329—1337.
36. Smirnov V. N., Spirin A. S., Kullyev P., Zbarsky I. B., (1964), *Dokl. Akad. Nauk USSR* **155**, 957—960.
37. Wild F. H., (1965), *J. Mol. Biol.* **12**, 331—341.
38. Rosas del Valle M., Aronson A. J., (1962), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **9**, 421—425.
39. Bhagwat A. S., Mahadevan P. R., (1970), *Mol. Gen. Genetics* **109**, 142—151.
40. Van Assche J. A., Dekeersmaeker A., (1973), *Arch. Internat. Physiol. Biochem.* **81**, 389—390.
41. Hollomon D., (1969), *J. Gen. Microbiol.* **55**, 267—274.
42. Both G. W., McInnes I. L., Hanlon J. E., May B. K., Elliot W. H., (1972), *J. Mol. Biol.* **67**, 199—217.
43. Ovchinnikov L. P., Ajtkhozhin M. A., Bystrova T. F., Spirin A. S., (1969), *Mol. Biol. (USSR)* **3**, 449—463.
44. Spirin A. S., (1972), *The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation*, red. L. Bosch. North Holland Publishing Comp. Amsterdam, London. str. 515—531.
45. Henshaw E. C., (1968), *J. Mol. Biol.* **36**, 401—411.
46. Williamson R., (1973), *FEBS Letters* **37**, 1—6.
47. Infante A. A., Nemer M., (1968), *J. Mol. Biol.* **32**, 543—565.
48. Belitsina N. V., Ovchinnikov L. P., Spirin A. S., Gendon Y. Z., Chernos V. I., (1968), *Mol. Biol. (USSR)* **2**, 727—741.
49. Spohr G., Granboulan N., Morel K., Scherrer K., (1970), *Eur. J. Biochem.* **17**, 296—318.
50. Faiferman J., Hamilton M. G., Pogo A. O., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 550—563.

51. Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U., Doschanov Kh. J., (1973), *FEBS Letters* **31**, 104—106.
52. Ajtkhozhin M. A., Akhanov A. U., (1974), *FEBS Letters* **41**, 275—279.
53. Kafatos F. C., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 1251—1258.
54. Burny A., Huez G., Marbaix G., Chantrenne H., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 228—231.
55. Hendrick D., Schwarz W., Pitzel S., Tiedemann H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 278—284.
56. Ilan J., Ilan J., (1973), *Nature, New Biology* **241**, 176—180.
57. Zaslavsky V. G., Zaides V. M., Volkova Y., Kaverin N. V., Bukrinskaya A. G., (1971), *FEBS Letters* **14**, 133—137.
58. Huang A., Baltimore D., (1970), *J. Mol. Biol.* **47**, 275—291.
59. Ishikawa K., Kuroda C., Ogata K., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 316—331.
60. Faiferman J., Hamilton M. G., Pogo A. O., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 685—695.
61. Fromson D., Nemer M., (1970), *Science* **168**, 266—267.
62. Gall J. G., (1956), *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2**, (suppl.) 393—396.
63. Stevens B. J., Swift H., (1966), *J. Cell Biol.* **31**, 55—78.
64. Monneron A., Bernhard W., (1969), *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 266—288.
65. Samarina O. P., Asrijan I. S., Georgiev G. P., (1965) *Dokl. Akad. Nauk USSR* **163**, 1510—1513.
66. Georgiev G. P., Samarina O. P., (1971), *Adv. in Cell Biology*, red. D. M. Prescott, L. Goldstein, E. McConkey. Appleton-Century Crofts, New York **2**, str. 47—110.
67. Georgiev G. P., (1972), *Curr. Top. in Developmental Biol.* red. A. A. Moscona, A. Monroy. Academic Press New York, London **7**, str. 1—60.
68. Warner J. R., Soeiro R., Birnoim H. C., Girard M., Darnell J. E., (1966), *J. Mol. Biol.* **19**, 349—361.
69. Attardi G., Parnas H., Hwang M. I. H., Attardi B., (1966), *J. Mol. Biol.* **20**, 145—182.
70. Soeiro R., Birnboim H. C., Darnell J. E., (1966), *J. Mol. Biol.* **19**, 362—372.
71. Scherrer K., Marcaud L., (1968), *J. Cell. Physiol.* **72**, suppl. 1 181—212
72. Morel C., Gander E. S., Herzberg M., Dubochet J., Scherrer K. (1973), *Eur. J. Biochem.* **36**, 455—464.
73. Brysch B., (1973), *Post. Biochem.* **19**, 377—391.
74. Granboulan N., Scherrer K., (1969), *Eur. J. Biochem.* **9**, 1—20.
75. Shearer R. W., McCarthy B. J., (1967), *Biochemistry* **6**, 283—289.
76. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Molnar J., Georgiev G. P., (1968), *J. Mol. Biol.* **33**, 251—263.
77. Nakazato H., Edmonds M., Kopp D. W., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 200—204.
78. Penman S., Vesco C., Penman M., (1968), *J. Mol. Biol.* **34**, 49—69.
79. Lukanidin E. M., Zalmanson E. S., Komaromi L., Samarina O. P., Georgiev G. P., (1972), *Nature, New Biology* **238**, 193—197.
80. Scherrer K., (1973), *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Acta Endocrinologica* **74**, Suppl. 180, str. 95—129.
81. Scherrer K., Spohr G., Granboulan N., Morel C., Grosclaude J., Chezzi C., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 539—554.
82. Moule Y., Chauveau J., (1968), *J. Mol. Biol.* **33**, 465—481.
83. Imaizumi T., Digglemann H., Scherrer K., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 1122—1126.



84. Williamson R., Drewienkiewicz C. E., Paul J., (1973), *Nature New Biology* **241**, 66—68.
85. Lane C., Morel C., Gregory C., (1973), *Eur. J. Biochem.* **34**, 219—227.
86. Krichevskaya A. A., Georgiev G. P., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **194**, 316—331.
87. Albrecht C., Van Zyl J. M., (1973), *Exp. Cell Res.* **76**, 8—14.
88. Pederson T., (1974), *J. Mol. Biol.* **83**, 163—183.
89. Pederson T., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 617—621.
90. Samarina O. P., Lukanidin E. M., Georgiev G. P., (1973), *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Acta Endocrinologica* **74**, Suppl. 180 str. 130—167.
91. Schweiger A., Schmidt D., (1974), *FEBS Letters* **41**, 17—20.
92. Niessing J., Sekeris C. E., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **247**, 391—403.
93. Gallinaro-Matringe H., Jacob M., (1973), *FEBS Letters* **36**, 105—108.
94. Niessing J., Sekeris C. E., (1973), *Nature, New Biology* **243**, 9—12.
95. Niessing J., Sekeris C. E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **209**, 484—492.
96. Lukanidin E. M., Georgiev G. P., Williamson R., (1971), *FEBS Letters* **19**, 152—156.
97. Morel C., Kayibanda B., Scherrer K., (1971), *FEBS Letters* **18**, 84—88.
98. Olsnes S., (1971), *Eur. J. Biochem.* **23**, 557—563.
99. Olsnes S., Phil A., (1972), *FEBS Letters* **20**, 181—183.
100. Olsnes S., (1970), *Eur. J. Biochem.* **15**, 464—471.
101. Schweiger A., Haning K., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **204**, 317—324.
102. Perry R. P., Kelley D. E., (1968), *J. Mol. Biol.* **37**, 37—59.
103. Latorre J., Perry R. P., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **335**, 93—101.
104. Lim L., Canellakis E. S., (1970), *Nature* **227**, 210—212.
105. Kates J., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **35**, 743—752.
106. Mendecki J., Lee S. Y., Brawerman G., (1972), *Biochemistry* **11**, 792—798.
107. Sagher D., Edelman M., Jacob K. M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **349**, 32—38.
108. Adesnik M., Darnell J. E., (1972), *J. Mol. Biol.* **67**, 397—406
109. Gillespie D., Marshall S., Gallo R. C., (1972), *Nature, New Biology* **236**, 227—231.
110. Mescher A., Humphreys T., (1974), *Nature* **249**, 138—139.
111. Perry R. P., Kelly D. E., Latorre J., (1974), *J. Mol. Biol.* **82**, 315—331.
112. Hemminki K., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **340**, 262—268.
113. Penman S., Rosbach M., Penman M., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **67**, 1878—1885.
114. Blobel G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 924—928
115. Kwan S. W., Brawerman G., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 3247—3250.
116. Georgiev G. P., Ryskov A. P., Coutelle C., Mantieva V. L., Avakyan E. R., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **259**, 259—283.
117. Lukanidin E. M., Olsnes S., Phil A., (1972), *Nature, New Biology* **240**, 90—92.
118. Cartouzou G., Poire J. C., Lissitzky S., (1969), *Eur. J. Biochem.* **8**, 357—369.
119. Temmerman J., Lebleu B., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **174**, 544—550.
120. Lebleu B., Marbaix G., Huez G., Temmerman J., Burny A., Chantrenne H., (1971), *Eur. J. Biochem.* **19**, 264—269.
121. Blobel G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 88—95.

122. Samec J., Jacob M., Mandel P., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 377—385.
123. Kumar A., Lindberg U., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 681—685.
124. Jacobs-Lorena M., Baglioni C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 1425—1428.
125. Olsen G. D., Gaskill P., Kabat D., (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **272**, 297—304.
126. Bonanou-Tzedaki S. A., Pragnell J. B., Arnstein H. R. V., (1972), *FEBS Letters* **26**, 77—82.
127. Gianni A. M., Giglioni B., Ottolenghi S., Comi P., Guidotti G. G., (1972), *Nature, New Biology* **240**, 183—185.
128. Gander E. S., Stewart A. G., Morel C., Scherrer K., (1973), *Eur. J. Biochem.* **38**, 443—452.
129. Spohr G., Kayibanda B., Scherrer K., (1972), *Eur. J. Biochem.* **31**, 194—208.
130. Bryan R. N., Hayashi M., (1973), *Nature, New Biology* **244**, 271—274.
131. Sampson J., Mathews M. B., Osborn M., Borghetti A., (1972), *Biochemistry* **11**, 3636—3640.
132. Dubouchet J., Morel C., Lebleu B., Herzberg M., (1973), *Eur. J. Biochem.* **36**, 465—472.
133. Nathans D., Oeschger M. P., Polmar S. K., Eggen K., (1969), *J. Mol. Biol.* **39**, 279—292.
134. Vinuela E., (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 2303—2314.
135. Lodish H. F., Zinder N. D., (1966), *J. Mol. Biol.* **19**, 333—348.
136. Valentine R. C., Ward R., Strand M., (1969), *Adv. Virus Res.* **15**, red F. B. Bang, Academic Press, New York and London str. 1—59.
137. Bernardi A., Spahr P. F., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 3033—3037.
138. Sugiyama T., Nakada D., (1968), *J. Mol. Biol.* **31**, 431—440.
139. Filipowicz W., Zagórski W., (1972), *Post. Biochem.* **18**, 593—617.
140. Mano Y., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 216—221.
141. Scharff M. D., Robbins E., (1966), *Science* **151**, 992—995.
142. Jachymczyk W. J., Sieliwanowicz B., (1971), *Acta Biochim. Polon.* **18**, 121—128.
143. Jachymczyk W. J., Sieliwanowicz B., Zaleski J., (1972), *Acta Biochim. Polon.* **19**, 117—123.
144. Jachymczyk W. J., Zawierucha R., Sieliwanowicz B., (1971), *Acta Biochim. Polon.* **18**, 129—134.
145. Lundblad G., (1949), *Nature* **163**, 643, (1955). *Expt. Cell Res.* **1**, 264 (cyt. wg 8).
146. Salb M. J., Marcus P. I., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **54**, 1353—1358.
147. Kruh J., Labie D., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 518—531.
148. Berlinguet L., Normand A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **161**, 509—517.
149. Toczko K., Sieliwanowicz B., Jachymczyk W. J., (1969), *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl II*, **17**, 199—201.
150. Haydon A. J., Peacocke A. R., (1968), *Biochem. J.* **110**, 243—250.
151. Sluyser M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **182**, 235—244.
152. Weeks D. P., Marcus A., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 671—684.
153. Schultz G. A., Chen D., Katchalski E., (1972), *J. Mol. Biol.* **66**, 379—390.
154. Sieliwanowicz B., Kolanowska E., Chmielewska I., (1974), *Acta Biochim. Polon.* **21**, 107—112.
155. Allfrey V. G., Faulkner R., Mirsky A. E., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 786—794.



156. Kleinsmith L. J., Allfrey V. G., Mirsky A. E. (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **55**, 1182—1189.
157. Tidwell T., Allfrey V. G., Mirsky A. E., (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 1358—1364.
158. Allfrey V. G., (1971), *Histones and Nucleohistones*, red. D. M. P. Phillips, Plenum Press, New York, str. 241—294.
159. Louie A. J., Candido E. P. M., Dixon G. H., (1973), *Cold Spring Harbor Symp.* **38**, 803—819.
160. Hobday S. M., Thurman D. A., Barber D. J., (1973), *Phytochemistry* **12**, 1041—1046.
161. Gross P. R., (1967), *Curr. Topics in Dev. Biol.*, red. A. Moscona and A. Monroy, Acad. Press New York and London **2**, 1—14.
162. Gross P. R., Gross K. W., Skoultchi A. J., Ruderman J. W. (1973), *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. Acta Endocrinologica* **74**, suppl. 180, str. 244—262.
163. Slater I., Gillespie D., Slater D. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 406—411.
164. Panyim S., Chalkley R., (1969), *Biochemistry* **8**, 3972—3979.
165. Bustin M., Cole R. D., (1968), *J. Biol. Chem.* **243**, 4500—4505.
166. Kindake J. M., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 3375—3386.





ANDRZEJ DOBEK <sup>\*)</sup>, KAZIMIERZ JĘDRZEJCZAK <sup>\*\*)</sup>,  
ADAM PATKOWSKI <sup>\*\*\*)</sup>, KRZYSZTOF SZYFTER <sup>\*\*\*\*)</sup>

## Zastosowanie technik spektralnych do badania kwasów nukleinowych

### Application of the Spectral Techniques to Research of the Nucleic Acids

Metody spektroskopowe stanowią uzupełnienie klasycznych metod biochemicznych w badaniach struktury, mechanizmów reakcji i niektórych przemian energetycznych związków chemicznych. W ostatnich latach zainteresowanie tymi metodami znacznie wzrosło. Częściowo wiąże się to z udoskonaleniem i większym rozpowszechnieniem w laboratoriach biochemicznych aparatury spektralnej, a częściowo z podstawowymi zaletami metod spektralnych. Należą do nich przede wszystkim: różnorodność informacji otrzymywanych w wyniku interpretacji widma oraz możliwość odzyskania niezniszczonej próbki po wykonaniu analizy.

W toku artykułu zostaną omówione zastosowania spektroskopii ramanowskiej, spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni i spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego. Zdaniem autorów artykułu te właśnie techniki są najbardziej użyteczne i stwarzają szerokie możliwości zastosowań w badaniach biopolimerów.

## I. Spektroskopia ramanowska

### I-1. Fizyczne podstawy rozpraszania Ramana

Z teorii rozpraszania światła stworzonych na gruncie mechaniki kwantowej przez Kramersa i Heisenberga (1) oraz Diraca (2) wynikało, że światło rozproszone powinno zawierać oprócz fotonów o częstot-

<sup>\*)</sup> Mgr, Zakład Elektroniki Kwantowej, Instytut Fizyki UAM, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

<sup>\*\*)</sup> Dr, Międzywydziałowy Instytut Ochrony Pracy UAM, ul. Kantaka 2, 61-812 Poznań

<sup>\*\*\*)</sup> Mgr, Zakład Elektroniki Kwantowej, Instytut Fizyki UAM, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań

<sup>\*\*\*\*)</sup> Dr, Zakład Genetyki Człowieka, PAN, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

ci padającej  $\nu_0$  także fotony o częstościach  $\nu_0 \pm \nu_{or}$ , gdzie  $\nu_{or}$  jest częstością drgań oscylacyjno-rotacyjnych cząsteczki. Doświadczalne potwierdzenie tych przewidywań dały prace R a m a n a i K r i s h n a n a (3), którzy odkryli to zjawisko w cieczach oraz L a n d s b e r g a i M e n d e l s t a m a (4), którzy ten sam typ rozpraszania stwierdzili w kryształach kwarcu. Odkrycia powyższe były dobrym potwierdzeniem teorii kwantowo-mechanicznej.

Dla lepszego zorientowania czytelnika porównamy rozpraszanie ramanowskie (w literaturze rosyjskiej używa się terminu — rozpraszanie kombinacyjne) z innymi typami rozpraszania światła.

Jeżeli na ośrodek pada wiązka światła o częstości około  $6 \times 10^{14}$  Hz, to w świetle rozproszonym można obserwować fotony o częstościach przesuniętych o  $10$ — $10^{14}$  Hz względem fotonów padających. W granicach tych wyróżnia się trzy przedziały odpowiadające poszczególnym typom rozpraszania światła. Przesunięcie o  $10$ — $10^5$  Hz od częstości wiązki padającej odpowiada rozpraszaniu Rayleigha, o  $10^6$ — $10^{10}$  Hz — rozpraszaniu Brillouina, a o  $10^{11}$ — $10^{14}$  Hz — rozpraszaniu Ramana. Zatem przesunięcie częstości dla pasm ramanowskich mieści się w zakresie  $3$ — $3000$   $\text{cm}^{-1}$ . Posługując się odpowiednimi interferometrami Fabry-Perot można zmierzyć przesunięcie o  $1$   $\text{cm}^{-1}$ , a stosując filtry jodowe (5) i monochromatory o dwóch lub trzech siatkach, można badać przesunięcia częstości o  $10^8$ — $10^{14}$  Hz czyli o  $0,003$ — $3000$   $\text{cm}^{-1}$ .

Wszystkie przesunięcia częstości w świetle rozproszonym spowodowane są całkowicie ruchem mas (jąder) cząsteczki, a przesunięcie częstości światła rozproszonego odpowiada częstości ruchu jąder. Rozproszenie ramanowskie wywołują jedynie określone rodzaje drgań — te mianowicie, które powodują zmianę polaryzowalności cząsteczki. Natomiast drgania wywołujące zmianę momentu dipolowego cząsteczki są rejestrowane w postaci widm w podczerwieni. Wskazuje to na powiązanie i uzupełnianie się spektroskopii Ramana i w podczerwieni.

Występowanie pasm Ramana wiąże się z symetrią cząsteczki. Wibracje grup symetrycznych powodują znaczną zmianę polaryzowalności i słabą zmianę momentu dipolowego i tym samym występowanie silnych pasm Ramana i słabych w podczerwieni. Wibracje grup asymetrycznych powodują odwrotną sytuację (7).

Pochodzenie wymienionych wyżej typów rozpraszania światła można łatwo pokazać w oparciu o klasyczną teorię polaryzowalności P l a c z k a (6). Z teorii tej wynika, że warunkiem koniecznym rozpraszania Ramana jest, aby  $\frac{\delta\alpha}{\delta q} \neq 0$  (gdzie  $\alpha$  jest polaryzowalnością, a  $q$  współrzędną normalną drgania). W promieniowaniu rozproszonym pojawiają się dwie składowe: pierwsza o częstości  $\nu_0 - \nu_{or}$ , zwana składową stokesowską i druga o częstości  $\nu_0 + \nu_{or}$ , zwana składową antystokesowską. Stosunek natężeń składowej stokesowskiej (o częstości  $\nu_0 - \nu_{or}$ ) i składowej raylei-



ghowskiej (o częstości  $\nu_0$ ) wynosi około  $10^{-3}$ , zaś składowej stokesowskiej i antystokesowskiej zależy głównie od stosunku obsadzeń oscylacyjnych poziomów energetycznych. Pasma antystokesowskie obserwuje się jedynie w przypadku małych częstości oscylacji  $\nu_{0,r}$ , gdyż wtedy obsadzenie wzbudzonego poziomu oscylacyjnego w normalnej temperaturze jest stosunkowo duże. Praktycznie rejestruje się wyłącznie pasma stokesowskie ze względu na ich większą intensywność. A zatem efekt Ramana umożliwia detekcję słabych drgań, a przejawia się we wzroście natężenia światła rozproszonego, gdy częstość światła padającego  $\nu_0$  zbliża się do częstości pierwszego pasma absorpcyjnego badanej cząsteczki (8). Dodatkowe informacje o nieliniowych własnościach cząsteczek uzyskać można z badania procesów rozpraszania wymuszonego, którego teoria powstała na gruncie optyki nieliniowej (9), a pomiary są realne dzięki zastosowaniu laserów.

### I-2. Technika otrzymywania widm Ramana

W widmach ramanowskich bada się natężenie, przesunięcie częstości pasm i stopień depolaryzacji światła rozproszonego  $\rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}}$  (gdzie  $I_{\perp}$  i  $I_{\parallel}$  oznaczają odpowiednie natężenie światła rozproszonego z wektorem elektrycznym drgającym w płaszczyźnie prostopadłej i równoległej względem wektora elektrycznego wiązki wzbudzającej). Do pomiaru tych wielkości służą spektrofotometry ramanowskie. Widmo musi być wzbudzane promieniowaniem monochromatycznym obszaru widzialnego lub nadfioletowego o dużym natężeniu. Stosuje się do tego celu najczęściej lasery helowo-neonowe o długości fali  $\lambda = 6328\text{\AA}$ , lasery jonowe, tj. argonowe —  $\lambda = 4880\text{\AA}$  i  $5145\text{\AA}$  i kadmowe — gdzie  $\lambda = 4415\text{\AA}$ . Obserwacje światła rozproszonego można prowadzić pod różnymi kątami w stosunku do kierunku padania promieniowania wzbudzającego, jednak najwygodniej wykonuje się pomiary pod kątem prostym.

Badaniami ramanowskimi można objąć zarówno ciecze, proszki jak i kryształy. Badane ciecze muszą być optycznie jednorodne (nie mętne), bezbarwne i nie fluoryzujące. W celu otrzymania dobrego widma należy użyć kilka miligramów proszku lub co najmniej  $10\ \mu\text{l}$  roztworu o stężeniu 2—2,5%. Do zaniebdania jest wówczas interferencja ramanowska aktywnych drgań wody w przedziale  $3200\text{--}200\text{cm}^{-1}$ , łatwo więc można otrzymać widma ramanowskie roztworów wodnych w przeciwieństwie do widm absorpcyjnych w podczerwieni. Pasma Ramana są wąskie (od  $10\text{--}40\text{cm}^{-1}$ ), a w związku z tym łatwe do rozdzielania. Poprzez badania roztworów w  $\text{H}_2\text{O}$  i w  $\text{D}_2\text{O}$  w całym przedziale  $3200\text{--}200\text{cm}^{-1}$  otrzymuje się więcej informacji wynikających z izotopowego podstawienia niż z pomiarów absorpcji w podczerwieni.

### I-3. Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej do badania budowy kwasów nukleinowych

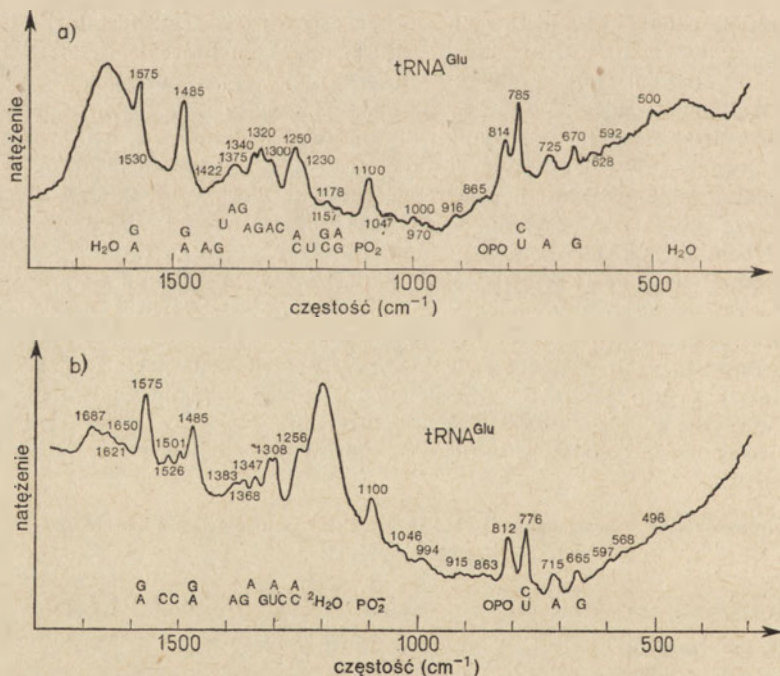
Stwierdzono, że wielogodzinne naświetlanie roztworu kwasów nukleinowych nie powoduje widocznych zmian w strukturze cząsteczek i ich własnościach biologicznych. Zasady, nukleozydy i nukleotydy bada się albo w postaci sproszkowanej, albo w roztworze wodnym, natomiast kwasy nukleinowe (zarówno naturalne, jak i syntetyczne) bada się na

ogół w roztworach. Natężenie i częstotliwości pasm Ramana zależne są od takich czynników, jak występowanie: wiązania wodorowego, asocjacji warstwowej pomiędzy zasadami azotowymi, izomerii zasad oraz tautomerii zasad.

Po raz pierwszy widma kwasów nukleinowych otrzymano przy pomocy spektrometrów wyposażonych w klasyczne źródła światła wzbudzającego (10). Przyrządy te miały niską zdolność rozdzielczą i dawały małe natężenia pasm ramanowskich. W następnych latach duży nacisk położono na interpretację widm składników kwasów nukleinowych i związków modelowych (11—15). Na badaniach tych opiera się obecnie interpretacja widm naturalnych kwasów nukleinowych. Wyraźny rozwój badań nastąpił z chwilą zastosowania wzbudzenia laserowego i monochromatorów o większej zdolności rozdzielczej.

### I-3.1. Ustalenia strukturalne

Przypisanie pasm Ramana odpowiednim zasadom umożliwia oszacowanie ilości tych zasad w łańcuchach kwasów nukleinowych. Porównanie widm ramanowskich rRNA i tRNA pozwoliło stwierdzić procentowe różnice występowania guaniny w tych związkach (16). Zestawienie widm otrzymanych dla różnych specyficznych tRNA także pozwala



**Ryc. 1.** Widma Ramana (17) roztworów tRNA<sup>Glu</sup> w a) H<sub>2</sub>O i b) D<sub>2</sub>O. Warunki: stężenie mg/ml, pH i pD = 7, temperatura T = 32°C, spektralna szerokość szczeliny  $\sigma = 10 \text{ cm}^{-1}$ , szybkość przebiegu  $r = 25 \text{ cm}^{-1}/\text{min.}$ , okres = 20s.



na porównanie zawartości poszczególnych zasad (16, 17). Dla przykładu, pasma  $1250$  i  $1300\text{cm}^{-1}$  wywołane są drganiami pierścienia cytozyny i z ich natężeń można wnioskować o ilości reszt cytozyny w łańcuchu (Ryc. 1.). W ten sposób stwierdzono, że  $\text{tRNA}^{\text{Glu}}$  zawiera więcej reszt cytozyny niż  $\text{tRNA}^{\text{Val}}$  lub  $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ .

Spektroskopia ramanowska wykazuje wysoką przydatność do badania drugorzędowej struktury kwasów nukleinowych w przypadku przyjęcia następującej ilościowej definicji: „przez strukturę drugorzędową rozumiemy ilość i rodzaj pofałdowań łańcucha w pewnych rejonach cząsteczki kwasu nukleinowego. Można ją mierzyć jako procentową zawartość: wszystkich zasad w pojedynczo i podwójnie skręconych rejonach, każdej z zasad pary Watsona-Cricka w podwójnie skręconych rejonach, każdej z zasad w pojedynczo skręconych rejonach, wszystkich zasad w uporządkowanych pojedynczo skręconych rejonach  $\alpha$  grup rybozo-fosforanowych w uporządkowanych rejonach” (21).

Z badań absorpcji w podczerwieni otrzymuje się informacje dotyczące pierwszych trzech kwestii. Natomiast spektroskopia ramanowska wykazuje wysoką użyteczność przy rozstrzyganiu pozostałych dwóch problemów. Spektroskopia ramanowska dostarcza precyzyjnych danych odnośnie udziału grup rybozo-fosforanowych w uporządkowanych rejonach cząsteczki kwasu nukleinowego. Mianowicie w widmie Ramana kwasów nukleinowych pojawiają się dwa pasma o średnim natężeniu odpowiadające symetrycznym drganiom rozciągającym  $\text{O}-\text{P}-\text{O}$  (około  $814\text{cm}^{-1}$ ) i  $\text{O}-\text{P}-\text{O}^-$  (około  $1100\text{cm}^{-1}$ ) (19–21) grupy fosfodwuestrowej. Badania wodnych roztworów kwasów nukleinowych wykazały, że pasmo  $814\text{cm}^{-1}$  pojawia się tylko w tych związkach, w których występują rejony o uporządkowanej strukturze pojedynczego heliksu (np. poli (A) i poli (C)), rejony struktur sparowanych zasad lub obie te konfiguracje równocześnie (np. A. poli (U), poli (I). poli (C), poli (G). poli (C), poli (A-U). poli (A-U), rRNA, tRNA i R17-RNA).

Eksperymenty przeprowadzone z krystalicznymi włóknami DNA i RNA wykazały ponadto, że pasmo  $814\text{cm}^{-1}$  może być charakterystyczne dla kwasów w formie A (podwójna struktura helikalna z parami zasad pochylonymi swoimi płaszczyznami pod kątem około  $75^\circ$  do osi łańcucha). Do grupy związków formy A należą uwodnione cząsteczki RNA w przeciwieństwie do uwodnionych cząsteczek DNA.

Wielkość natężenia  $I_1$  pasma  $814\text{cm}^{-1}$  jest wprost proporcjonalna do liczby wiązań dwuestrowych w uporządkowanych strukturach, a wielkość natężenia  $I_2$  pasma  $1100\text{cm}^{-1}$  jest niezależna od tego czynnika strukturalnego. Identyczne wartości  $I_1/I_2$  w badanych związkach przy tej samej sile jonowej roztworu oznaczają więc, że konformacja wiązań estrowych jest ilościowo i jakościowo ta sama w każdym z nich. Stosunek  $I_1/I_2$  jest niezależny od sekwencji zasad w sparowanych rejonach, rodza-

ju par zasad Watsona-Cricka i jest dokładnie taki sam dla polinukleotydów z całkowicie sparowanymi zasadami, jak i dla pojedynczo skręconych łańcuchów takich, jak: poli(A), czy poli(C). Ponieważ  $I_1/I_2$  nigdy nie przekracza wartości  $1,64 \pm 0,04$ , która obserwowana jest dla struktur całkowicie podwójnie helikalnych, jak i dla struktur pojedynczo helikalnych, należy stąd wnioskować, że w obu przypadkach wszystkie wiązania dwuustrowe są w podobnie uporządkowanej konfiguracji. Wyniki te sugerują, że zmierzona wartość tego stosunku w naturalnym RNA może być porównana z wartością  $1,64 \pm 0,04$  w celu określenia ilości grup fosfodwustrowych w uporządkowanych rejonach kwasu. Znając z innych badań całkowitą liczbę zasad wchodzących w skład rozpatrywanego kwasu nukleinowego (znamy ją np. dla wielu specyficznych tRNA), można dość dokładnie na podstawie badań ramanowskich określić ilość zasad znajdujących się w konfiguracjach nieuporządkowanych.

Czułym testem na określenia ilości sparowanych reszt uracylu jest wykonanie widma ramanowskiego i obliczenie na jego podstawie stosunku natężeń pasm  $1688 \text{ cm}^{-1}$  i  $1658 \text{ cm}^{-1}$ . Wartość tego stosunku jest np. większa dla tRNA<sup>Val</sup> niż dla tRNA<sup>fMet</sup> i oznacza więcej sparowanych uracyli w pierwszym z nich (co zgadza się z modelem liścia koniczyny dla rozpatrywanych kwasów). Tak więc zmiany w przedziale  $1550\text{—}1700 \text{ cm}^{-1}$  pojawiają się w wyniku zerwania wiązań wodorowych w sparowanych zasadach podwójnie skręconych odcinków (18).

### I-3.2. Badanie zmian strukturalnych

Na podkreślenie zasługuje fakt, że o ile techniki spektralne tylko w nielicznych przypadkach znajdują zastosowanie do określenia budowy biopolimerów, to doskonale nadają się do obserwacji zmian struktury wywołanych działaniem różnych czynników. W dalszym ciągu tekstu podamy przykłady wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do tych celów.

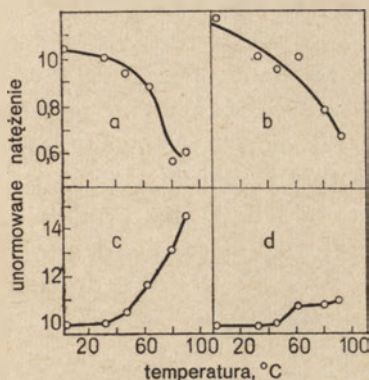
Stwierdzono, że podwyższenie temperatury powoduje silne zmiany natężenia i niewielkie przesunięcia częstości pewnych pasm ramanowskich (16—18). Zmiany te są wynikiem przejścia łańcucha kwasu nukleinowego w mniej uporządkowaną konfigurację kłębkową na skutek zrywania wiązań wodorowych odpowiedzialnych za parowanie zasad oraz zmniejszenia ilości zasad zasocjowanych warstwowo.

Dla potwierdzenia tych wniosków rozpatrzmy kilka przykładowych krzywych topnienia otrzymanych na podstawie widma Ramana dla specyficznych tRNA z *E. coli* (Ryc. 2).

Zauważono, że krzywe topnienia wynikające ze zmian natężenia pasm  $1688$ ,  $1658$ ,  $814$  i  $670 \text{ cm}^{-1}$  dla tRNA<sup>Val</sup> i tRNA<sup>fMet</sup> z *E. coli* są podobne. Wynika stąd, że wywołane podwyższeniem temperatury zmiany drugo- i trzeciorzędowej struktury tych tRNA są również podobne. Wzrost natę-



zenia pasma  $780\text{cm}^{-1}$  o  $10\%$  jest wynikiem przejścia pirymidyn (w większości cytozyn) w układy niesparowane i niezasocjowane warstwowo. Proces ten w zasadzie kończy się w  $70^\circ\text{C}$ . Krzywa topnienia pasma  $1578\text{cm}^{-1}$  nie posiada *plateau* nawet przy  $90^\circ\text{C}$ , kiedy to natężenie w porównaniu z widmem przy  $2^\circ\text{C}$  wzrosło o  $46\%$ . Ten duży hipochromizm



**Ryc. 2.** Krzywe topnienia (16) dla roztworów  $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$  w  $\text{D}_2\text{O}$  przedstawione jako natężenia w funkcji temperatury następujących pasm z widma Ramana: a)  $670\text{ cm}^{-1}$ , b)  $812\text{ cm}^{-1}$ , c)  $1578\text{ cm}^{-1}$  i d)  $780\text{ cm}^{-1}$ .

Każde pasmo zostało tak znormalizowane, aby dawało jednostkowe natężenie w  $32^\circ\text{C}$ .

zgadza się ze strukturą liścia koniczyny  $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$ , w której guaniny są w dużym stopniu w konfiguracji sparowanej i zasocjowane warstwowo nawet w wyższych temperaturach. Anomalna zmiana pasma  $670\text{cm}^{-1}$  nie daje się wytłumaczyć zwykłym efektem hipochromowym. Przebieg zależności pasma  $814\text{cm}^{-1}$  od temperatury świadczy o stałej zmianie konformacji szkieletu  $\text{tRNA}^{\text{fMet}}$  w zakresie  $2\text{--}90^\circ\text{C}$ .

Spektroskopia ramanowska pozwala również obserwować zmiany asocjacji warstwowej, mającej istotny wpływ na strukturę przestrzenną kwasów nukleinowych.

W przedziale  $1150\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$  występują drgania rozciągające pierścieni puryn i pirymidyn. Pod wpływem asocjacji warstwowej wiązania C—C i C—N zwiększają swój charakter wiązań pojedynczych i dlatego częstość i natężenie odpowiadających im pasm powinny maleć. Efekt ten obserwuje się dla pasma  $1230\text{cm}^{-1}$ , którego częstość przesuwa się do  $1243\text{cm}^{-1}$ , a natężenie rośnie przy zmniejszaniu się asocjacji warstwowej uracyli. Podobnie silny hipochromizm obserwuje się dla pasma  $1375\text{cm}^{-1}$  spowodowany asocjacją warstwową adenin, a wzrost pasma  $1484\text{cm}^{-1}$  wiąże się ze zmniejszeniem asocjacji warstwowej guanin. Również badanie przedziału  $650\text{--}800\text{cm}^{-1}$  umożliwia określenie zmiany asocjacji warstwowej cytozyn (pasma  $780\text{cm}^{-1}$ ), adenin ( $725\text{cm}^{-1}$ ) i zmian oddziaływań guanina-szkielet rybozo-fosforanowy ( $670\text{cm}^{-1}$ ) i cytozyna — szkielet ( $758\text{cm}^{-1}$ ).

Analogicznie do zmian struktury przestrzennej pod wpływem temperatury prześledzono zmiany wywołane udziałem jonów w strukturze kwasów nukleinowych.

W widmach wodnych roztworów syntetycznych polirybonukleotydów (21), tRNA (17) i rRNA (19) obserwuje się zmiany natężenia i częstości pasm w zależności od stężenia jonów takich, jak:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . W oparciu o poprzednie badania ramanowskie składników kwasów nukleinowych zmiany te można interpretować jako zmiany struktury pierścieni zasad i cukrów oraz zmiany w oddziaływaniu pomiędzy zasadami. Charakteryzują one różnice w konfiguracji szkieletu i w strukturze całej cząsteczki kwasu nukleinowego (22, 23a).

Ostatnio wykazano (23), że spektroskopia ramanowska pozwala wykryć zmiany w strukturze tRNA wywołane jego aminoacylacją. Cząsteczki aminoacylowane zawierają mniej zasad zasocjowanych warstwowo niż te same cząsteczki nie związane z aminokwasem. Zmniejsza się przy tym uporządkowanie całego łańcucha kwasu nukleinowego. Pragniemy podkreślić, że powyższe wyniki należy interpretować ostrożnie, ponieważ dotychczasowe badania dotyczyły jedynie mieszaniny tRNA z drożdży, a nie specyficznego, czystego tRNA o ustalonej strukturze.

## II. Spektroskopia absorpcyjna w podczerwieni

### II-1. Wprowadzenie

Powstawanie widm w podczerwieni jest uwarunkowane przede wszystkim drganiami atomów w cząsteczce. Widmo składa się z dużej ilości pasm, przy czym podczas analizy widma ważne jest to, aby część pasm mogła być przypisana drganiom oddzielnych ugrupowań atomów. Dostępny przedział długości fal w podczerwieni zawiera się w zakresie od  $1\mu$  do  $25\mu$  ( $4000\text{--}667\text{cm}^{-1}$ ). Aby mogła zajść absorpcja światła podczerwonego związana z określonym drganiami, musi ono powodować zmianę momentu dipolowego cząsteczki. Dlatego też cząsteczki, które mają pewne elementy symetrii, dają uproszczone widma. Wartość molowego współczynnika ekstynkcji w spektroskopii w podczerwieni waha się od około 0 do 2,000. Wartość ta jest proporcjonalna do kwadratu zmiany momentu dipolowego wywołanej przez określone drganie. Najbardziej intensywne w widmie w podczerwieni są zazwyczaj pasma absorpcji wywołane drganiami rozciągającymi.

W chemii metoda spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni znajduje szczególne zastosowanie do określania budowy związków organicznych.

Od kilkunastu lat obserwuje się szerokie zastosowanie spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni w biologii molekularnej, jako metody analitycznej pozwalającej rozróżnić związki o niewielkich różnicach budowy strukturalnej, następnie do określania struktury związków biologicznych oraz jako metody badania konformacji przestrzennej biopolimerów. Zasto-



sowanie techniki spektroskopii w podczerwieni do badania kwasów nukleinowych pozwala uzyskać stosunkowo dużą liczbę informacji o strukturze molekularnej (89, 90).

Każdy naturalny i syntetyczny kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA) i kwas rybonukleinowy (RNA) daje w rejonie  $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  około 40—50 pasm absorpcyjnych. Uzyskane pasma pojawiają się w różnych położeniach ze zmniejszoną intensywnością w zależności od rodzaju i pochodzenia kwasu nukleinowego. Każda różnica w widmie absorpcyjnym IR odzwierciedla zmiany strukturalne badanego biopolimeru, co decyduje o zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni do badania struktury kwasów nukleinowych.

## II-2. Technika otrzymywania widm w podczerwieni

Widma w podczerwieni kwasów nukleinowych można wykonywać zarówno dla roztworów, jak i dla proszków i ciał krystalicznych.

Klasyczne rozpuszczalniki stosowane w spektroskopii w podczerwieni: chloroform, czterochlorek węgla i dwusiarczek węgla są mało przydatne do badania biopolimerów. W spektroskopii w podczerwieni do badania roztworów nukleotydów, polinukleotydów i kwasów nukleinowych jako standardowego rozpuszczalnika używa się  $\text{D}_2\text{O}$  ponieważ ciężka woda w przeciwieństwie do  $\text{H}_2\text{O}$  nie absorbuje w IR w rejonie wiązań podwójnych oraz pozwala na bezpośrednie odnoszenie otrzymanych wyników do wodnego środowiska, w którym zachodzą reakcje biochemiczne. Grubość warstwy roztworu powinna wynosić około 0,05mm przy czym stężenia kwasów nukleinowych muszą być dość wysokie, przynajmniej 1,5%, a więc około 15mg/ml.

Obecnie coraz częściej bada się widma w podczerwieni proszkowych i krystalicznych próbek kwasów nukleinowych. Często jako podłoże stosuje się chlorek srebrny, który jest przepuszczalny w całym środkowym obszarze podczerwieni.

W razie potrzeby cząsteczki biopolimeru orientuje się różnymi sposobami: przez rozciąganie błony z chlorku srebra, walcowanie błony z chlorku srebra, rozmazywanie schnącego roztworu, itp.

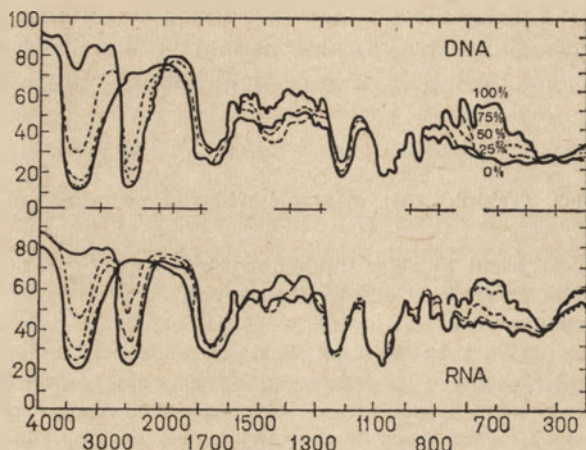
Deuterowanie kwasów nukleinowych w postaci filmu przeprowadza się za pomocą  $\text{D}_2\text{O}$  w fazie gazowej. W tym celu roztwór kwasu nukleinowego nanosi się na płytkę z  $\text{AgCl}$  lub  $\text{CaF}_2$ , a następnie umieszcza się w eksykatorze nad stężonym kwasem siarkowym w celu wysuszenia próbki. W ten sposób przygotowaną próbkę przetrzymuje się nad roztworem  $\text{D}_2\text{O}$ , który nasycono stałym chlorem sodowym. Taka procedura pozwala na łatwą wymianę atomów wodoru na deuter w fazie gazowej (za wyjątkiem wiązań C—H), przy czym wilgotność powietrza w komorze wynosi wtedy około 75%.

Dzięki tej metodzie można porównywać deuterowane i niedeuterowane filmy kwasów nukleinowych o jednakowych grubościach (Ryc. 3).

Prace Sutherlanda i Tsuboi (24, 25, 26) wykazały, że widma w podczerwieni kwasów nukleinowych, zwłaszcza DNA, zmieniają się w zależności od wilgotności powietrza. Przy wzroście wilgotności powietrza pojawiają się szerokie pasma pochodzące od  $\text{H}_2\text{O}$  w rejonie 3400, 1640 i  $700\text{ cm}^{-1}$ . Ilość wody zaadsorbowanej przez film można oznaczyć na podstawie intensywności pasma przy  $3400\text{ cm}^{-1}$ . Oznaczenia takie wskazują, że zawartość wody wzbogaca o około 40% suchą masę DNA

(7 cząstek  $H_2O$  na pojedynczy nukleotyd przy 75% wilgotności względnej otoczenia) (27).

Na uwagę zasługuje fakt, że w wilgotnym powietrzu film DNA wykazuje silniejszy dichroizm w całym zakresie widma niż w suchym powietrzu, przy czym wiele szerokich pasm staje się bardziej wyraźnymi z zaznaczoną subtelną strukturą.



**Ryc. 3.** Widma absorpcyjne w podczerwieni filmów DNA i RNA w 92% wilgotności w postaci niedeuterowanej i całkowicie deuterowanej.

Powyższe fakty autorzy próbują tłumaczyć pojawieniem się bardziej uporządkowanej struktury przestrzennej kwasu nukleinowego w miarę wzrostu wilgotności względnej powietrza.

W celu utrzymania żądanej wilgotności podczas wykonywania widm w podczerwieni film kwasu nukleinowego umieszcza się w specjalnie zbudowanej kuwecie nad roztworem  $D_2O$  nasyconym solą (25). Określoną wilgotność względną otoczenia uzyskuje się przez zastosowanie odpowiedniego roztworu soli, co podają stosowne tabele (28).

## II-3. Badania kwasów nukleinowych

### II-3.1. Struktura drugorzędowa

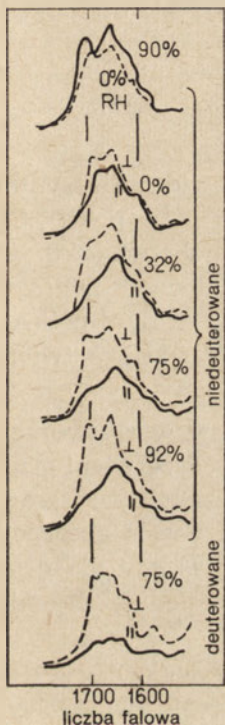
Pierwsze widma DNA w podczerwieni zostały wykonane w 1949 roku przez Blouta i Fieldesa (29). Wykonane przez autorów pomiary wykazały już wtedy dużą zależność widm w podczerwieni od wilgotności otoczenia. Zjawisko powyższe wykorzystano do badania struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych.

W tym celu Sutherland i Tsuboi (25, 26) wykonali serię pomiarów używając spolaryzowanego promieniowania do badania zorientowanych filmów DNA przy dwunastu różnych wilgotnościach powie-



trza, a następnie skorelowali swoje wyniki ze strukturą zaproponowaną przez Watsona i Cricka. Wykazali, że hydratacja kwasów nukleinowych jest niezbędna do parowania zasad podczas tworzenia heliksu. Świadczy o tym silne pasmo przy  $1703\text{ cm}^{-1}$  (grupa karbonylowa) pojawiające się powyżej 75% wilgotności względnej powietrza (Ryc. 4).

Pasmo powyższe jest nieobecne w widmie DNA z faga  $F_1$  o pojedynczej nici oraz znika w widmie filmu otrzymanego z wodnych roztworów DNA o podwójnym heliksie po działaniu dezoksyrybonukleazą, po denaturacji cieplnej lub działaniu formamidem (30).



Ryc. 4. Widma absorpcyjne w podczerwieni filmu DNA z gracji cielej w zależności od wilgotności względnej powietrza.

Polaryzacja głównych pasm pochłaniania w widmie DNA pozwala uzyskać dane o orientacji przestrzennej płaszczyzn zasad azotowych i ułożeniu grup fosforanowych. Dane te nie zaprzeczają znanemu modelowi helikalnej struktury DNA według Watsona-Cricka.

Znaczną ilość informacji dostarczają widma w podczerwieni roztworów wodnych kwasów nukleinowych, a zwłaszcza zakres odpowiadający drganiom wiązań wielokrotnych w płaszczyźnie pierścieni zasad i poza pierścieniami. Spektroskopia w podczerwieni pozwala badać oddziaływania między zasadami purynowymi i pirymidynowymi w roztworach wodnych (wiązania wodorowe i asocjacje warstwowe). W tym celu wykonano szereg badań modelowych, podczas których analizowano szczegółowo oddziaływania monomer-polimer w roztworach  $D_2O$  stosując technikę spektroskopii w podczerwieni (31, 32).

Okazuje się, że interakcja monomer-polimer w roztworze  $D_2O$  posiada pewną specyficzność, o czym świadczy fakt, że liczne zasady purynowe i pirymidynowe, nukleozydy purynowe i pirymidynowe reagują z pewnymi homopolinukleotydami tworząc dobrze zdefiniowane kompleksy, podczas gdy pozostałe kombinacje monomer-polimer nie wykazują uchwytanych oddziaływań. Na przykład adenozyne tworzy kompleks z poli(U), lecz nie wykazuje oddziaływania z poli(I).

Pomiar intensywności pasm absorpcyjnych dla wiązań N—H biorących udział w mostkach wodorowych (kompleksy asocjacyjne) pozwala oznaczyć stałą równowagi, entalpię ( $\Delta E$ ) i entropię ( $\Delta S$ ) reakcji asocjacji (33, 34).

Badania spektralne w IR pozwalają uzyskać informację nie tylko odnośnie siły wiązań wodorowych w kompleksach asocjacyjnych, lecz również wiadomości o strukturze tych kompleksów.

Grupa Miles i Frazier (35a) wykonała wiele widm IR syntetycznych polinukleotydów. Zbadali oni układy poli(A+U), poli(I+C), poli(G+C). Badając mieszaninę poli(A) i poli(U) doszli do wniosku, że występują tu trzy skręcone nici łańcuchów polinukleotydowych poli(A+2U) oraz wykazali, że poli(A+U) jest mieszaniną poli(A+2U)+poli(A). Wykonano widma dla poli(A), poli(U), poli(A+U) i poli(A+2U), potwierdzając dla poli(A+U) model Watsona i Cricka.

Podczas badania widm syntetycznych polinukleotydów w roztworach wodnych ustalono charakterystyczne częstości drgań w podczerwieni grup karbonylowych uczestniczących przy tworzeniu specyficznych par zasad: cytozyna-guanina i adenina-uracyl (adeninatymina) (35). Pasma absorpcji IR dla pierwszej pary pojawia się przy  $1720\text{cm}^{-1}$ , podczas gdy dla drugiej około  $1700\text{cm}^{-1}$ . Drgania niesparowanych zasad posiadają drgania częstości o 20 do  $30\text{cm}^{-1}$  mniejsze.

Powyższe ustalenia otrzymane dla układów modelowych wykorzystano podczas badania struktury drugorzędowej transferowych kwasów rybonukleinowych, izolowanych z materiału biologicznego (36). W tym celu wykonano pomiary absorpcji w podczerwieni deuterowanych filmów czterech specyficznych tRNA: alaninowego tRNA z *T.utilis* (37), walinowego tRNA z *T.utilis* (37), metioninowego tRNA z *E.coli* (38) i tyrozynowego tRNA z *E.coli* (38). Pod wieloma względami dane spektralne wymienionych czterech tRNA są podobne; występują jednak pewne różnice w rejonach  $1750\text{—}1400\text{cm}^{-1}$  i  $840\text{—}760\text{cm}^{-1}$ .

Obliczono widma teoretyczne na podstawie składu nukleotydowego wymienionych tRNA według metody opisanej i zastosowanej przez Thomasa (39). Porównanie ilości zasad, otrzymanej na podstawie analizy obserwowanego widma IR, z ilością zasad w modelu liścia koniczyny wymienionych czterech rodzajów tRNA o znanej sekwencji potwierdziło słuszność tego właśnie modelu struktury drugorzędowej.



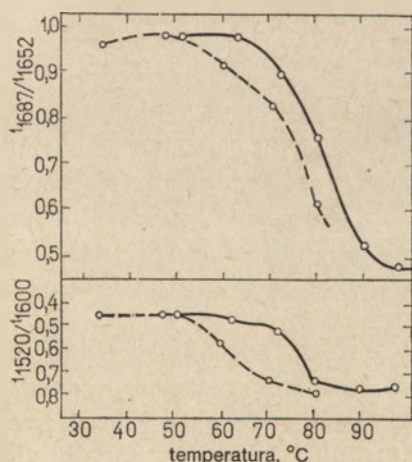
W przedstawionej metodzie analizy zastrzeżenie budzi fakt, że autorzy w celu uproszczenia pomijają w swoich rozważaniach współdziałanie rzadkich nukleotydów, które z pewnością mają wpływ na kształt widma IR kwasu (np.: cząsteczka walinowego tRNA z *T. utilis* posiada 12 rzadkich zasad na ogólną ilość 75).

Metodę Thomasa zastosowano ostatnio do badania struktury drugorzędowej roztworów rybosomalnego RNA (rRNA) z drożdży (40, 41) i wykazano, że 25% ogólnej ilości zasad w rRNA wiąże się w pary A:U, a 35% w pary G:C. Istnieją więc w cząsteczce pewne obszary niesparowane, co pozostaje w zgodności z wcześniejszą analizą rentgenostrukturalną (42).

### II-3.2. Wpływ wybranych czynników na budowę przestrzenną kwasów nukleinowych

Badano widma absorpcyjne roztworów DNA w  $D_2O$  jako funkcję temperatury. Okazuje się, że wskutek cieplnej denaturacji kwasu następują liczne zmiany spektralne widma (43, 44). Polegają one między innymi na zaniku pasma absorpcji przy  $1690\text{cm}^{-1}$  i pojawieniu się nowego przy  $1660\text{cm}^{-1}$ .

Obserwacja intensywności tych pasm pozwala wyznaczyć termiczne przejścia cząsteczek DNA z formy helikalnej do kłębkowej (42, 45). Podobne zmiany spektralne znaleziono w widmach IR kwasów nukleinowych po denaturacji spowodowanej działaniem dezoksyrybonukleazy, alkaliami (44) lub formamidem (45).



Ryc. 5. Krzywe topnienia dla tRNA<sup>Met</sup> z *E. coli* (47).

Metodami spektroskopii IR wyznaczono temperaturę przejścia formy helikalnej do kłębkowej jako  $89,65 \pm 0,5^\circ\text{C}$  dla 10% roztworu DNA z grasicy cielęcej w 0,15M KCl w  $D_2O$ .

Spektroskopia w podczerwieni pozwala również uzyskiwać krzywe topnienia, podobnie jak w ultrafiolecie. Powyższą technikę zastosowano

do badania krzywych topnienia dla metioninowego tRNA z *E. coli* wykreslanych na podstawie intensywności charakterystycznych pasm absorpcji (Ryc. 5).

Na podstawie pomiarów w podczerwieni określono rodzaje i ilości form helikalnych i kłębkowych w mieszaninach kwasów nukleinowych i polinukleotydach w zależności od stężenia  $\text{Na}^+$  i  $\text{Mg}^{+2}$  oraz przy różnych temperaturach (47).

Wprawdzie powyższe dane udało się również uzyskać wcześniej za pomocą pomiarów w nadfiolecie, jednak stosowanie techniki IR jest bardziej korzystne ponieważ widma w podczerwieni są bogatsze w pasma absorpcyjne.

Analiza widma w podczerwieni kwasów nukleinowych wykazuje obecność dwu silnych pasm o częstotliwościach ok.  $1225\text{cm}^{-1}$  i  $1080\text{cm}^{-1}$ , które pochodzą od drgań antysymetrycznych grupy  $\text{PO}_2^-$ . Stwierdzono zależność częstotliwości i intensywności pasma absorpcji grupy fosforanowej od wilgotności względnej powietrza. Przy wzroście względnej wilgotności od 0 do 65% pasmo  $\text{PO}_2^-$  antysymetryczne jest przesunięte z  $1240\text{cm}^{-1}$  do  $1220\text{cm}^{-1}$ . Oznacza to, że przy wzroście wilgotności względnej powietrza od 0 do 65% woda adsorbuje na punktach obsadzonych przez  $\text{PO}_2^- \text{Na}^+$  i tlenach POC i COC.

Zastosowanie metody spektroskopii w podczerwieni pozwala zatem na śledzenie zmian strukturalnych kwasów nukleinowych powodowanych hydratacją.

### III. Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego

#### III-1. Wprowadzenie

Spektroskopia jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) jest techniką stosowaną obecnie rutynowo do identyfikacji związków w chemii organicznej. W badaniach biochemicznych jest dotychczas mniej rozpowszechniona ze względu na konieczność dysponowania czystymi (chemicznie i magnetycznie jednorodnymi) związkami a ponadto stopień skomplikowania badanych układów implikuje większą doskonałość aparatury.

Technika NMR należy do absorpcyjnych form spektroskopii. Istotą metody jest pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego w zakresie częstości radiowych (30—300 MHz) przez próbkę związku chemicznego, umieszczonego w zewnętrznym polu magnetycznym, w sposób dla niego charakterystyczny. Absorpcja wynika ze zmiany stanu energetycznego jąder wykonujących ruch precesyjny, w wyniku przyjęcia odpowiedniej orientacji w polu magnetycznym. Częstość promieniowania elektromagnetycznego ( $\nu$ ), wywołującego przejścia z orientacji o niższej energii do orientacji o wyższej energii, wiąże się z natężeniem pola magnetycznego ( $H_0$ ) następującą zależnością:



$$\nu = \frac{\mu \cdot H_0}{h \cdot I}$$

gdzie  $\mu$  — jest momentem magnetycznym jądra,  $h$  — stałą Plancka a  $I$  — liczbą spinową. Liczba spinowa może przybierać wartość  $I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2...$  ale rezonans magnetyczny jest cechą tylko wybranych jąder, charakteryzujących się ułamkową liczbą spinową. Należą do nich między innymi:  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{31}\text{P}$ . Dwoma podstawowymi czynnikami, od których zależy kształt widma danego związku są przesunięcia chemiczne poszczególnych jąder i rozszczepienia sygnałów.

W odniesieniu do rezonansu tego samego izotopu przesunięcie chemiczne definiuje się jako różnicę w położeniu sygnału absorpcji określonego jądra w stosunku do sygnału wzorca. Powodem istnienia przesunięć chemicznych jest przede wszystkim częściowe przesłanianie jądra przez elektrony a także wpływ lokalnych pól wytworzonych przez wirujące elektrony z sąsiednich rejonów cząsteczki, co powoduje zmianę efektywnego pola magnetycznego odczuwanego przez jądro. Wartości przesunięć chemicznych podaje się w hercach (skala zależna od stosowanej częstotliwości) lub w jednostkach ppm (ang.: *parts per million*) w skali  $\sigma$  lub  $\tau$  niezależnych od częstotliwości.

Rozszczepienie sygnału wywoływane jest przez sąsiednie jądra wskutek oddziaływania ich stanów spinowych; zjawisko to nosi nazwę sprzężenia spinowo-spinowego. Powoduje ono zmianę sygnału sąsiedniego jądra z singletu w multiplet, którego krotność wynosi  $2nI + 1$ , gdzie  $n$  oznacza ilość oddziaływujących jąder. Intensywności sygnałów wyznaczają współczynniki rozwiniętego wyrażenia  $(a+b)^n$ . Wielkość sprzężenia jest cechą związku a nie zewnętrznego pola (tzn. np. aparatu) i jej wartość wyraża się w hercach.

Szczegółowe wprowadzenie do spektroskopii NMR jest przedmiotem licznych opracowań monograficznych i podręcznikowych (48—50).

### III-2. Technika wykonywania widm NMR

W większości przypadków w badaniach kwasów nukleinowych stosuje się technikę protonowego rezonansu magnetycznego (PMR). Część informacji — często niemożliwych do ustalenia metodą PMR — osiąga się dzięki rezonansowi innych jąder. Do badania geometrii wiązań fosforanowych wykorzystano rezonans jąder  $^{31}\text{P}$  (51, 52); rezonans jąder  $^{13}\text{C}$  badano w celu określenia miejsca oddziaływania między jonem metalu a nukleotydem (53—56). Stałe sprzężenia pomiędzy  $^{13}\text{C}$  a  $^{31}\text{P}$  posłużyły do ustalenia wzajemnej konformacji grupy fosforanowej i rybozy (57). Nie powiodła się natomiast próba zastosowania techniki  $^{13}\text{C}$ —NMR do badania asocjacji warstwowej i parowania się zasad (58). Ostatnio odnotowano pierwsze udane próby identyfikacji niektórych rzadkich nukleotydów we widmie  $^{13}\text{C}$ —NMR drożdżowego tRNA (59).

W badaniach składników kwasów nukleinowych na ogół wystarczają spektrometry wyposażone w generatory pól o częstościach 60—120MHz. Natomiast postęp w badaniach kwasów nukleinowych osiągnięto dopiero z chwilą zastosowania wysokorozdzielczych spektrometrów o częstościach pól: 220 i 300MHz. Należy tutaj podkreślić, że wprowadzenie takich spektrometrów miało charakter osiągnięcia nowej jakości w analizie spektralnej a nie zwykłego udoskonalenia aparatury i pozwoliło na rozpoznanie bardzo niewielkich różnic przesunięć chemicznych, co jest szczególnie ważne podczas badania biopolimerów. Czytelne widma kwasów nukleinowych i ich składników uzyskuje się najczęściej dopiero dzięki zastosowaniu przystawki, umożliwiającej kilkudziesięcio- lub kilkusetkrotne powtórzenie widma (pozwala to na zniwelowanie szumów i wyeksponowanie sygnałów pochodzących od badanej próbki) a następnie interpretację widma metodą analizy Fouriera.

Ponieważ mechanizm przenoszenia energii w ciałach stałych powoduje skomplikowanie obrazu widmowego, w przypadku substancji biologicznych bada się wyłącznie widma NMR cieczy. Przygotowanie próbki polega na sporządzeniu buforowanego wodnego roztworu kwasu nukleinowego o stężeniu 1,5—40mM, co odpowiada około 25—120 mg/ml. Z dużego stężenia nie wynika konieczność posiadania znacznej ilości badanej substancji, gdyż objętość próbki wynosi ok. 0,1ml a w przypadku stosowania mikroprobówek tylko 0,025ml (60). Bardziej przejrzyste widma otrzymuje się z buforów sporządzanych w oparciu o D<sub>2</sub>O. W wyjątkowych przypadkach stosowano dwumetylosulfotlenek (DMSO), który powoduje denaturację tRNA (61). Wzorce przesunięć chemicznych nie odbiegają od powszechnie stosowanych. Dobrym układem odniesienia do badania sygnałów w rejonie bardzo niskich pól wodnych roztworów jest sól sodowa kwasu 2,2-dwumetylo-2-silopentano-5-sulfonowego (DSS).

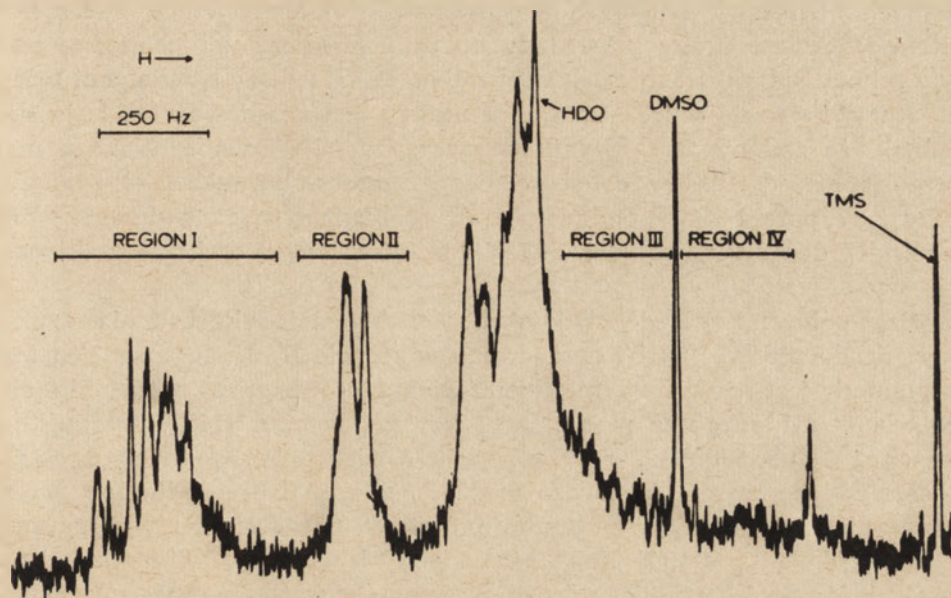
### III-3. Badania struktury kwasów nukleinowych

#### III-3.1. Struktura pierwszo- i drugorzędowa

W literaturze opisano widma NMR wielu składników kwasów nukleinowych. Znane są zarówno widma podstawowych nukleozydów i nukleotydów, polinukleotydów, jak i szeregu modyfikowanych pochodnych. Mimo to odszukanie we widmie kwasu nukleinowego sygnałów pochodzących od poszczególnych zasad jest możliwe tylko w pewnych przypadkach.

Na rycinie 6 przedstawiono widmo PMR tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży piekarniczych wykonane na wysokorozdzielczym aparacie przy częstości 220 MHz. Wyróżnia się w nim 4 regiony, w których umiejscowiono następujące sygnały: W rejonie I występują protony H—8 i H—2 adeniny, H-8guaniny i H—6 pirymidyn. Rejon II zawiera protony H—5 pirymidyn i H—1' rybozy wszystkich nukleozydów. Sygnały pozostałych protonów rybozy są pomiędzy rejonem II i III. Rejon III i IV odpowiada przesunięciom chemicznym grup metylowych i metylenowych, znajdujących się w rzadkich nukleozydach (61). Podobnie wyjaśniono pochodzenie rejonu I i II we widmie tRNA<sup>Ala</sup> z drożdży. Natomiast w rejonie wysokich pól od-





Ryc. 6. Pojedyncze widmo tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży (100mg/ml w 83% DMSO) otrzymane na aparacie Varian przy częstotliwości 220 MHz (61).

naleziono sygnały, które przypisano: 1-metyloguanozynie, N<sup>2</sup>-dwumetyloguanozynie, 5,6-dwuhydrourydyń i tymidynie, tzn. protonom grup metylowych, i 5,6-wodorowych rzadkich nukleozydów. O ile już pojedyncze widmo pozwala na wyraźne wydzielenie rejonu I i II, to sygnały rzadkich nukleozydów stają się czytelne dopiero w wyniku 150—200 powtórzeń (62).

W opisanym wyżej widmie tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży nie odnaleziono sygnałów pochodzących od supermodyfikowanego nukleozydu Y (61). Zlokalizowano je jedynie w sześcienukleotydzie GmpApApYpApψ<sub>p</sub> wyciętym z ramienia antykodonowego tRNA<sup>Phe</sup> z *T. utilis*. Na podstawie widma NMR ustalono konformację nukleozydu Y w badanym sześcienukleotydzie, prawdopodobnie odpowiadającą konformacji zajmowanej w natywnym tRNA. Cytowana praca pozwoliła równocześnie na wniesienie poprawek do proponowanej uprzednio struktury zasady Y (63).

Możliwość wykrycia rzadkich nukleozydów stwarza także rezonans innych jąder. Komorski i Allerhand (59) donieśli o wykryciu sygnałów dwuhydrourydyń, pseudourydyń i tymidyny w widmie <sup>13</sup>C-NMR niefrakcjonowanego drożdżowego tRNA.

Z powyższego wynika, że zastosowanie spektroskopii NMR do badania struktury pierwszorzędowej kwasów nukleinowych stwarza ograniczone możliwości, gdyż nawet oznaczenie składu nukleotydowego na podstawie widma jest nieosiągalne. Można natomiast potwierdzić występowanie określonych rzadkich nukleozydów.

Nieporównywalnie większe są możliwości spektroskopii NMR w ba-

daniach struktury drugorzędowej kwasów nukleinowych a zwłaszcza tRNA. Pierwsze próby prowadziły do ustalenia korelacji pomiędzy powierzchnią pod sygnałami pochodzącymi od H—1' rybozy a zmianami temperatury, które wywołują zmiany struktury drugorzędowej. Okazuje się jednak, że zmiany te są wynikiem agregacji tRNA wobec NaCl a nie przekształceń struktury drugorzędowej. Sugerowano także, że sygnały przy 3,07 ppm i 3,90 ppm mają wartość diagnostyczną podczas badań struktury drugorzędowej (64). Sugestia ta nie została dotychczas praktycznie wykorzystana.

Szczegółową i, jak się wydaje, niezawodną metodykę badania struktury drugorzędowej tRNA opracowano w zespole D. J. Kearnsa. Podstawą metody jest rozszyfrowanie rejonu widma leżącego przy bardzo niskich polach, otrzymanego za pomocą wysokorozdzielczego NMR przy częstościach 220 lub 300 MHz. Przy przejściu z roztworów wodnych do D<sub>2</sub>O obserwuje się w rejonie bardzo niskich pól sygnały powodowane przez grupę niewymienialnych na deuter protonów (65). Jest to równoznaczne z identyfikacją protonów zaangażowanych aktualnie w wiązania wodorowe, które — jak wynika z teorii Watsona-Cricka — są podstawą parowania się zasad i tworzenia heliksu. Głównym czynnikiem powodującym przesunięcie ich sygnałów w obszar tak niskich pól jest oddziaływanie prądu kołowego sąsiednich zasad azotowych. Obserwację tego rodzaju, dokonaną na niefrakcjonowanym drożdżowym tRNA i tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży, potwierdzono dla czterech dalszych tRNA: tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Phe</sup> i tRNA<sup>fMet</sup> z *E.coli* (66).

Dowodu na udział protonów absorbujących w rejonie niskich pól w wiązaniach wodorowych dostarczają następujące fakty: sygnały nie ulegają zmianom wraz z rozcieńczeniem, natomiast wzrost temperatury ponad 75°C powoduje prawie całkowity zanik sygnałów. Ponieważ w badanym rejonie występuje tylko rezonans protonów związanych z atomami azotu więc — zgodnie z założeniami Watsona i Cricka — każdej parze zasad odpowiada tylko 1 proton. Na tej podstawie można było obliczyć, że ilość par zasad w tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży wynosi  $23 \pm 2$  i w tRNA<sup>fMet</sup> z *E.coli*  $23 \pm 2$  pary. Obydwie wartości są wyższe o, odpowiednio, 2 i 3 pary w stosunku do ilości wynikającej z modelu liścia koniczyny (66).

Całkowitą zbieżność z modelem liścia koniczyny otrzymano dla tRNA<sup>L<sub>3</sub><sup>eu</sup></sup> z drożdży, którego natywna i zdenaturowana konformacja jest ściśle zdefiniowana i opisana. Wykazano, że zdenaturowany tRNA<sup>L<sub>3</sub><sup>eu</sup></sup> posiada 18 par zasad i w wyniku renaturacji zyskuje 3—5 par G:C, tracąc jednocześnie 0—2 par A:U (67).

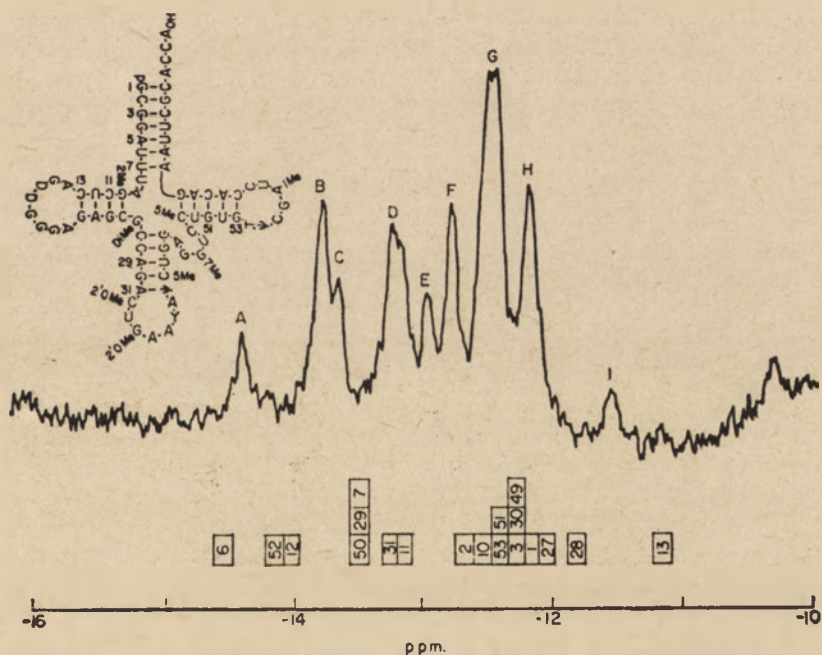
Określono także przesunięcia chemiczne protonów zaangażowanych w poszczególne wiązania. Dla pary A:U przesunięcie wynosi —14,8 ppm, dla pary G:C —13,7 ppm i dla pary A:Ψ —13,5 ppm. Są to położenia zasadnicze; odchylenia od nich pozwoliły na bliższą interpretację rejonu niskich pól dla tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>fMet</sup> i tRNA<sup>Phe</sup> z *E.coli* oraz



tRNA<sup>Tyr</sup> i tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży piekarskich. We wszystkich przypadkach wyliczono ilość par zasad zgodną z modelem liścia koniczyny i przypisano niektóre sygnały konkretnym parom (68). Natomiast w przypadku tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży, w oparciu o obliczenia i widma tRNA<sup>Phe</sup>, jego fragmentów i cząsteczek modyfikowanych, w pełni zinterpretowano widmo w rejonie niskich pól i umiejscowiono wszystkie wiązania wodorowe, jak to przedstawiono na rycinie 7 (60).

Przez analogię do interpretacji widma tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży całkowicie potwierdzono model struktury drugorzędowej tRNA<sup>fMet</sup> i tRNA<sup>Glu</sup> z *E.coli* bez uciekania się do dodatkowych zabiegów chemicznych. Rozbieżności między widmem obliczonym a otrzymanym nie przekraczały 0,2 ppm (69).

Generalną konkluzją wyprowadzoną z powyższych prac jest stwierdzenie, że model liścia koniczyny wprowadzony przez Holley'a dokładnie odzwierciedla strukturę tRNA w roztworze. Tak więc technika wysokorozdzielczego NMR dostarczyła bezpośredniego dowodu potwierdzającego słuszność przyjętego wcześniej modelu struktury drugorzędowej tRNA. Jak dotychczas wszystkie przedstawione wyżej dane, dotyczące drugorzędowej struktury tRNA pochodzą tylko z jednego laboratorium.



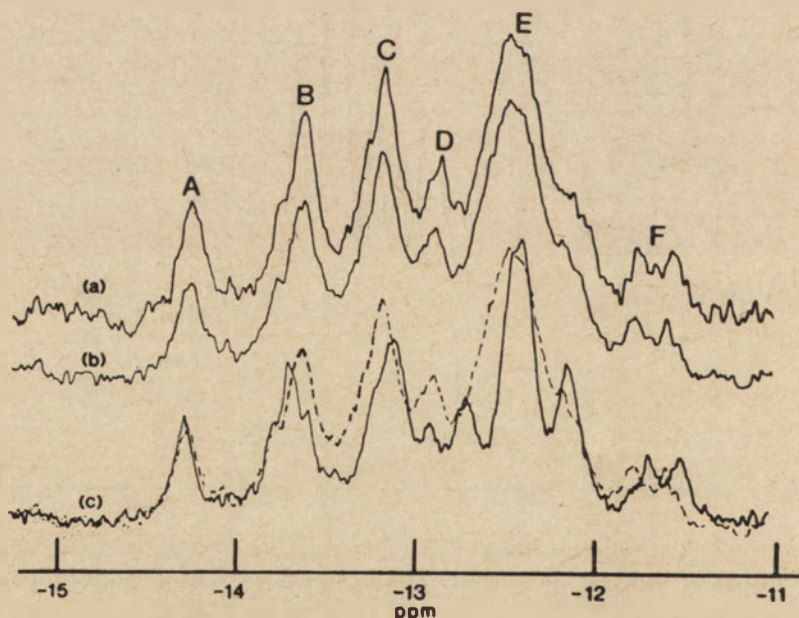
Ryc. 7. Umiejscowienie wiązań wodorowych w cząsteczce tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży w rejonie niskich pól (300 MHz, Varian HR) (60).

## III-3.2. Struktura przestrzenna

Struktura drugorzędowa kwasów nukleinowych jest stabilizowana głównie siłami wiązań wodorowych a struktura przestrzenna za pomocą asocjacji warstwowej zasad azotowych. Oba te efekty uzupełniają się wzajemnie. O ile wiązania wodorowe powodują — jak to wykazano wyżej — przesunięcie sygnałów w dół pola, to asocjacja warstwowa przyczynia się do ich przesunięcia w rejon wyższych pól. Ze względu na odsłaniający wpływ pierścienia aromatycznego efekt ten łatwiej zaobserwować w nukleotydach purynowych. Najsilniejszych przesunięć doznają protony H-2 i H-8 puryny (70).

W pierwszych pracach Kearnsa dotyczących wiązań wodorowych w tRNA zakładano, że jednym z powodów różnic ilości par zasad obliczonych na podstawie modelu liścia koniczyny i widma NMR jest dodatkowe parowanie się w ramach struktury trzeciorzędowej (66). Jednakże wykazano brak jakichkolwiek dodatkowych wiązań w stosunku do modelu liścia koniczyny dla tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży (68), tRNA<sup>fMet</sup> i tRNA<sup>Glu</sup> z *E.coli* (69). Fakt ten jest dosyć zaskakujący i stoi w sprzeczności z niektórymi modelami przestrzennymi tRNA, np. Levitta i Cramera (71).

Wnioski stereochemiczne formułuje się także w oparciu o spostrzeżenie, że rezonans par położonych przy końcach podwójnej spirali jest bardziej wrażliwy na otoczenie niż rezonans par występujących wewnątrz



Ryc. 8. Porównanie widm roztworów wodnych fenyloalanilo-tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży przy pH 5 (a) z tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży przy pH 5 (b) oraz z tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży w obecności fenyloalaniny przy pH 5 (c) i nieobecności przy pH 7 (c, linia przerywana) (75).



heliksu. W ten sposób ustalono, że ramię dwuhydrourydylowe tworzy ciągły heliks z ramieniem antykodonowym. Ponieważ taki sam układ występuje w kryształach (72) nie jest wykluczone, że może on stanowić ogólną cechę tRNA (69).

Zgodnie z dotychczasowym stanem wiedzy twierdzono, że aminoacylacja tRNA zmienia nieznacznie jego konformację, zwłaszcza w rejonie ramienia akceptorowego (73, 74). Tymczasem na podstawie widm przedstawionych na rycinie 8 wyprowadzono wniosek o braku różnic konformacyjnych pomiędzy tRNA<sup>Phe</sup> i Phe-tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży. Mimo zaskakującego wyniku słuszność wniosku potwierdza wysoka dokładność eksperymentu, gdyż analizę widma przeprowadzono z dokładnością 0,05 ppm a więc ewentualne różnice położenia atomów poszczególnych zasad nie przekraczają 0,1—0,2Å (75). Natomiast z drugiej strony porównanie widm walinalowego tRNA z drożdży przed i po acetylacji wykazało przesunięcie sygnału <sup>31</sup>P w górę pola w wyniku acetylacji. Zinterpretowano to jako wpływ pola elektrycznego reszty acetylowej na jądra fosforu (52).

Taka sama dokładność cechowała badania nad wpływem usunięcia zasady Y z węzła antykodonowego tRNA<sup>Phe</sup> z drożdży. Ustalono, że wykazywane innymi metodami (76) niewielkie różnice budowy przestrzennej między tRNA<sup>Phe</sup> a tRNA<sup>Phe</sup> pozbawionym zasady Y lecz zachowującym nienaruszony szkielet rybozowo-fosforanowy ograniczają się do zmian w węźle antykodonowym, który częściowo „odplata” się od zwartej struktury kłębkowej (77).

Możliwość badania konformacji, a zwłaszcza geometrii szkieletu rybozowo-fosforanowego stwarza rezonans jąder <sup>31</sup>P (51). Dotychczas jednak nie odnotowano zadowalających prób wykorzystania tej techniki a zastosowania <sup>31</sup>P—NMR ograniczają się do śledzenia wpływu aminoacylacji na strukturę (powyżej) i postępu degradacji cząsteczki tRNA (52).

Przedmiotem wnikliwych badań była stereochemia nukleozydów, tzn.: konformacje pierścienia furanozy, swobodna rotacja wokół wiązania N-glikozydowego, konformacje wicinalnych protonów H—1' i H—2' oraz egzocyklicznej grupy C—5'H<sub>2</sub>OH i jest ona przedmiotem szeregu prac szczegółowych i przeglądowych lecz wybiega poza ramy niniejszego opracowania (78—80). Ponadto ustalenia w tej grupie związków dotyczą wyłącznie składników kwasów nukleinowych i nie można przenosić ich na polimery, chociaż nie wszyscy autorzy podzielają to zdanie (79).

### III-3.3. Zmiany struktury kwasów nukleinowych w czasie reakcji chemicznych

Reaktywność kwasów nukleinowych jest w znacznym stopniu powiązana z obecnością jonów metali, które niejednokrotnie warunkują przebieg i kierunek reakcji. Spektroskopia NMR jest wysoce przydatna w badaniach kwasów nukleinowych i metali, bowiem umożliwia precyzyjne ustalenie miejsca oddziaływania jonu metalu z cząsteczką kwasu nukleinowego.

Jony paramagnetyczne zwiększając czas relaksacji powodują poszerzenie sygnałów grup, z którymi są związane. Z pomiarów  $^{13}\text{C}$ —NMR wynika, że jony  $\text{Mn}^{+2}$  powodują poszerzenie sygnałów C—5 i C—8 adeniny we wszystkich jej nukleotydach. Oznacza to, że głównym atomem oddziaływującym z  $\text{Mn}^{+2}$  jest N—7 w adenosynie i jej pochodnych. Zatem jony  $\text{Mn}^{+2}$  tworzą mostek między grupą fosforanową (z którą oddziałują elektrostatycznie) a zasadą, co w przypadku 3'— i 2'—AMP wymaga znacznych naprężeń konformacyjnych (53). Podobne wyniki otrzymano dla pozostałych nukleotydów purynowych, z tym, że techniką  $^{31}\text{P}$ —NMR potwierdzono fakt jednoczesnego oddziaływania jonów metali z zasadą azotową i fosforanem (54, 55). Kolejnego potwierdzenia proponowanego modelu oddziaływania jonów metali z nukleotydami dostarczyli W e s e r i wsp. (81), którzy badali kompleks  $\text{Cu}^{+2}$ —AMP. Natomiast w serii nukleotydów pirymidynowych stwierdzono lokowanie się jonów metali ( $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ) w pobliżu atomu azotu N—3 pirymidyny (54, 56).

Szereg jonów metali ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Ag}^{+2}$ ) wywołuje poszerzenie wszystkich sygnałów zasady azotowej, co oznacza, że metale te wiążą się z całą cząsteczką zasady w wyniku przeniesienia ładunku. Efektu tego nie wywołują:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  i  $\text{NH}_4^+$ . Wiązanie z zasadą w wyniku przeniesienia ładunku nie wyklucza możliwości jednoczesnego wiązania elektrostatycznego z innym fragmentem cząsteczki, np. fosforanem lub grupą 2'—OH rybozy (82).

Trudniejszą kwestię stanowi zlokalizowanie miejsca oddziaływania jonów metali z cząsteczką natywnych kwasów nukleinowych. Wstępny komunikat, donoszący o wykorzystaniu metali ziem rzadkich do badania struktury przestrzennej tRNA za pomocą NMR wskazuje, że pod wpływem jonów  $\text{Eu}^{+3}$ ,  $\text{Pr}^{+3}$  i  $\text{Dy}^{+3}$  zmieniają się sygnały powodowane przez wiązania wodorowe w ramieniu akceptorowym. Odpowiada to lokowaniu się wymienionych jonów w tym rejonie (83).

Problem oddziaływania kwasów nukleinowych z białkami i peptydami ma kluczowe znaczenie w objaśnianiu mechanizmu biosyntezy białka i procesu przenoszenia informacji genetycznej. Wykorzystanie metody NMR do rozwikłania tego problemu, według stanu wiedzy sprzed roku 1972 przedstawiono w pracy przeglądowej (70). W większości prac, badając oddziaływanie kwasów nukleinowych z białkami, rejestruje się zmiany we widmach białek. Jest to uzasadnione większym zróżnicowaniem widm białek, wynikającym z różnych przesunięć chemicznych wszystkich aminokwasów wchodzących w skład białka. Opis tego kierunku wybiega daleko poza ramy opracowania. W nielicznych pracach omawiających interakcję kwas nukleinowy—białko z punktu widzenia kwasu nukleinowego oparto się na układach modelowych. Sygnały H—2 i H—8 adeniny w łańcuchu poli A ulegają przesunięciu w dół pola wobec aminokwasów. Świadczy to o zaniku asocjacji warstwowej wskutek interkalacji pierścieni aromatycznych aminokwasów pomiędzy zasady poli(A) (84).



Podobne zmiany następują w rejonie 5,5—8,5 ppm we widmie DNA i poli(A) w wyniku oddziaływania z trójpeptydami. Oddziaływanie następuje przypuszczalnie na zasadzie przeniesienia ładunku (85). Ponieważ inne prace donoszą o elektrostatycznej naturze oddziaływania niewykluczone jest występowanie łączne obu efektów.

Obecny etap zastosowań spektroskopii NMR do badania kwasów nukleinowych charakteryzuje ilościowa i jakościowa przewaga ustaleń otrzymanych dla tRNA w stosunku do innych rodzajów kwasów nukleinowych. Ostatnio opublikowano pracę, w której wykorzystano doświadczenia zdobyte podczas pracy nad strukturą tRNA do potwierdzenia modelu drugorzędowej struktury 5S RNA z *E.coli* (86). Skupienie uwagi na tRNA pozostaje w ścisłym związku z możliwością korelowania danych spektralnych z wieloma opublikowanymi strukturami tRNA (87) i daleko precyzyjniejszymi poglądami na budowę przestrzenną tRNA niż w przypadku RNA i DNA.

#### IV. Uwagi końcowe

Omówione techniki spektralne znacznie przyczyniły się do poszerzenia i pogłębienia informacji o budowie kwasów nukleinowych. Wykazują one szczególną przydatność do badania zmian, nawet bardzo subtelnych, wywołanych wpływem temperatury, siły jonowej, aminoacylacji itp. Do głównych osiągnięć należy zaliczyć bezpośrednie potwierdzenie hipotetycznego modelu drugorzędowej struktury tRNA — tzw. modelu liścia koniczyny za pomocą spektroskopii NMR oraz możliwość precyzyjnego

Tabela 1.

Zastosowania i ograniczenia

	Spektroskopia		
	R	IR	NMR
Oznaczenie składu nukleotydowego	fragmentarycznie możliwe	fragmentarycznie możliwe	niemożliwe
wykrycie rzadkich nukleotydów	tylko hU	niemożliwe	możliwe dla szeregu pochodnych
parowanie zasad	możliwe	możliwe	doskonale
asocjacja warstwowa	doskonale	możliwe	wstępne próby
wielkość próbki		p o r ó w n y w a l n a	
główne ograniczenia	tylko dla roztworów bezbarwnych i przezroczystych	głównie dla roztworów niewodnych	konieczność stosowania trudnodostępnej aparatury wysokiej klasy

określania zmiany stopnia uporządkowania cząsteczki i asocjacji warstwowej zasad azotowych RNA i DNA dzięki spektroskopii R.

Informacje otrzymywane za pomocą widm uzupełniają się i celowym jest stosowanie różnych technik spektralnych. W badaniach składników

kwasów nukleinowych znaczną rolę odgrywa także spektroskopia masowa, dichroizm kołowy i optyczna dyspersja rotacyjna. Ostatnie dwie techniki wykazują także pewną użyteczność w badaniu biopolimerów. Rutynowo, ale głównie w doraźnych celach (potwierdzenie obecności, oznaczenia ilościowe), stosuje się spektroskopię absorpcyjną w świetle UV.

W celu lepszego wykazania przydatności omówionych technik do określonych celów przeprowadzono tabelaryczne porównanie ich możliwości i ograniczeń (88):

*Autorzy dziękują doc. dr hab. W. Z. Antkowiakowi za pomoc w przygotowaniu opracowania.*

*Artykuł otrzymano 4.5.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 12.12.1974.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Kramers H. A., Heisenberg W., (1925), *Z. Phys.*, **31**, 681—708.
2. Dirac P. A. M., (1927), *Proc. R. Soc. A*, **114**, 243—265, 710—728.
3. Raman C. V., Krishnan K. S., *Proc. R. Soc. (A)*, (1927), **117**, 1—11; *Phil. Mag.*, (1928), **5**, 498; *Nature*, (1928), **121**, 501—711.
4. Landsberg G., Mandelstam L., (1928), *Naturwiss*, **16**, 557—772.
5. Brown K. E., Erfurth S. C., Small E. W., Peticolas W. L. (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.*, **13**, 4231—4310.
6. Placzek G. (1934), *Handbuch der Radiologie*, E. Marx editor, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
7. Kęcki Z. (1972), *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN, Warszawa.
8. Peticolas W. L., Nafie L., Stein P., Franconi B., (1970), *J. Chem. Phys.*, **52**, 1576—1584.
9. Kielich S., (1973), *Podstawy optyki nieliniowej, część II*, UAM, Poznań.
10. Malt R. R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **120**, 461—462.
11. Lord R. C., Thomas G. J. Jr, (1967), *Spectr. Acta.*, **23A**, 2551—2591.
12. Lord R. C., Thomas G. J. Jr, (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, **142**, 1—11.
13. Peticolas W. L., Small E. W., Fanconi B. (1971), *Polymer Characterization*, Plenum Press, 47—77.
14. Small E. W., Peticolas E. L. (1971), *Biopolymers*, **10**, 69—88.
15. Brown K. G., Kiser E. J., Peticolas W. L. (1972), *Biopolymers*, **11**, 1855—1869.
16. Thomas G. J., Medeiros G. C., Hartman K. A. (1972), *Biochem. Biophys. Acta*, **227**, 71—79.
17. Thomas G. J., Chen M. C., Hartman K. A. (1973), *Bioch. Bioph. Acta*, **324**, 37—49.
18. Thomas G. J., Jr, Medeiros G. C., Hartman K. A. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 587—592.
19. Thomas G. J., Jr (1970), *Bioch. Bioph. Acta*, **213**, 417—423.
20. Shimomouchi T., Tsuboi M., Kyogoku S. (1964), *Adv. Chem. Phys.*, **7**, 435—498.
21. Thomas G. J. Jr, Hartman K. A. (1973), *Bioch. Bioph. Acta*, **312**, 311—322.
22. Rice J., Lafleur L., Medeiros G. C., Thomas G. J. Jr (1973), *J. Raman Spectr.*, **1**, 207—215.
23. Thomas G. J. Jr, Chen M. C., Lord R. C., Kotsiopoulos P. S., Tritton T. R., Mohr S. C. (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 570—577.



- 23a. Dobek A., Patkowski A., Labuda D., Augustyniak J., praca złożona do druku w *J. Raman Spectr.*
24. Tsuboi M. — Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids.
25. Tsuboi M. (1957), *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1351—1354.
26. Sutherland G. B., Tsuboi M. (1957), *Proc. R. Soc. (London)*, A **239**, 446—463.
27. Falk M., Hartman K. A., Lord R. C. (1963), *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 387—391.
28. International Critical Tables Vol. 1, str. 67.
29. Blout E. R., Fields M. (1949), *J. Biol. Chem.*, **178**, 335.
30. Shimanouchi T., Tsuboi M., Kyogoku Y. *Advances in Chemical Physics Vol. VII.*
31. Howard F. B., Frazier J., Singer M. F., Miles H. T. (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 93—102.
32. Howard F. B., Frazier J., Singer M. F., Miles H. T. (1966), *J. Mol. Biol.*, **16**, 415.
33. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A. (1966), *Science*, **154**, 518—520.
34. Kyogoku Y., Lord R. C., Rich A. (1967), *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 496—504.
35. Howard F. B., Frazier J., Miles H. T. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 451—458.
- 35a. Miles H. T., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **30**, 324—328.
36. Tsuboi M., Shuto K., Takemura S., Nishimura S. (1969), *Bull. Chem. Soc. Japan.*, **42**, 102—107.
37. Kawata M., Miyazaki M., Takemura S. (1967), *J. Biochem (Tokyo)* **62**, 287—292.
38. Nishimura S., Harada F., Naruchima U., Seno T. (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, **142**, 133—145.
39. Thomas V. J. jr (1969), *Biopolymers*, **7**, 325—329.
40. Hartman K. A., Thomas G. J. jr (1970), *Science*, **170**, 740—741.
41. Parker B. R., Khare G. P. (1972), *J. Mol. Spectr.*, **41**, 195—202.
42. Fuller W., Hutchinson M., Spencer M., Wilkins M. H. F. (1967), *J. Mol. Biol.*, **27**, 507.
43. Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe I. (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 741—743.
44. Blout R. E., Lenormant H. (1955), *Biochim. Biophys. Acta*, **17**, 325—331.
45. Fritzsche H. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **119**, 645—646.
46. Kyogoku Y., Tsuboi M., Shimanouchi T., Watanabe T. (1961), *Nature*, **189**, 120—122.
47. Sigler P. B., Davies D. R., Miles H. T. (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 709—716.
48. Silverstein R. M., Bassler G. C. (1970), „Spektroskopowe metody identyfikacji związków chemicznych”, str. 119—157, PWN, Warszawa.
49. Hannel J. W. (1966), „Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego”, PWN, Warszawa.
50. Bovey F. A. (1972), *High resolution NMR of macromolecules*, Academic Press, New York, London.
51. Gueron M. (1971), *FEBS Letters*, **19**, 264—266.
52. Weiner L. M., Backer J. M., Rezvukhin A. J. (1974), *FEBS Letters*, **41**, 40—42.
53. Kotowycz G., Hayamizu K. (1973), *Biochemistry*, **12**, 517—520.
54. Kotowycz G., Suzuki O. (1973), *Biochemistry*, **12**, 3434—3439.
55. Kotowycz G., Suzuki O. (1973), *Biochemistry*, **12**, 5325—5328.
56. Kotowycz G. (1974), *Canad. J. Biochem.*, **52**, 924—929.

57. Lapper R. D., Mantsch H. H., Smith J. C. P. (1973), *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 2878—2880.
58. Dorman D. E., Roberts J. D. (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **65**, 19—26.
59. Komorowski R. A., Allerhand A. (1974), *Biochemistry*, **13**, 369—372.
60. Lighfoot D. R., Wong K. L., Kearns D. R., Reid B. R., Shulman R. G. (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 71—89.
61. Crawford J. E., Chan S. I., Schweitzer M. P. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1—7.
62. Smith J. C. P., Yamane T., Shulman R. G. (1969), *Canad. J. Biochem.*, **47**, 480—484.
63. Kreishman G. P., Miller J. P., Dea P., Hussain Z., Wilson L. A., Schweitzer M. P. (1974), *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, **58**, 27—34.
64. Smith J. C. P., Yamane T., Shulman R. G. (1968), *Science*, **159**, 1360—1361.
65. Kearns D. R., Patel D. J., Shulman R. G. (1971), *Nature*, **229**, 338—339.
66. Kearns D. R., Patel D. J., Shulman R. G., Yamane T. (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 265—270.
67. Wong Y. P., Kearns D. R., Shulman R. G., Yamane T., Chirikjian J. G., Fresco J. R. (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 403—406.
68. Shulman R. G., Hilbers C. W., Kearns D. R., Reid B. R., Wong Y. P. (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 57—69.
69. Shulman R. G., Hilbers C. W., Wong Y. P., Wong K. L., Lightfoot D. R., Reid B. R., Kearns D. R. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2042—2045.
70. Jardetzky O., Wode-Jardetzky N. G. (1971), *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 605—634.
71. Cramer F. (1971), w *Progress in Nucleic Acid Res. and Molec. Biol.*, red.: J. N. Davidson, W. E. Cohn; Academic Press, New York, London, t. XI., 391—421.
72. Kim S. H., Quigley G. J., Suddath F. L., Mc Pherson A., Sneed D., Kim J. J., Weinzier J., Rich A. (1973) *Science*, **179**, 282—288.
73. Hänggi U. J., Zachau H. G. (1971), *Eur. J. Biochem.*, **18**, 496—502.
74. Danchi A., Grunberg-Manago M. (1970), *FEBS Letters*, **9**, 327—330.
75. Wong Y. P., Reid B. R., Kearns D. R. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 2193—2195.
76. Thiebe R., Zachau H. G. (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 260—265.
77. Kearns D. R., Wong K. L., Wong K. P. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3843—3846.
78. Ts'O P. O. P., Barrett J. C., Kan L. S., Miller P. S. (1973), *Ann. Rev. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 290—306.
79. Gueron M., Chachaty C., Son T. D. (1973), *Ann. Rev. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 307—323.
80. Rabczenko A. (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 195—224.
81. Weser U., Strobel G. L., Voelter W. (1974), *FEBS Lettess*, **41**, 243—247.
82. Lohmann W., Penka V. (1973), *Biophysik*, **10**, 61—67.
83. Jones C. R., Kearns D. R. (1974), *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 3651—3653.
84. Raszka M., Mandel M. (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1190—1191.
85. Helene C., Dimiedi J. L. (1972), *FEBS Letters*, **26**, 6—10.
86. Kearns D. R., Wong Y. P. (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 755—774.
87. Barciszewski J., Rafalski A. J., Szyfter K. (1974), Atlas struktur tRNA, wydawn. UAM i IChO PAN, Poznań.
88. Sloane H. J. (1971) *Appl. Spectr.*, **25**, 430—439.
89. Tsuboi M. (1974), w *Basic principles in nucleic acid chemistry*, Academic Press, t. I, 400.
90. Saenger W., (1973), *Angew. Chemie*, **12**, 561—601.



ZBIGNIEW GASYNA \*)

## Struktura i funkcje katalazy

### Structure and Functions of Catalase

Katalaza (E. C. 1.11.1.6) występuje w komórkach roślinnych i zwierzęcych zawierających system cytochromowy. Enzym ten jest najczęściej izolowany z materiału bakteryjnego (*M. lysodeicticus*) i zwierzęcego (—z wątroby, erytrocytów i nerek ssaków). Katalaza jest jednym z białek najwcześniej otrzymanych w postaci krystalicznej (1, 2); próby jej wyodrębnienia i oczyszczania podjęto już na początku XX wieku (3). W krystalicznym białku wykryto hematynę, której towarzyszyła biliwerdyna, stanowiąca prawdopodobnie produkt enzymatycznego rozkładu hematyny (4, 5). Preparat enzymatyczny zawierał 0,09—0,10% żelaza oraz niewielkie ilości miedzi — około 0,05 atomów Cu w przeliczeniu na cząsteczkę enzymu — która stanowi zanieczyszczenie preparatu (6).

Ze względu na znaczenie katalazy w układzie biologicznym, własności katalityczne enzymu badano z dużą skrupulatnością, brak jednak poważniejszych analiz strukturalnych. W niniejszej pracy przedstawiono poglądy na współzależność budowy i funkcji enzymu korzystając z dostępnych danych literaturowych.

## I. Własności strukturalne katalazy

### I-1. Właściwości fizykochemiczne.

Monokryształy katalazy otrzymuje się najczęściej w następujących postaciach:

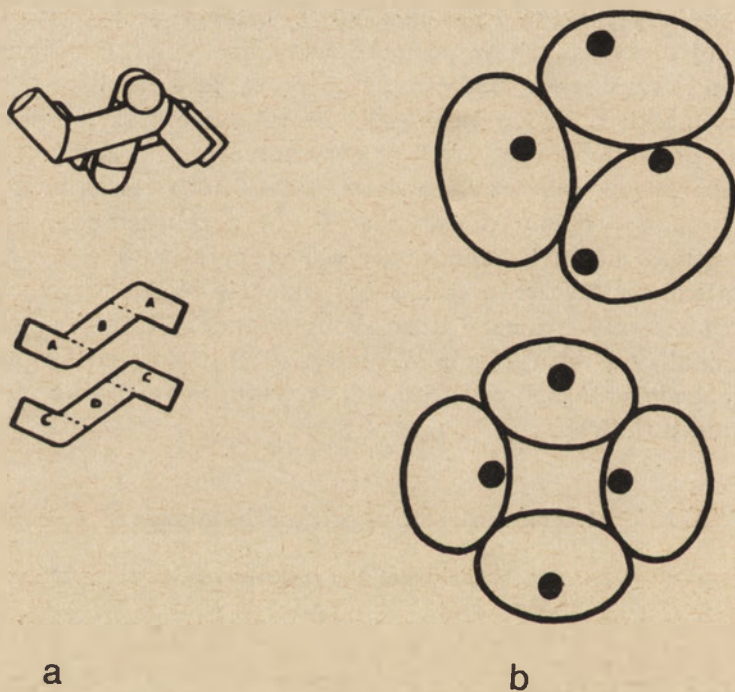
- igiełki, uzyskiwane przez krystalizację z siarczanu amonowego;
- płytki, powstające podczas dializy w punkcie izoelektrycznym;
- pryzmaty heksagonalne różnej długości, z płaskimi lub ostrymi końcami, narastające w czasie dializy stężonych roztworów o pH od około 7 do 7,5 (7).

\*) Mgr inż., Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej, ul. Wróblewskiego 15, 93-590 Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: NAD — dwunukleotyd nikotynamido-adeninowy; AH<sub>2</sub> i A — zewnętrzny donator wodoru i jego utleniona forma, odpowiednio; P — cząsteczka białka (np. reakcja 1).

W kryształach występują elementarne komórki ortorombowe, cztero-cząsteczkowe o wymiarach  $73 \times 141 \times 183 \text{ \AA}$  (8) lub heksagonalne o wymiarach  $180 \times 240 \text{ \AA}$  (9). Otrzymano także kryształy złożone z powierzchni walcowych, będących monomolekularnymi warstwami cząsteczek katalazy (10). Stwierdzono ponadto, że w kryształach katalazy mogą występować inne struktury sieci krystalicznej (11).

Cząsteczka katalazy, w roztworze o niewielkiej sile jonowej, jest równoważna pod względem właściwości hydrodynamicznych elipsoidowi o wymiarach  $46 \times 92 \times 146 \text{ \AA}$  (12). Współczynnik sedimentacji katalazy z wątroby wołowej 11,1—11,8S i współczynnik dyfuzji  $(4,1—4,5) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sek}$  odpowiadają masie cząsteczkowej 225 000—260 000 (5, 13, 14). Cząstkowa objętość właściwa i graniczna liczba lepkości wynoszą odpowiednio 0,73—0,74  $\text{cm}^3/\text{g}$  i 3,9  $\text{cm}^3/\text{g}$  (12, 14). Przyjmuje się, że średni promień czą-



Ryc. 1. a) Model połowy cząsteczki katalazy z wątroby wołowej.

Trzy podjednostki, każda o masie cząsteczkowej 42 000, zbudowane są z czterech różnych łańcuchów polipeptydowych A, B, C i D (diagram poniżej). W każdym z nich znajduje się 120 reszt aminokwasowych, a ich masa cząsteczkowa wynosi 14 000. Grupę hemową zawiera łańcuch C (lub łańcuch B). Na połowę cząsteczki przypadają dwie podjednostki posiadające łańcuchy A i B, które połączone są z podjednostką zawierającą łańcuchy C i D. Cała cząsteczka, zbudowana z sześciu podjednostek ma 8 łańcuchów A, 4 łańcuchy B, 4 łańcuchy C i 2 łańcuchy D, oraz 4 atomy Fe (16).

b) Proponowane modele rozkładu grup prostetycznych (oznaczonych jako zaczernione koła) w katalazie erytrocytarnej (25).

Linia ciągła rozgranicza podjednostki i wskazuje jakim podziałom może ulegać cząsteczka enzymu.



steczki katalazy wynosi 47Å (5) lub 52Å (14). Białko enzymu zawiera około 50% struktur helikalnych (15). Przedstawione dane świadczą o dużej zwartości cząsteczki katalazy i o nieznacznym uwodnieniu jej wnętrza.

### I-2. Struktura podjednostkowa.

Sprzeczność wyników dotychczasowych badań nie pozwala na dokonanie jednoznacznej oceny podjednostkowej struktury katalazy. Rycina 1 przedstawia kilka z proponowanych koncepcji.

Cząsteczki katalazy ulegają dysocjacji na podjednostki pod wpływem szeregu czynników. Wielkość podjednostek powstających w roztworze soli sodowej siarczanu dodecyłu odpowiada 1/4 cząsteczki katalazy. W roztworze siarczanu dodecyłu i kwasu mrówkowego cząsteczka katalazy rozpada się natomiast na trzy jednakowe fragmenty (17). Dysocjacja cząsteczek katalazy zachodzi w roztworze alkalicznym ( $\text{pH} > 9$ ) (18, 19) i kwaśnym ( $\text{pH} < 3,5$ ) (14, 18, 20), a także w roztworze mocznika lub amidu kwasu mrówkowego o stężeniu kilka moli/l (21) oraz w obecności organicznych kwasów aromatycznych (22). Rozpad cząsteczek następuje również podczas liofilizacji preparatów katalazy (14, 23). Stwierdzono przy tym, że po rozpuszczeniu zliofilizowanego preparatu zachodzić może agregacja podjednostek obecnych w roztworze. Wielkość podjednostek, otrzymanych wymienionymi metodami, odpowiada szerokiemu zakresowi ułamków masy cząsteczkowej katalazy i wynosi 2/3, 1/2, 1/3, 1/4, 1/6, a nawet 1/8 cząsteczki. Stąd, też, istnieją duże trudności w interpretacji rozmieszczenia, wzajemnego oddziaływania i współzależności podjednostek.

### I-3. Skład chemiczny i reaktywność grup białka.

Badano skład aminokwasowy katalazy z wątroby i erytrocytów różnych zwierząt (24, 25, 26, 27, 28). Wyniki niektórych prac świadczą, że skład aminokwasowy katalaz różnego pochodzenia jest niemal identyczny. Nowsze dane zestawiono w tabeli 1.

Na podstawie analizy sekwencji aminokwasów ustalono, że wszystkie N-końcowe grupy aminowe cząsteczki katalazy są zacylowane (28, 29). Po utlenieniu aminokwasów siarkowych stwierdzono, że na cząsteczkę katalazy przypada 16—17 reszt kwasu cysteinowego (29). Wykazano także obecność sześciu wolnych grup—SH, które reagują z kwasem p-chlorortęciobenzoesowym (20) oraz tworzą pochodne S-karbamylometylowe z amidem kwasu 2-jodooctowego (30). Przy tak znacznej liczbie wolnych —SH możliwe są reakcje —SH  $\longleftrightarrow$  —S—S— wewnątrz i między podjednostkami, co prawdopodobnie wpływa na niejednorodność elektroforetyczną preparatów katalazy (31). W roztworze o niskim pH dziesięć dodatkowych grup —SH zostaje odsłoniętych w cząsteczce katalazy i udo-

stępnionych reakcji z kwasem p-chlorortęciobenzoesowym (20). Szereg autorów podkreśla, że system —SH/—S—S— bierze udział w stabilizacji struktury natywnej cząsteczki enzymu (30, 31, 32).

Tabela 1

Skład aminokwasowy podjednostki katalazowej (24, 28)  
(cztery identyczne podjednostki stanowią cząsteczkę enzymu)

Reszta aminokwasu	Ilość reszt w podjednostce	
	Katalaza z erytrocytów ludzkich	Katalaza z wątroby wołowej
Lys	29	27
His	20	21
Arg	27	31
Asp	67	68
Thr	24	22
Ser	24	25
Glu	50	46
Pro	36	38
Gly	33	34
Ala	40	35
Cys/2	4	4
Val	34	34
Met	10	10 (9)
Ileu	22	18
Leu	29	35
Tyr	20	20
Phe	30	31
Try	6	6
R a z e m	505	505

Zbadano własności chemiczne reszt innych ważniejszych aminokwasów z cząsteczki katalazy. Stwierdzono niejednorodność reszt tyrozynowych pod względem szybkości dysocjacji ich grup hydroksylowych. Grupy hydroksylowe z sześćdziesięciu siedmiu reszt tyrozynowych, spośród 93 reszt obecnych w cząsteczce enzymu, dysocjują natychmiast po dodaniu mocnej zasady do roztworu enzymu. Grupy hydroksylowe pozostałych reszt tyrozynowych o  $pK = 10,5$  ulegają jonizacji z niejednakową szybkością. Niejednorodność ta wynika z nierównocennego rozmieszczenia przestrzennego reszt tyrozynowych w cząsteczce katalazy, a także z istnienia wiązań wodorowych, w których udział bierze tylko część grup—OH tyrozyny (33). Badając wydajność karboksymetylowania reszt histydynowych w cząsteczce katalazy przy użyciu kwasu bromooctowego zauważono, że tylko część reszt tego aminokwasu (dziesięć do dziewiętnastu z ogólnej liczby 95) reaguje z kwasem bromooctowym w łagodnych warunkach



(pH = 9, w obecności MgO); kolejne dziesięć do dziewiętnastu reszt reaguje dopiero w 2M roztworze mocznika, co świadczy o niejednakowej dostępności imidazolowych grup histydyny w cząsteczce tego białka (34).

## II. Kompleksy grupy prostetycznej katalazy

### II-1. Fizyczne i chemiczne własności kompleksów

Grupą prostetyczną katalazy jest hematyna. Jest to związek FeIII z protoporfiryną IX. Jon żelaza jest położony centralnie w jądrze protoporfiryny i tworzy cztery wiązania koordynacyjne z atomami azotu występującymi w pierścieniu protoporfiryny. Dwa pozostałe wiązania koordynacyjne FeIII tworzy z ligandami zewnętrznymi, zwanymi piątym i szóstym. Jeśli hematyna jest związana z białkiem jon żelaza występuje prawdopodobnie w odległości około  $0,45\text{\AA}$  od płaszczyzny pierścienia protoporfiryny, a jednym z ligandów (piątym) jest grupa chemiczna pochodząca z cząsteczki tego białka (35).

Własności chemiczne grupy prostetycznej katalazy zależą od rodzaju ligandów związanych z FeIII. W kompleksach FeIII, pięć elektronów 3d może być rozmieszczonych w dwóch grupach orbitali molekularnych: niewiążącej ( $t_{2g}$ ) i antywiążącej ( $e_g$ ) w różny sposób, który charakteryzuje między innymi liczbą niesparowanych elektronów obecnych w kompleksie, czyli stan spinowy kompleksu (36). Stan ten decyduje o własnościach magnetycznych i spektralnych oraz o reaktywności grupy prostetycznej katalazy, a zależy od energii pól ligandów tej grupy. Pole ligandów grupy prostetycznej katalazy natywnej charakteryzuje się znaczną asymetrycznością (37), którą można wyznaczyć w oparciu o pomiary elektronowego rezonansu paramagnetycznego (38, 39, 40). Grupa prostetyczna w katalazie natywnej jest wysokospinowym kompleksem FeIII (41, 42, 43) (Tabela 2). Stan spinowy tej grupy nie zależy od pH, co jest specyficzną cechą enzymu (37). Niskospinowe formy katalazy obserwowano w temperaturach ciekłego helu ( $20^\circ\text{K}$ ) (44). Jest to zgodne z wcześniej odkrytym zjawiskiem termicznej równowagi stanów wysoko- i niskospinowego w ferrohemoпротеidach (45, 46). Jeden z proponowanych modeli zjawisko to tłumaczy zmianami położenia pierścienia protoporfiryny względem jonu Fe, zachodzącymi w wyniku temperaturowej zależności oddziaływania protoporfiryny z globiną (47). Otoczenie hematinowej grupy prostetycznej zostało zbadane na poziomie atomowym jedynie w analogach katalazy-mioglobinie, hemoglobinie i cytochromie c (48, 49, 50).

Zidentyfikowano ligandy i reszty aminokwasów tworzących szczelinę hydrofobową, w której znajduje się grupa prostetyczna. Niezwykle skąpe są informacje o strukturze tego centrum w enzymach takich jak: katalaza, peroksydaza i inne oksydoreduktazy. Nie wiadomo dotychczas, jaka grupa, pochodząca ze składnika białkowego katalazy, stanowi piąty ligand

FeIII jej grupy prostetycznej. Rolę tę przypisywano początkowo anionowi karboksylowemu, ale nie wykluczano i innych grup, wśród których znajduje się łańcuch boczny histydyny (37). Nowsze prace zawierają dane świadczące o udziale grupy imidazolowej histydyny, która pełni taką rolę w innych hemoproteidach (51). Ligandem szóstym FeIII hematyny w wolnej katalazie może być grupa —OH lub cząsteczka wody. Istnieje możliwa do przyjęcia propozycja układu, w którym grupa hydroksylowa oddziałuje z resztą histydyny łańcucha polipeptydowego z najbliższego sąsiedztwa, przez wiązanie wodorowe (52). Wartościowość jonu żelaza hematyny w katalazie natywnej nie zmienia się w obecności związków redukujących, jak  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  lub  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Fakt ten tłumaczy się niedostępnością centrum hematyny dla cząsteczek reduktanta, wynikającą ze specy-

Tabela 2.

Charakterystyka spektralna i własności magnetyczne kompleksów katalazy (41, 42, 43, 57)

Rodzaj szóstego liganda	Szczyty absorpcji $\lambda$ (nm)				Moment magnet. M.B.	Liczba niespar. $e^-$
<b>Kompleksy Fe III</b>						
OH <sup>-</sup>	622,	540,	500,	406*	5,7	5
N <sub>3</sub> <sup>-</sup>	619,	535,	500,	411	5,4	5
F <sup>-</sup>	598,	535,	500,	408	5,7	5
CN <sup>-</sup>	585,	555,		425	2,4	1
SH <sup>-</sup>	640,	587,	548			
<b>Kompleksy Fe II</b>						
Katalaza zredukowana						
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ po denaturacji	630,	595,	560,	427		
CO		580,	645			0
NO		576,	540			1

\* Molowy współczynnik absorpcji dla  $\lambda = 405\text{--}406\text{nm}$  przyjmuje wartość od  $2,9 \times 10^5$  dla katalazy z wątroby ludzkiej [58] do  $4,1 \times 10^5$  dla katalazy z *M. lysodeicticus* (59).

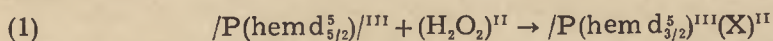
ficznej struktury tego centrum w przypadku katalazy (53). Jony FeIII ulegają redukcji w enzymie zmodyfikowanym, np. w katalazie zdenaturowanej działaniem różnych czynników (23, 25). Redukcja następuje także na drodze specyficznego ciągu reakcji, w których partnerami są pewne kompleksy enzymu i reduktanty, zdolne do wnikięcia w sąsiedztwo szóstego liganda (54, 55). Kompleksom FeIII odpowiada charakterystyczne widmo absorpcyjne. Wolna katalaza (kompleks hydroksylowy) absorbuje w pasmach 405nm, 500—505nm, 535—540nm i 624—626nm. Absorpcja ze szczytem w 405nm (pasmo Soreta) pochodzi z przejść  $\pi \rightarrow \pi^*$  w aromatycznym pierścieniu protoporfiryny. Absorpcja odpowiadająca szczytom 500—505nm i 624—626nm przypisywana jest mechanizmowi przenoszenia ładunku (ang. *charge transfer* — C.T.2 i C.T.1) z metalu do liganda; pasmo



535—540nm ( $\beta$ ) ma pochodzenie podobne (37, 56). Charakterystykę absorpcji i własności magnetyczne kompleksów katalazy przedstawiono w tabeli 2.

## II-2. Kompleksy grupy prostetycznej z substratami.

Substratami katalazy są nadtlentki. Związki te wiążą się chemicznie z hematiną katalazy. Widmo absorpcyjne kompleksu przejściowego enzymu z nadtlentkiem wodoru, oznaczanego zwykle jako Kompleks I, opisał po raz pierwszy Chancé (61) ( $\lambda_{\text{maks.}} = 670\text{nm}, 570\text{nm}, 535\text{nm}, 405\text{nm}$ ). W cząsteczce katalazy powstaje 1,2—1,6 Kompleksów I (61, 62). W obecności cyjanku, stężenie Kompleksu I zmniejsza się zgodnie z mechanizmem kompetycyjnego przyłączania cząsteczek substratu do hematyny (63). Kompleksy przejściowe powstają także w reakcji hematyny katalazy z wodoronadtlenkami alkilowymi, przy czym stacjonarne stężenie produktu tej reakcji odpowiada obsadzeniu 90—95% cząsteczek hematyny, co zależy od szybkości zachodzącego jednocześnie rozkładu kompleksu przejściowego (64). Kompleksy przejściowe wodoronadtlenków alkilowych i Kompleks I są niemal identyczne pod względem spektroskopowym i magnetycznym, a różnią się kinetycznym charakterem reakcji, w których biorą one udział (65). W stanie nasycenia, kompleksy wodoronadtlenków alkilowych można zastąpić związkami  $\text{H}_2\text{O}_2$ , w ilości 1,2—1,6 równoważników na mol enzymu. Jest to wynik większego powinowactwa grupy prostetycznej do nadtlentku wodoru i zależy od szybkości powstawania i dysocjacji kompleksów, co obrazuje tabela 3 (62, 63). Podejmowano próby ustalenia struktury Kompleksu I, którego widmo absorpcji światła ma cechy unikalne (66). W kompleksie tym, podobnie jak w kompleksie dwualkilodwutiokarbaminianu z żelazem, występują trzy niesparowane elektrony (41, 67). Mimo tego, Kompleks I nie daje sygnału elektronowego rezonansu paramagnetycznego (66). Zgodnie z wynikami badań, reakcję powstawania nadtlentkowego Kompleksu I odzwierciedla następujący zapis (68):

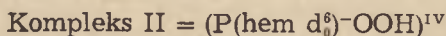


gdzie cyfry rzymskie oznaczają wartościowość (w równoważnikach tlenowych), a  $d_j^i$  elektrony jonu Fe o liczbie  $i$  oraz o całkowitym spinie  $j$ .

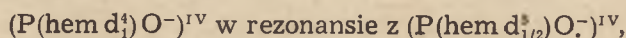
Autorzy tego zapisu nie potrafili określić charakteru grupy X, która w świetle przedstawionych uzasadnień jest nietypowym ligandem hematyny. Warto podkreślić, że w reakcji (1) wartościowość Fe nie ulega zmianie. Przyjęcie prawdziwości schematu reakcji (1) wymaga uznania, że energia pola piątego liganda zdecydowanie osłabnie. Tym samym, wiązanie między FeIII i ligandem piątym traci charakter kowalencyjny i miejsca przyłączające ligandy piąty i szósty są nieobsadzone.

Kompleks nadtlentkowy wyróżniający się widmem absorpcyjnym z pasmami przy 420nm, 535nm i 568—575 nm jest przedstawicielem hematyno-

wych Kompleksów II. Powstaje w reakcji redukcji ( $+1e^-$ ) Kompleksu I i ma wartościowość IV, a w układzie tym znajdują się dwa niesparowane elektrony (41). Widmo elektronowego rezonansu paramagnetycznego, świadczące o obecności niesparowanych elektronów, wykryto tylko w jednym przypadku, gdy substratem użytym do syntezy Kompleksu II katalazy był wodoronadtlenek metylu ( $\text{CH}_3\text{OOH}$ ) (44). Propozycja struktury tego kompleksu:



wyda się nie do przyjęcia z uwagi na niezerowy spin efektywny [68]. Rozważana jest zatem możliwość występowania ugrupowania ferrylowego —  $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$  (37):



w którym elektrony są silniej związane z jodem Fe.

Własności reakcyjne Kompleksu II przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3.

Własności reakcyjne Kompleksów I i II katalazy (61, 63)

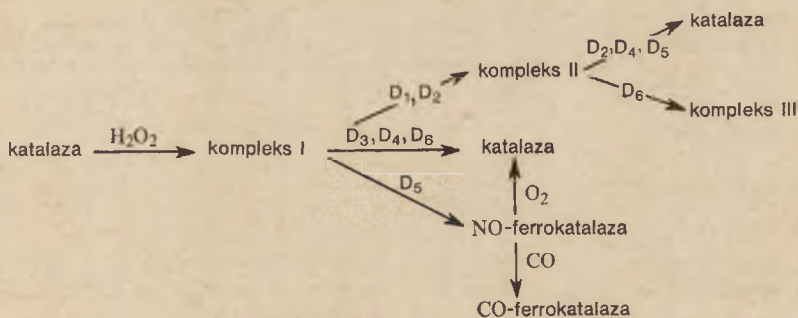
Stała szybkości lub stała dysocjacji	Substrat		
	$\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{CH}_3\text{OOH}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOH}$
Stała szybkości powstawania kompleksu przejściowego I $\text{M}^{-1} \text{sek}^{-1}$	$3 \times 10^7$ $6 \times 10^{6*}$	$8 \times 10^6$	$2 \times 10^4$
Stała dysocjacji kompleksu przejściowego M	$1 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-6}$
Stała szybkości samoistnego rozpadu kompleksu przejściowego $\text{sek}^{-1}$	$2 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$	$4 \times 10^{-2}$
Stała szybkości powstawania Kompleksu II z I $\text{I M}^{-1} \text{sek}^{-1}$		$1,25 \times 10^3$	$0,6 \times 10^3$
Stała dysocjacji Kompleksu II M		$1,2 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-6}$
Stała szybkości samoistnego rozkładu Kompleksu II $\text{sek}^{-1}$		$5 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^{-4}$

\* wg (55)

Początkowo przypuszczano, że powstawanie Kompleksu II związane jest z dysocjacją cząsteczek enzymu (69, 70). Przeciwno tej koncepcji świadczą wyniki późniejszych badań, które nie potwierdziły zmian wielkości cząsteczki katalazy w czasie powstawania tego kompleksu (71).

Znany jest również nadtlenkowy Kompleks III, charakteryzujący się pasmami absorpcji ze szczytami w 422nm, 545nm i 585nm (60, 72). Jest on analogiem związków  $\text{H}_2\text{O}_2$  lub  $\text{ROOH}$  z methemoglobina, z tą różnicą, że w reakcji syntezy Kompleksu III biorą udział dwie cząsteczki nadtlenku (72, 73). Szereg charakterystycznych reakcji katalazy z  $\text{H}_2\text{O}_2$  w obecności donatorów elektronów i wodoru przedstawiono na schemacie 1.



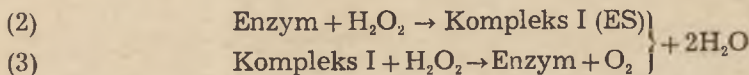


**Schemat 1.** Reakcje katalazy z  $H_2O_2$  w obecności donatorów elektronów i wodoru.  $D_1$  — askorbinian lub żelazocyjanek,  $D_2$  — fenole,  $D_3$  — alkohole lub mrówczan,  $D_4$  —  $NaNO_2$ ,  $D_5$  —  $HN_3$ ,  $NH_4OH$ ,  $D_6$  —  $H_2O_2$ .

### III. Własności katalityczne

#### III-1. Mechanizm katalizy rozkładu $H_2O_2$ .

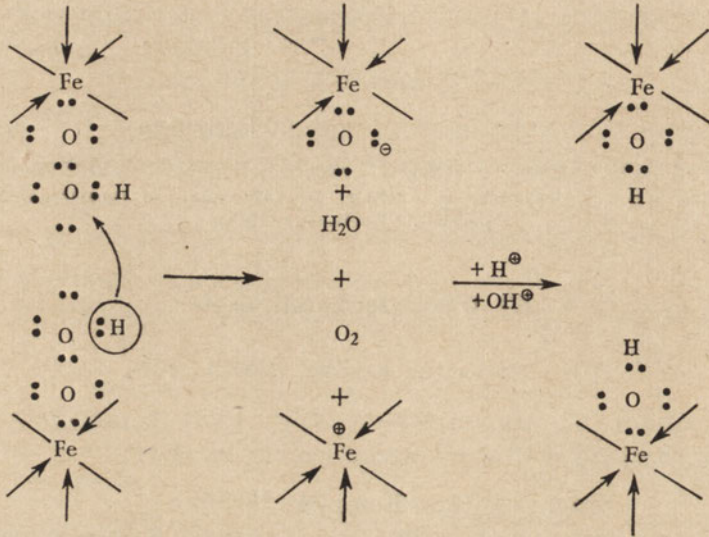
Sumner (3) był jednym z pierwszych, który zaproponował trafnie mechanizm rozkładu nadtlenu wodoru przez katalazę:



Analogiczny schemat obowiązuje prawdopodobnie w przypadku reakcji  $H_2O_2$  z hematiną [74]. Jeśli rozpad kompleksu przejściowego ma prowadzić do wydzielania tlenu cząsteczkowego i  $H_2O$  to nadtlenek musi spełniać rolę akceptora i donatora wodoru. Sprawdzenie tego założenia wymagało zidentyfikowania miejsc wiązania cząsteczek substratu, stwierdzenia, które cząsteczki nadtlenu dostarczają atomów tlenu do cząsteczki tlenu, oraz ustalenia sposobu wiązania cząsteczek substratu i ich zorientowania, które mogłyby warunkować reakcję ich rozkładu. Stwierdzono, że reakcje (2) i (3) nie powodują zmiany wartościowości jonu żelaza hematynowego [62], ani nie zachodzą w myśl mechanizmu wolnorodnikowego [63, 64]. Zastosowanie nadtlenu wodoru wzbogaconego w  $^{18}O$  pozwoliło ustalić, że cząsteczka tlenu uwalnia się z jednej cząsteczki substratu [75]. Szereg autorów reprezentuje pogląd, że w reakcji rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę uczestniczą wyłącznie cząsteczki hematyny tego enzymu (75, 76, 77). Wydaje się przy tym, że reakcja ta przebiega z udziałem co najmniej dwóch molekularnych kompleksów przejściowych substratu i hematyny (77, 78). Mechanizm przenoszenia anionu wodorkowego, który przedstawiono na schemacie 2, tłumaczy istotność właściwej orientacji cząsteczek substratu i konformacji centrum aktywnego (77, 79).

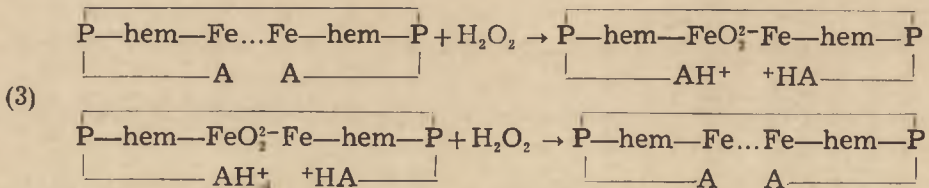
Przeciwstawna koncepcja uwzględnia w reakcji grupę protonobiorczą umiejscowioną w apoproteidzie (80, 81). Akceptor protonów działa na cząsteczkę substratu, związaną z hematiną i powoduje wydzielanie tlenu.

Następna cząsteczka utlenia akceptor i odtwarza stan początkowy. W świetle dowodów doświadczalnych, również w tym przypadku, nie można pominąć udziału pary grup hematynowych w reakcji katalitycznej (81). Hipotetyczny mechanizm procesu katalizy ilustruje schemat (3). Jest on



Schemat 2. Mechanizm przenoszenia amonu wodorkowego.

charakterystyczny dla reakcji nadtlenu wodoru z szeregiem prostych kompleksów metaloorganicznych, w tym także ze związkami żelaza (81, 82).



Zaznacza się przy tym problem identyfikacji grupy protonobiorczej. Zaproponowano, aby uwzględnić tu udział systemu —SH/—S—S— (83). Okazuje się jednak, że unieczynnienie grup —SH katalazy nie wpływa na jej aktywność (30, 32, 84). Wydaje się, że wymienione grupy nie wchodzą bezpośrednio w skład centrum aktywnego. W sąsiedztwie hematyny występuje zapewne inna niezidentyfikowana grupa, która przypuszczalnie jest zdolna wiązać nadtlenuki (84). Istnieje także wewnętrzny donator wodoru biorący udział w reakcjach rozkładu kompleksów nadtlenukowych (Tabela 3). Donator ten jest również bliżej nieokreślą grupą chemiczną apoproteidu, a jego reaktywność jest znikoma (63, 85).

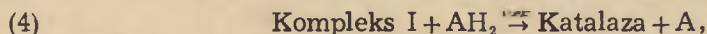
Przedstawione hipotezy mechanizmu reakcji katalizowanej przez katalazę zakładają dwucentrową strukturę miejsc aktywnych enzymu zbu-



dowanych z dwóch grup hematynowych. Dalsze badania strukturalne wykażą, czy założenie to jest słuszne. Dane uzyskane metodami pośrednimi wskazują wyraźnie na obecność par grup prostetycznych w czteroematynowej cząsteczce katalazy (86, 87). Wyniki analiz rentgenograficznych i mikroskopowych są natomiast niejednoznaczne (9). Konsekwencją zakładanych struktur centrum aktywnego jest fakt, że dwie cząsteczki hematyny w cząsteczce enzymu zajmują bliskie sobie, ustalone położenie. Dowodem na współdziałanie cząsteczek hematyny katalazy w reakcji z substratem może być kooperatywny charakter tego procesu, zaobserwowany w szeregu przypadków (88, 89). Charakter oddziaływania cząsteczek hematyny katalazy mógłby posiadać cechy wspólne z dobrze znanym zjawiskiem interakcji hemowej w hemoglobinie (90, 91), a układ grup prostetycznych w cząsteczce katalazy byłby podobny do jednego z układów cząsteczek hemu, proponowanych w przypadku hemoglobiny (92). Uściślenie przedstawionych rozważań dotyczących struktury miejsca aktywnego katalazy wymaga ustalenia orientacji płaszczyzn pierścieni protoporfirynowych i względnego położenia atomów żelaza.

### III-2. Reakcje katalizowane przez enzym i ich kinetyka

Wszelkie reakcje katalizowane przez katalazę przechodzą stadium kompleksu aktywnego, identyfikowanego jako Kompleks I. Jego rozkład może następować na drodze przemian, zależnych od ilości reagentów i ich rodzaju. Reakcje (2) i (3) opisują specyficzny, „katalazowy” rozkład nadtlenku wodoru. Szybkość katalizy określają dane kinetyczne przedstawione w tabelach 3 i 4. Gwałtowność procesu powoduje, że stężenie Kompleksu I jest dalekie od stanu nasycenia (62). Ogólna szybkość reakcji, w warunkach niezmiennego stężenia kompleksu przejściowego spełnia zasady kinetyki II rzędu (62, 77). „Wewnętrzny” donator wodoru wywołuje spontaniczny rozkład Kompleksu I. Reakcję tę obserwuje się w nieobecności donatora zewnętrznego, przy odpowiednio małych stężeniach  $H_2O_2$  w mieszaninie (63, 65). Kompleks wodoronadtlenku alkilowego z hematyną nie przejawia aktywności donatorowej, co uniemożliwia zajście reakcji z wydzieleniem tlenu (4). Katalazowe związki przejściowe  $H_2O_2$  i wodoronadtlenków reagują energicznie z donatorami zewnętrznymi  $AH_2$ . Stałe szybkości tych typowych reakcji peroksydacyjnych są rzędu  $10^4 \text{ l M}^{-1} \text{ sek}^{-1}$ . Zapisuje się je równaniem:



które spełnione jest również w przypadku donatora wewnętrznego.

Szybkość reakcji peroksydacyjnych charakteryzują dane zebrane w tabeli 4.

Zauważono, że szybkość procesu peroksydacji maleje ze zwiększeniem długości łańcucha węglowodorowego donatora organicznego (62). Analo-

gicznie, zmniejszenie szybkości powstawania kompleksów przejściowych odpowiada szeregowi homologicznemu nadtlenu, poczynając od  $H_2O_2$  (Tabela 3). Zależność szybkości reakcji od wielkości cząsteczek substratów świadczy o istnieniu zawady przestrzennej w centrum reakcyjnym. Konformacja tego centrum nie jest jednakowa w cząsteczkach katalazy o różnym pochodzeniu. Wyraźne różnice szybkości reakcji elementarnych występują przy porównaniu enzymu o pochodzeniu bakteryjnym ze zwierzęcym (78). Właściwości peroksydacyjne wykazuje nadtlenny Kompleks II. Z  $H_2O_2$  reaguje on bez wydzielienia tlenu (schemat 1, tabela 4).

Tabela 4.

Własności katalityczne Kompleksów I i II katalazy (61, 63)

Kompleks	Donator	Substrat użyty do syntezy Kompleksu		
		$H_2O_2$	$CH_3OH$	$CH_3CH_2OH$
I	$H_2O_2$ (katalazowa)	stałe szybkości reakcji $lM^{-1} \text{ sek}^{-1}$		
	Metanol	$1,8 \times 10^{7*}$	$1 \times 10^3$	
	Etanol	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
	Propanol	$2 \times 10^1$	$(1-2) \times 10^1$	
	Butanol	2		
	Alkohol izoamyłowy	$2 \times 10^{-1}$		
II	Etanol		$4 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-2}$

\* Według (55).

Wskaźnikiem aktywności katalazy jest ogólna szybkość rozkładu  $H_2O_2$ . Szybkość ta wynika z kinetycznego rozwiązania równań (2) i (3) dla stanu stacjonarnego i wynosi:

$$(5) \quad \left[ -\frac{dx}{dt} \right]_s = 2[E]_0 x_s \left( \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_3} \right)^{-1}$$

a stacjonarne stężenie Kompleksu I:

$$(6) \quad [E]_s = [E]_0 (1 + k_3/k_2)^{-1}$$

gdzie:  $x = [H_2O_2]$ ,  $[E]_0$  — stężenie enzymu,  $k_2$  i  $k_3$  — odpowiednie stałe szybkości reakcji (2) i (3).

Ogólna stała szybkości rozkładu nadtlenu jest proporcjonalna do wyrażenia

$\frac{1}{1/k_2 + 1/k_3}$ . Rzeczywistą aktywność katalazy określa się poprzez wartość stałej szybkości rozkładu  $H_2O_2$  wyznaczoną w okresie początkowym, kiedy proces ten jest reakcją pierwszego rzędu względem nadtlenu. Aktywność właściwa bywa wyrażana przez stałą szybkości obliczoną dla stężenia enzymu 1 mol/l. Popularną formą oznaczania aktywności właściwej jest wielkość Kat.f. (z niem. *Katalase Fähigkeit*), opisywana równaniem (93):

$$(7) \quad \text{Kat.f.} = (60/2,3) \times (k_1/\text{gram katalazy w 50 ml 10/12 mieszaniny})$$



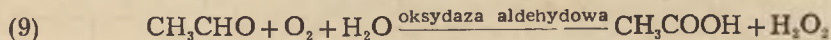
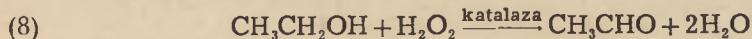
w którym  $k_1$  jest doświadczalną stałą I rzędowej reakcji w okresie początkowym ( $s^{-1}$ ). Aktywność w jednostkach międzynarodowych definiuje się jako ilość mikromoli substratu, który uległ rozkładowi w obecności 1mg białka, w ciągu 60sek, w  $25^\circ C$ , przy stężeniu  $H_2O_2$  —  $1,25 \times 10^{-2}$  M/l. Kat.f. = 0,83 jednostki międzynarodowej. Różnice w aktywnościach właściwych przypisuje się efektom związanym z niejednorodnością enzymu pod względem zawartości hematyiny (5, 94). Wartość Kat.f. katalazy z wątroby wołu wynosi około 30 000 (79). Znacznie większą aktywnością właściwą charakteryzują się katalazy z erytrocytów i komórek bakterii (78, 95).

Właściwości katalityczne enzymu zależą przypuszczalnie również od konformacji centrum reakcji (78). Wydaje się także, że istota różnic aktywności właściwej katalazy jest związana z metodą izolowania enzymu z surowca. Wykazano bowiem, że krystaliczny preparat katalazy można rozfrakcjonować na białko nieaktywne oraz aktywne, które w różnych proporcjach zawiera składniki o niejednakowej aktywności właściwej (96).

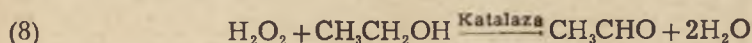
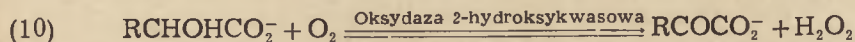
#### IV. Fizjologiczna rola katalazy

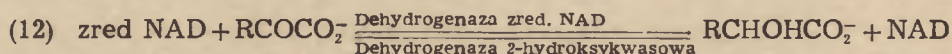
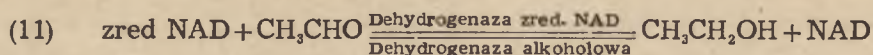
Katalaza występuje w organellach cytoplazmy komórek roślinnych i zwierzęcych oraz w erytrocytach obok hemoglobiny (79, 97, 98, 99). W peroksydomach wątroby i nerek wraz z katalazą obecne są oksydazy, takie jak oksydaza ksantynowa, oksydaza D-aminokwasowa, oksydaza moczanowa i oksydaza 2-hydrokyskwasowa (97).

Główną rolą fizjologiczną katalazy jest rozkład  $H_2O_2$  na drodze peroksydatywnej lub „katalazowej”, opisanych uprzednio, na co wskazuje lokalizacja enzymu, porównywalna z rozmieszczeniem cytochromów. Obecność oksydaz, katalizujących reakcje tlenu z wydzieleniem  $H_2O_2$ , zwraca uwagę na możliwość sprzężenia katalazy z metabolizmem substratów tych enzymów. Jako katalazowy wycinek cykli metabolicznych proponowano proces zużywania nadtlenu z regeneracją tlenu cząsteczkowego lub bardziej bezpośrednią reakcją peroksydacji, sprzężoną z przemianami katalizowanymi przez inne oksydoreduktazy. Najlepszym tego przykładem jest utlenianie alkoholu w wątrobie (100):

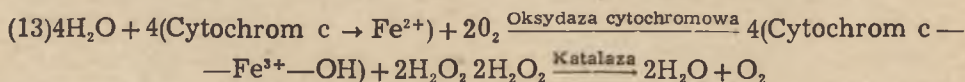


Utlenianie peroksydacyjne z udziałem katalazy jest sprzężone, w organizmach niektórych pierwotniaków, z enzymatycznymi reakcjami utleniania-redukcji NAD (97, 101):





W cyklu tym może krążyć do 35<sup>0</sup>/<sub>0</sub> komórkowego NAD (97). Inny mechanizm, uwzględniający udział katalazy, przedstawiają równania (79):



To hipotetyczne sprzężenie ma logiczny związek z obserwowaną stechiometrią utleniania (4 cząsteczki cytochromu c : 1 cząsteczka O<sub>2</sub>) i jednocześnie uzasadnia obecność katalazy w komórkach systemu przenoszenia elektronów. W erytrocytach katalaza działa prawdopodobnie niezależnie od innych układów enzymatycznych (peroksydazy glutationowej i reduktaz methemoglobiny), które kontrolują poziom methemoglobiny przez jej bezpośrednią redukcję lub eliminację nadtlenu jako czynnika utleniającego. Stężenie nadtlenu wodoru w erytrocytach jest wyjątkowo małe. Wydaje się, że katalaza nie pełni tu roli metabolicznej, jest raczej czynnikiem ochronnym, koniecznym do niszczenia dużych ilości nadtlenu, z którymi erytrocyty stykają się w tkankach (99). Cechą aktywności biologicznej katalazy jest dwoisty charakter jej działania. Obie drogi wykorzystania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> — peroksydatywna i „katalazowa” — mają przypuszczalnie wpływ na metabolizm szeregu związków w komórce. Powszechnie sądzono, że rozkład peroksydacyjny przeważa przy małym stężeniu substratu (79). Ostatnio Chance i wsp. (102, 103) dowiedli, że zasoby aktywności „katalazowej” i peroksydatywnej podlegają uwarunkowaniu kinetycznemu, zależą od stacjonarnego stężenia Kompleksu I i szeregu parametrów kinetycznych specyficznych reakcji elementarnych.

Wydaje się, że katalaza nadal stanowi interesujący obiekt dla badań strukturalnych i funkcjonalnych. Problemy budowy cząsteczki enzymu oraz specyfiki procesu enzymatycznego nie zostały bowiem wyjaśnione wyczerpująco. Coraz więcej uwagi poświęca się także ustaleniu znaczenia katalazy w metabolizmie komórki.

Artykuł otrzymano 30.11.1973, po rewizji autorskiej przyjęto 20.12.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Sumner J. B., Dounce A. L., (1937), *Science*, **85**, 366—367.
2. Sumner J. B., Dounce A. L., (1937), *J. Biol. Chem.*, **121**, 417—424.
3. Sumner J. B., (1941), *Advan. Enzymol.* **1**, 163—176.
4. Stern K. G., (1936), *J. Biol. Chem.*, **112**, 661—669.
5. Sumner J. B., Dounce A. L., Frampton V. L., (1940), *J. Biol. Chem.* **136**, 343—356.



6. Sumner J. B., Dounce A. L., (1939), *J. Biol. Chem.*, **127**, 439—447.
7. Sumner J. B., Dounce A. L., (1955), w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 2, str. 775—784.
8. Labaw L. W., (1967), *J. Ultrastruct. Res.*, **17**, 327—341.
9. Longley W., (1967), *J. Mol. Biol.*, **30**, 323—327.
10. Kiselev N. A., Shpitzberg V. L., Vainshtein B. K., (1967), *J. Mol. Biol.*, **25**, 433—441.
11. Gurskaya G. W., Karpuhina C. Ya., Lobanov G. M., (1971), *Biofizika*, **16**, 553—555.
12. Malmon A. G., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 233—240.
13. Samejima T., (1959), *J. Biochem. (Tokyo)*, **46**, 1101.
14. Tanford C., Lovrien R., (1962), *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1892—1896.
15. Yang J., Samejima T., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3262—3267.
16. Valentine R. C., (1964), *Nature*, **204**, 1262—1264.
17. Sund H., Weber K., Molebert E., (1967), *Eur. J. Biochem.*, **1**, 400—410.
18. Sumner J. B., Gralen N., (1938), *J. Biol. Chem.*, **125**, 33—36.
19. Nagahisa M., (1962), *J. Biochem. (Tokyo)*, **51**, 216—221.
20. Samejima T., Yang J., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3256—3267.
21. Samejima T., Shibata K., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 407—412.
22. Itoh M., Nakamura Y., Shibata K., (1962), *Can. J. Biochem. Physiol.* **40**, 1327—1334.
23. Deisseroth A., Dounce A. L., (1967), *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 671—692.
24. Bonaventura J., Schroeder W. A., Fang S., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 606—617.
25. Deisseroth A., Dounce A. L., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 30—48.
26. Radhakrishnan T. M., Sarma P. S., (1965), *Biochem. J.*, **97**, 827—832.
27. Schnuchel G., (1956), *Z. Physiol. Chem.*, **303**, 91—93.
28. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Robberson B., Apell G., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* **131**, 653—655.
29. Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Olson B. M., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 47—65.
30. Abe K., Hiraga M., Anan F., (1967), *Bull. Tokyo Med. Dental Univ.*, **14**, 309—325.
31. Heidrich H. G., (1968), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **349**, 873—880.
32. Morikofer-Zweg S., Cantz M., Kaufmann H., von Wartburg J. P., Aebi H., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 49—53.
33. Inada Y., (1961), *J. Biochem. (Tokyo)*, **49**, 217—225.
34. Nakatani M., (1960), *J. Biochem. (Tokyo)*, **48**, 476—482.
35. Hoard J. L., (1966) w *Hemes and Hemoproteins*, red. Chance B., Ekstrabrook R., Yonetani T., str. 9—24, Academic Press, New York, London.
36. Ehrenberg A., (1962), *Svensk. Kem. Tidskr.*, **74**, 103—120.
37. Brill A. S., (1966) w *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M., Stotz E. H., t. 14, str. 447—477, Elsevier, New York.
38. Bennett J. E., Ingram D. J. E., George P., Griffith J. S., (1955), *Nature*, **176**, 394.
39. Gibson J. F., Ingram D. J. E., Schonland D., (1958), *Disc. Faraday Soc.*, **26**, 72—80.
40. Torri K., Ogura Y., (1968), *J. Biochem. (Tokyo)*, **64**, 171—179.
41. Ehrenberg A., (1966) w *Hemes and Hemoproteins*, red. Chance B., Ekstrabrook R., Yonetani T., str. 331—337, Academic Press, New York, London.

42. Keilin D., Hartree E. F., (1937), *Proc. R. Soc. (London)*, Ser. B, **121**, 173—191.
43. Nicholls P., Schonbaum G. R., (1963), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., t. 8, str. 147—225.
44. Rein H., Ristau O., Hackenberger F., Jung F., (1971), *Acta Biol Med. Ger.*, **26**, 1099—1109.
45. Beetlestone J., George P., (1964), *Biochemistry*, **3**, 707—714.
46. George P., Beetlestone J., Griffith J. S., (1964), *Rev. Modern Phys* t. 2, **36**, 441—458.
47. Otsuka J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **214**, 233—235.
48. Dickerson R. E., Takano T., Eisenberg D., Kallai O. B., Samson L., Cooper A., Margoliash E., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1511—1535.
49. Kendrew J. C., (1963), *Science*, **139**, 1259—1266.
50. Perutz M. F., (1970), *Nature*, **228**, 726—734.
51. Sandberg H. E., Balegh M. S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **295**, 34—38.
52. Maričić S., Ravilly A., Mildvan A. S., (1966), w *Hemes and Hemo-proteins*, red. Chance B., Estrabrook R., Yonetani T., str. 157—172, Academic Press, New York, London.
53. Chance B., (1950), *Biochem. J.*, **46**, 387—402
54. Nicholls P., (1961), *Biochem. J.*, **81**, 374—383.
55. Nicholls P., (1964), *Biochem. J.*, **90**, 331—343.
56. Brill A. S., Williams R. J. P., (1961), *Biochem. J.*, **78**, 246—252.
57. Dounce A. L., Schwalenberg R. R., (1950), *Science*, **111**, 654—655.
58. Bonnichsen R., (1947), *Acta Chem. Scand.*, **1**, 114—117.
59. Hebert D., Pinsent J., (1948), *Biochem. J.*, **43**, 193—203.
60. Chance B., (1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 404—414.
61. Chance B., (1947), *Acta Chem. Scand.*, **1**, 236—267.
62. Chance B., (1948), *Nature*, **161**, 914—917.
63. Chance B., (1949), *J. Biol. Chem.*, **179**, 1341—1369.
64. Brill A. S., Williams R. J. P., (1961), *Biochem. J.*, **78**, 253—262.
65. Chance B., (1949), *J. Biol. Chem.*, **179**, 1311—1330.
66. Blumberg W. E., Peisach J., Wittemberg B. A., Wittemberg J. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1854—1862.
67. Wickman H. H., Merritt F. R., (1967), *Chem. Phys. Letters*, **1**, 117.
68. Peisach J., Blumberg W. E., Wittemberg B. A., Wittemberg J. B., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 1871—1880.
69. Jones P., Suggett A., (1968), *Biochem. J.*, **110**, 621—629.
70. Jones P., Suggett A., Pain R. H., (1968), *Nature*, **217**, 1050.
71. Barlow G., Margoliash E., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **188**, 159—161.
72. Keilin D., Hartree E. F., (1951), *Biochem. J.*, **49**, 88—104.
73. Keilin D., Nicholls P., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 302—307.
74. Haurowitz F. M., (1937), *Enzymologia*, **2**, 9—16.
75. Jarnagin R., Wang J. H., (1958), *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 786—787.
76. Theorell H., (1948), *Experientia*, **4**, 100—109.
77. Ogura Y., (1955), *Arch. Biochem. Biophys.*, **57**, 288—300.
78. Chance B., Herbert D., (1950), *Biochem. J.*, **46**, 402—417.
79. Deisseroth A., Dounce A. L., (1970), *Physiol. Rev.*, **50**, 319—375.
80. Chance B., Greenstein D. S., Roughton F. J. W., (1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, **37**, 301—339.
81. Azizov Yu. M., Lichtenstein G. I., Purmal A. P., (1972), *Biochimija*, **37**, 620—628.
82. Brown S. B., Dean T. C., Jones P., (1970), *Biochem. J.*, **117**, 741—744.



83. Hermal H., Havemann R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 272—282.
84. Schonbaum G. R., Jajczay F., (1966), w Hemes and Hemoproteins, red. Chance B., Estrabrook R., Yonetani T., str. 327—330, Academic Press, New York, London.
85. Nicholls P., (1966), w Hemes and Hemoproteins, red. Chance B., Estrabrook R., Yonetani T., str. 307—318, Academic Press, New York, London.
86. Maeda Y., Trautwein A., Gonser U., Yoshida K., Kikuchi-Torii K., Homma T., Ogura Y., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 230—236.
87. Weber G., Teale F. W. J., (1959), *Disc. Faraday Soc.*, **27**, 134—141.
88. Margoliash E., Novegrodsky A., (1958), *Biochem. J.*, **68**, 468—475.
89. Margoliash E., Novegrodsky A., (1960), *Biochem. J.*, **74**, 339—350.
90. Wyman J., (1948) w Advances in Protein Chemistry, red. Anson M. L., Edsall J. T., t. 4, str. 407—531, Academic Press, New York.
91. Wyman J., (1964), w Advances in Protein Chemistry, t. 19, str. 223—286.
92. Pauling L., (1935), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **21**, 186—191.
93. Chance B., Maehly A. C., (1955), w Methods in Enzymology, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 2, str. 764—775.
94. Bonnichsen R., (1948), *Acta Chem. Scand.*, **2**, 561—573.
95. Nishimura E. T., Carson S. N., Kobara T. Y., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.*, **108**, 452—459.
96. Brown G. L., (1952), *Biochem. J.*, **51**, 569—573.
97. DeDuve C., Baudhuin P., (1966), *Physiol. Rev.*, **46**, 323—357.
98. Aebi H., Cantz M., Suter H., (1965), *Experientia*, **21**, 713—714.
99. Nicholls P., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 286—297.
100. McGuire J. S., (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 104—108.
101. Muller M., Hogg J. F., DeDuve C., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5385—5395.
102. Chance B., Oshino N., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 564—567.
103. Oshino N., Oshino R., Chance B., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 555—563.





CZESŁAW CIERNIEWSKI <sup>\*)</sup>, TADEUSZ KRAJEWSKI <sup>\*\*)</sup>

## Budowa i właściwości fibrynogenu

### Structure and Properties of Fibrinogen

Zjawisko krzepnięcia krwi polega na przekształceniu rozpuszczalnego fibrynogenu, w nierozpuszczalny włóknik. Zjawisko to zachodzi przy udziale enzymów występujących w osoczu — trombiny i czynnika stabilizującego włóknik (FSF). W wyniku działania trombiny od cząsteczki fibrynogenu zostają odszczepione fibrynopeptydy. Pozostałość stanowią tzw. monomery włóknika, które spontanicznie polimeryzując tworzą włóknik rozpuszczalny. FSF w obecności jonów wapnia katalizuje tworzenie poprzecznych wiązań  $\epsilon/\gamma$ -glutamylolizynowych między łańcuchami  $\alpha$  i  $\gamma$  należącymi do różnych monomerów. W rezultacie tego powstaje włóknik nierozpuszczalny — stabilizowany.

Budowie i własnościom fibrynogenu było poświęconych szereg wcześniejszych artykułów przeglądowych (1, 2, 3).

W niniejszej pracy omówiono przede wszystkim obecne poglądy na budowę i niejednorodność cząsteczki białka krzepnącego.

### I. Struktura cząsteczki fibrynogenu

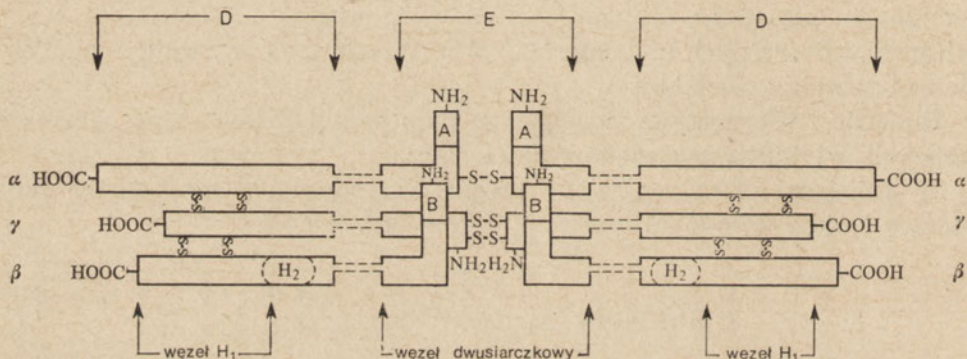
Badania produktów chemicznej i enzymatycznej degradacji fibrynogenu w dużym stopniu umożliwiły odtworzenie pierwotnej struktury cząsteczki. Fibrynogen posiada sztywną strukturę uwarunkowaną licznymi poprzecznymi mostkami dwusiarczkowymi. Różnymi metodami wykazano, że fibrynogen ssaków zawiera 22—29 wiązań dwusiarczkowych (4, 5, 6). Wiązania te występują bądź wewnątrzłańcuchowo, bądź też pomiędzy

<sup>\*)</sup>Dr, <sup>\*\*)</sup> Doc. dr, Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. Nowopółdniowa 12/16, 90-237 Łódź

Wykaz stosowanych skrótów:  $A\alpha$ ,  $B\beta$ ,  $\gamma$  — łańcuchy polipeptydowe fibrynogenu,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — łańcuchy polipeptydowe włóknika (International Committee for Thrombosis and Haemostasis, Oslo, Norwegia 1971 rok), A, AY, AP, AYP, B — fibrynopeptydy odszczepiane z fibrynogenu przez trombinę (E.C. 3.4.4.13), X, Y, D, E — fragmenty peptydowe powstające podczas degradacji fibrynogenu plazminą (E.C. 3.4.4.14), Pyr—Glu — kwas piroglutaminowy, Asx — kwas asparaginowy lub asparagina, Glx — kwas glutaminowy lub glutamina.

grupami sulfhydrylowymi cystein wchodzących w skład sąsiednich łańcuchów polipeptydowych. Grupy —SH są nierównomiernie rozmieszczone w cząsteczce i tworzą trzy silnie hydrofobowe „węzły”. W wyniku sulfitolizy (5) lub merkaptolizy (7), wiązania S—S ulegają rozerwaniu, a grupy poszczególnych łańcuchów polipeptydowych zostają zablokowane, odpowiednio resztami siarczanowymi lub karboksymetylowymi. Powstałe produkty nazywano nieraz S-sulfopochodnym fibrynogenem — a niesłusznie, ponieważ stanowią one fragmenty rozbitej cząsteczki fibrynogenu. Po rozpuszczeniu w stężonych roztworach mocznika, dają się one rozdzielić na pojedyncze łańcuchy polipeptydowe za pomocą chromatografii kolumnowej jonowymiennej (8, 9, 10, 11).

Masa cząsteczkowa S-sulfopochodnych fibrynogenu, określona za pomocą ultrawirowania wynosi 51 000. Odpowiada 1/6 cząsteczki fibrynogenu (8), gdyż jak wiadomo rodzime cząsteczki posiadają masę około 330 000—340 000. Ponieważ masa cząsteczkowa fibrynogenu wyliczona na podstawie analizy N-końcowych aminokwasów wynosi połowę tej wartości, wysunięto sugestię o obecności 3 par łańcuchów polipeptydowych w cząsteczce (Ryc. 1).



Rys. 1. Struktura cząsteczki fibrynogenu

Cząsteczka fibrynogenu jest zatem dimerem, a każda podjednostka składowa zbudowana jest z trzech łańcuchów polipeptydowych o masach cząsteczkowych 47 000—50 700, 56 000—60 400 i 63 500—70 900, oznaczanych jako  $\gamma$ ,  $\beta$  i  $\alpha$  (12, 13). Budowę cząsteczki fibrynogenu ssaków można przedstawić ogólnym wzorem  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ . Po odszczepieniu fibrynopeptydów A i B, powstałe monomery fibryny mają wzór  $(\alpha, \beta, \gamma)_2$ .

Teoretycznie, fibrynogen może dysocjować na 2 podjednostki o masie cząsteczkowej o połowę mniejszej od białka wyjściowego. Brakuje bezpośrednich dowodów potwierdzających tę hipotezę. Za taką możliwością jednak przemawiają obserwacje poczynione podczas chromatografii jonowymiennej natywnego fibrynogenu (14, 15), a zwłaszcza podczas doświadczeń, w których enzymatycznie zredukowano fibrynogen i włókniak ludzki



tioreduktazą tioredoksyny (16). W obecności NADPH enzym ten specyficznie redukuje niektóre wiązania dwusiarczkowe fibrynogenu i włókniaka. Selektywnej redukcji ulegają przede wszystkim tzw. symetryczne mostki dwusiarczkowe zlokalizowane w N-końcowym „węźle dwusiarczkowym”, wiążące obydwa monomery cząsteczki (Ryc. 1). Węzły te tworzą cysteiny w pozycji 28 łańcuchów A $\alpha$  oraz cysteiny w pozycjach 8 i 9 łańcuchów  $\gamma$ , licząc od N-końcowych aminokwasów. Pozwala to przypuszczać, że w warunkach, w których następuje selektywna redukcja tych właśnie symetrycznych wiązań S—S dochodzi do uwolnienia strukturalnie niezmienionych, monomerycznych podjednostek cząsteczki fibrynogenu.

W wyniku chemicznej degradacji wiązań metionylowych w fibrynogenu przez CNBr powstaje szereg wysokocząsteczkowych fragmentów polipeptydowych. Z powstałej mieszaniny polipeptydów wyizolowano i scharakteryzowano trzy rodzaje fragmentów peptydowych, które zawierają wszystkie wiązania dwusiarczkowe (6, 12, 17). Największy z nich, stanowiący około 16% cząsteczki (57 000 daltonów) miał budowę dimeryczną i zawierał fibrynopeptydy, które pod wpływem trombiny ulegały odszczepieniu (18, 19). Po redukcji i alkilacji, fragment ten rozdzielono na odcinki łańcuchów A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$ , a następnie ustalono ich strukturę I-rzędową. N-końcowe odcinki wszystkich 6 łańcuchów cząsteczki fibrynogenu łączą 11 wiązań dwusiarczkowych, które tworzą w tej części tzw. „węzeł dwusiarczkowy”. Pojedyncze fragmenty łańcuchów, wchodzące w skład „węzła dwusiarczkowego” zakończone resztami metionylowymi zawierają: A $\alpha$  — 51, B $\beta$  — 115 i  $\gamma$  — 78 aminokwasów (12). Pozostałe dwa rodzaje fragmentów peptydowych posiadające w swoim składzie reszty cysteinowe, to symetryczne hydrofobowe węzły H<sub>1</sub> o masie cząsteczkowej 34 000 każdy, zawierające 3 peptydy powiązane czterema mostkami dwusiarczkowymi, oraz dwa hydrofobowe węzły H<sub>2</sub> o masie cząsteczkowej 7000, z dwoma wewnątrzłańcuchowymi mostkami S—S, które prawdopodobnie utworzone są w obrębie łańcuchów B $\beta$  (17).

Dosyć dobrze jest też poznany molekularny mechanizm plazminowej degradacji fibrynogenu, włókniaka rozpuszczalnego i stabilizowanego. Ustalono kolejność rozszczepiania wiązań peptydowych przez plazminę, oraz poznano większość z powstających podczas proteolizy produktów pośrednich i końcowych (20, 21, 22). W wyniku całkowitej hydrolizy enzymatycznej, z jednej cząsteczki fibrynogenu powstają dwa fragmenty D o masie cząsteczkowej 83 000—100 000, jeden fragment E o masie 41 000—50 000 oraz cały szereg niskocząsteczkowych peptydów. Analiza N-końcowych aminokwasów fragmentu E wykazała, że zawiera on identyczne z aminokwasami N-końcowej części fibrynogenu rodzimego aminokwasu z wolną grupą  $\alpha$ -aminową. Co więcej trombina odszczepia od niego fibrynopeptydy. Fragment E i N-końcowy „węzeł dwusiarczkowy” mają prawie identyczny skład aminokwasowy, charakteryzują się obecnością tych samych determinant antygenowych. Oznacza to, że pochodzą one z tego samego

regionu cząsteczki fibrynogenu. Drugi końcowy produkt degradacji fibrynogenu fragment D zbudowany jest z trzech peptydów, połączonych ze sobą za pomocą wiązań dwusiarczkowych. Po rozerwaniu wiązań metionylowych bromocyjanem, wyizolowano z niego dwa fragmenty peptydowe, które zawierały odpowiednio 4 i 2 mostki S—S i odpowiadały węzłom H<sub>1</sub> i H<sub>2</sub> (6, 17).

W wyniku proteolizy fibrynogenu i włóknika rozpuszczalnego powstają analogiczne fragmenty D i E (23, 24, 25). Natomiast w przypadku włóknika stabilizowanego po jego proteolizie zamiast fragmentu D pojawia się inny fragment o znacznie mniejszej ruchliwości elektroforetycznej. Jest to „podwójny fragment D” o masie cząsteczkowej 160 000, powstały w wyniku utworzenia wiązań stabilizujących między łańcuchami  $\gamma$  sąsiadujących monomerów fibryny. Ponieważ wiadomo, że usieciowanie włóknika w procesie stabilizacji zachodzi najpierw w odcinkach C — końcowych łańcuchów  $\gamma$  należy uważać, że fragment D zlokalizowany jest właśnie w C-kończonym regionie cząsteczki fibrynogenu (Ryc. 1).

Podczas hydrolizy fibrynogenu *in vitro* różnymi enzymami proteolitycznymi (plazminą, trypsyną, chymotrypsyną) w pierwszej kolejności ulega rozpadowi łańcuch A $\alpha$  (21, 26). W tym czasie łańcuchy B $\beta$  i  $\gamma$  pozostają nieuszkodzone. Ich degradacja rozpoczyna się dopiero po prawie całkowitym rozłożeniu łańcucha polipeptydowego A $\alpha$ , co wynika zapewne z lokalizacji łańcucha A $\alpha$  na powierzchni cząsteczki fibrynogenu.

Model cząsteczki przedstawiony na rycinie 1 jest całkowicie zgodny z klasycznymi już dzisiaj obserwacjami poczynionymi przez Halla i Slaytera (27). Jak wiadomo podczas badania fibrynogenu w mikroskopie elektronowym ci ostatni stwierdzili, że cząsteczka ma kształt wydłużony i składa się z trzech kuleczek. Prawdopodobnie większym skrajnym kuleczkom (średnica 6,5 nm) odpowiadają fragmenty D rozmieszczone w peryferyjnych regionach obu monomerów, a środkowa mniejsza kuleczka (średnica 5,0 nm) to fragment E, który stanowi centralne ogniwo spajające obie symetryczne połówki cząsteczki fibrynogenu.

## II. Budowa chemiczna

### II-1. Skład aminokwasowy

Ze względu na swoje własności fizykochemiczne, fibrynogen należy do grupy białek nazywanych euglobulinami. Jego podobieństwa strukturalne z miozyną sprawiają, że niektórzy zaliczają fibrynogen do białek fibrylarnych.

Ostatnio określono ilościowy skład aminokwasowy wszystkich trzech łańcuchów polipeptydowych, tworzących cząsteczkę fibrynogenu człowieka, wołu, świni i owcy (28). W tabeli 1 przykładowo podany jest skład aminokwasowy łańcuchów polipeptydowych fibrynogenu ludzkiego.



Stwierdzono, że stosunek Tyr: Phe jest charakterystyczny dla poszczególnych łańcuchów polipeptydowych fibrynogenu badanych zwierząt i wynosi w przypadku łańcuchów A $\alpha$ , B $\beta$  i  $\gamma$ , odpowiednio 0,5—0,6, 1,4—1,5, 1,1—1,4. Łańcuchy A $\alpha$  są najbardziej zasadowe i zawierają wysoki procent argininy oraz proliny.

Tabela 1.

Skład aminokwasowy łańcuchów polipeptydowych ludzkiego fibrynogenu (28)

Aminokwas	moli/10 <sup>5</sup> g białka			
	$\gamma$	B $\beta$	A $\alpha$	Fibrynogen
Lizyna	66,9	67,0	58,9	65,1 ± 1,0
Histydyna	18,4	20,2	17,6	18,0 ± 0,2
Amoniak amidowy	152,0	140,0	141,3	135,0 ± 1,0
Arginina	35,5	36,8	59,0	47,1 ± 0,4
Kw. asparaginowy	108,1	119,1	106,3	106,5 ± 3,3
Treonina	51,9	45,5	60,5	53,2 ± 1,7
Seryna	51,2	60,3	85,5	65,6 ± 5,0
Kw. glutaminowy	104,7	113,8	99,2	99,4 ± 0,7
Prolina	27,6	42,1	54,9	42,1 ± 1,4
Glicyna	74,9	85,2	99,0	84,7 ± 3,6
Alanina	52,4	51,8	36,8	41,5 ± 0,9
Cystyna 1/2	17,7	28,0	16,0	21,0 ± 0,4
Walina	38,2	44,9	44,8	40,0 ± 2,5
Metionina	16,9	27,9	16,7	18,9 ± 1,2
Izoleucyna	37,7	35,6	39,2	36,0 ± 0,4
Leucyna	55,2	54,3	50,4	54,2 ± 0,5
Tyrozyna	40,4	38,2	17,8	29,6 ± 1,1
Fenyloalanina	32,3	26,3	27,1	28,1 ± 0,5

Dzięki badaniom przeprowadzonym głównie przez Blombäck a i wsp. (12, 29, 30) znane są N-końcowe aminokwasy fibrynogenu człowieka i szeregu zwierząt (Schemat 3, Tabela 2). W fibrynogenach zwierząt wyższych tyrozyna występuje zawsze jako N-końcowy aminokwas łańcucha  $\gamma$ . W fibrynogenach zwierząt niższych, miejsce tyrozyny zajmuje seryna, którą podobnie jak i tyrozynę można znaleźć również jako N-końcowy aminokwas włóknika (31). Po odszczepieniu fibrynopeptydów A i B, łańcuchy  $\alpha$  i  $\beta$  włóknika mają zawsze glicynę z wolną grupą  $\alpha$ -aminową.

W 1971 roku Okude i wsp. (32, 33) zidentyfikowali C-końcowe aminokwasy fibrynogenu różnych ssaków za pomocą trzech równolegle stosowanych metod: hydrazynolizy, trawienia karboksypeptydazą A i selektywnego znakowania <sup>3</sup>H. Otrzymane przez nich rezultaty zebrane są w tabeli 2.

Należy podkreślić, że we wszystkich łańcuchach polipeptydowych zbadanych fibrynogenów, z wolną grupą karboksylową występują aminokwasy hydrofobowe: walina, prolina oraz izoleucyna ( $\gamma$  łańcuch psa i świni).

Tabela 2.

N i C-końcowe aminokwasy łańcuchów polipeptydowych fibrynogenów niektórych ssaków (32, 33)

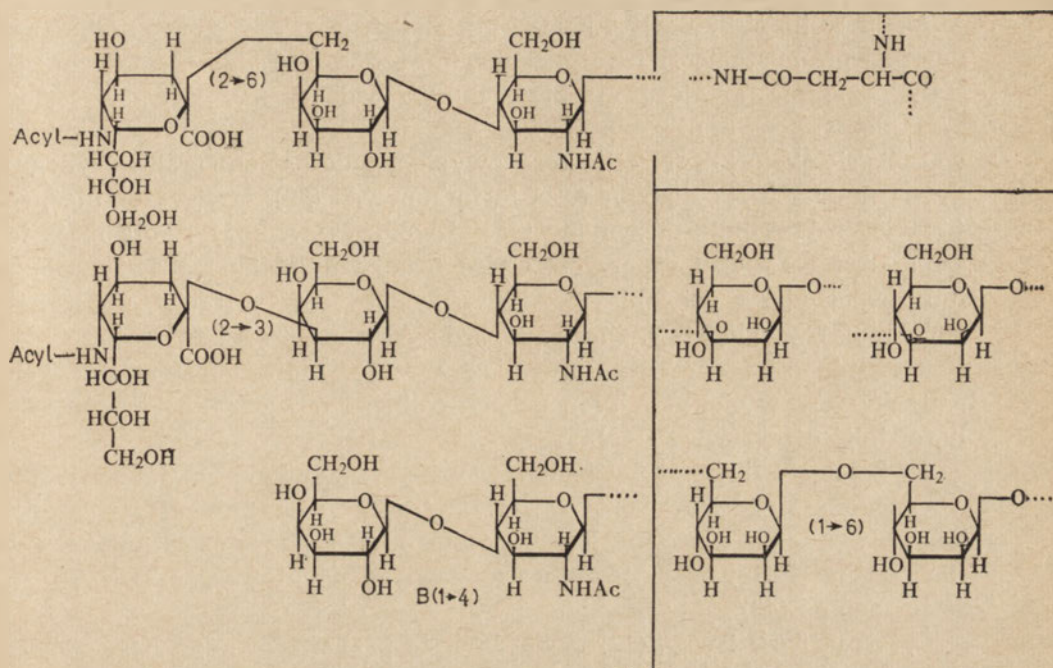
	N-końcowe	C-końcowe
Az	Człowiek	Ala—————Val
	Wół	Glu—————Pro
	Koń	Thr—————Val
	Świnia	Ala—————Pro
	Owca, koza	Gly—————Pro
	Pies	Thr—————Pro
Bβ	Człowiek	Pyr-Glu—————Val
	Wół	Pyr-Glu—————Val
	Koń	Thr—————Val
	Świnia	Ala—————Val
	Owca, koza	Ala—————Val
	Pies	His—————Val
γ	Człowiek	Tyr—————Val
	Wół	Tyr—————Val
	Koń	Tyr—————Val
	Świnia	Tyr—————Ile
	Owca, koza	Tyr—————Val
	Pies	Tyr—————Ile

## II-2. Frakcja cukrowa

Cząsteczka fibrynogenu ludzkiego jak i wołowego nie jest czystym białkiem, lecz zawiera składniki cukrowe: D-galaktozę, D-mannozę, N-acetylo-D-glukozaaminę (razem 2—3<sup>0</sup>/o), oraz kwas sjałowy (0,8<sup>0</sup>/o). Z pronazowego hydrolizatu fibrynogenu udało się wyizolować trzy różne glikopeptydy, które nazwano A, B i C (34). Masa cząsteczkowa poszczególnych glikopeptydów wynosi odpowiednio 2 800, 3 100 i 3 600. W toku pierwszych analiz ustalono, że stosunki molowe — heksoza : heksozoamina : kwas sjałowy, są identyczne w glikopeptydach B i C, jedynie glikopeptyd A charakteryzuje się mniejszą zawartością kwasu sjałowego. Kilka lat później wykazano, że w skład fragmentów cukrowych wchodzi — 4 cząsteczki D-glukozaaminy, 4 cząsteczki D-mannozy oraz 3 cząsteczki D-galaktozy, z którymi w części terminalnej wiąże się jeszcze kwas sjałowy. W glikopeptydzie A jest tam jedna cząsteczka kwasu sjałowego, która łączy się z galaktozą wiązaniem 2 : 3, podczas gdy w glikopeptydach B i C występują dwie cząsteczki kwasu sjałowego, jedna w pozycji 2 : 3, a druga w 2 : 6. Nie zbadano jeszcze pełnej sekwencji reszt cukrowych. Wiadomo, że cząsteczki D-galaktozy wiążą się bezpośrednio z N-acetylo-D-glukozaaminą w pozycji 1 : 4. Z czterech cząsteczek D-mannozy, dwie łączą się ze sobą wiązaniem 1 : 6, a pozostałe dwie przez swoje grupy hydroksylowe przy C—3 z nieoznaczonymi jeszcze składnikami (35). Schemat 1 przedstawia cukry wchodzące w skład glikopeptydów A, B i C.

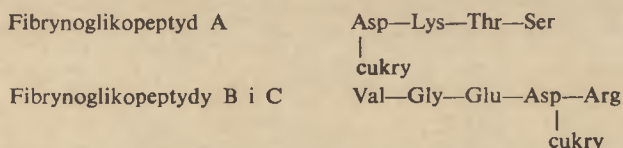


Składniki cukrowe wiążą się z łańcuchami polipeptydowymi za pośrednictwem  $\beta$ -L-asparamido-N-acetylo-D-glukozyaminy. Fragment ten wyizolowano z hydrolizatu fibrynogeny przy pomocy chromatografii bi-



Schemat 1. Cukry wchodzące w skład fibrynoglikopeptydów A, B, C (35)

bułowej, a następnie zidentyfikowano za pomocą spektrometrii masowej (34). Schemat 2 przedstawia sekwencję aminokwasową części peptydowej glikopeptydów A, B i C.



Schemat 2. Sekwencja aminokwasowa części peptydowej fibrynoglikopeptydów A, B i C (35)

Po zbadaniu sekwencji aminokwasowej N-końcowego odcinka łańcucha  $\gamma$  fibrynogeny wołowej (36) oraz po porównaniu jej z sekwencją aminokwasową glikopeptydu A stwierdzono, że łańcuch cukrowy jest połączony z asparaginą w pozycji 52 łańcucha polipeptydowego  $\gamma$ .

Oprócz łańcucha polipeptydowego  $\gamma$  również łańcuch B $\beta$  zawiera frakcję cukrową. Analiza produktów plazminowej degradacji wykazała, że część cukrowa łańcucha B $\beta$  występuje w fragmencie D, natomiast cukry łańcucha  $\gamma$  we fragmencie E (37).

### II-3. Frakcja fosforowa

Z pozostałych składników występujących w fibrynogenie wymienić należy resztę fosforanową. Badania D m o c h o w s k i e g o i K r a j e w s k i e g o (38) wykazały, że w fibrynogenie ludzkim i wołowym występuje fosfor w ilości około 18,0  $\mu\text{g}/100$  mg białka, co odpowiada 2 gramoatomom na gramocząsteczkę fibrynogenu (m. cz. 340 000). Te obserwacje zostały następnie potwierdzone przez innych badaczy (39, 40).

Podczas konwersji trombinowej ludzkiego fibrynogenu we włóknik uwalnia się około 40% reszt fosforanowych, a podczas konwersji fibrynogenu psa odszczepia się 80% reszt fosforanowych (39). Stwierdzono też, że fibrynogen i włóknik otrzymany z krwi wołu, owcy, kozy i kota mają tę samą ilość reszt fosforanowych. Część fosforu uwalniana z fibrynogenu ludzkiego podczas działania trombiny, występuje w postaci fosfoseryny, wchodzącej w skład tzw. fibrynopeptydu AP.

Ostatnio zaobserwowano również występowanie ufosforylowanych aminokwasów w niektórych łańcuchach polipeptydowych fibrynogenu wołu, świni i owcy (41, 42, 43).

Łańcuchy  $\gamma$  fibrynogenu badanych ssaków, podobnie jak łańcuchy B $\beta$  fibrynogenu świni i owcy nie zawierają reszty fosforanowej podczas gdy łańcuchy A $\alpha$  mają ufosforylowaną jedną resztę serynową. Łańcuch A $\alpha$  fibrynogenu świni obok fosfoseryny zawiera drugi fosfoaminokwas — fosfotreoninę (43).

B l o m b ä c k i w s p. (40) stwierdzili, że pozbawiony reszty fosforanowej fibrynogen ludzki ma nieco wydłużony czas trombinowy. Wydaje się, że kwaśny charakter grup fosforanowych w pewnym stopniu wpływa na aktywność biologiczną fibrynogenu. Przemawiają za tym również wyniki badań W i t t i w s p. (44, 45), w których stwierdzono pewne różnice w zawartości fosforu w fibrynogenie płodowym i człowieka dorosłego. Okazało się, że fibrynogen płodowy ma wyższą zawartość fosforu (22—36  $\mu\text{g}/100$  mg białka) i że krew płodowa zawierająca taki fibrynogen szybciej krzepnie niż krew człowieka dorosłego. Wykazano jednak, że obecność reszty fosforanowej w cząsteczce fibrynogenu wołu nie wpływa na kinetykę konwersji trombinowej (46).

Stała zawartość fosforu w fibrynogenie pozwoliła na wyznaczenie masy cząsteczkowej ludzkiego fibrynogenu. Otrzymane wartości są zgodne z uzyskanymi na innej drodze (47).

### III. Odszczepianie fibrynopeptydów

Trombina — enzym proteolityczny, dla której fizjologicznym substratem jest fibrynogen, zawiera w centrum aktywnym resztę seryny, podobnie jak chymotrypsyna i trypsyna. Niezależnie od tego czy trawi fibry-



Tabela 3.

Zawartość i zlokalizowanie fosforu w cząsteczce fibrynogenu badanych ssaków (43).

Lp.	Badane zwierzę	Frakcja	Zawartość P ( $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ białka)	Masa cząsteczkowa*	P mmole/mol białka	% ogólnej ilości mmoli fosforu	Fosfoaminokwas
1	Krowa	Fibrynogen	$18,2 \pm 0,5$	333 000	$1954 \pm 53$	100	
		S-sulfobryn.	$17,5 \pm 0,5$	333 000	$1860 \pm 53$	95,2	
		$\gamma_1$ łańcuch	$3,8 \pm 0,1$	47 000	$58 \pm 1$	3,0	
		$\gamma_2$ łańcuch	$3,5 \pm 0,1$	47 000	$53 \pm 1$	2,7	
		B $\beta$ łańcuch	$24,5 \pm 0,7$	56 000	$443 \pm 13$	22,2	Fosfoseryna
A $\alpha$ łańcuch	$29,8 \pm 0,7$	63 500	$610 \pm 13$	31,2	Fosfoseryna		
2	Świnia	Fibrynogen	$18,5 \pm 0,6$	341 000	$2034 \pm 66$	100	
		S-sulfobryn.	$18,4 \pm 0,6$	341 000	$2024 \pm 66$	99,4	
		$\gamma_1$ łańcuch	$1,0 \pm 0,1$	47 000	$15 \pm 1$	0,7	
		$\gamma_2$ łańcuch	$1,6 \pm 0,1$	47 000	$26 \pm 1$	1,3	
		B $\beta$ łańcuch	$3,8 \pm 0,1$	56 000	$69 \pm 1$	3,4	Fosfoseryna
A $\alpha$ łańcuch	$43,4 \pm 0,9$	67 500	$945 \pm 20$	46,5	Fosfotreonina		
3	Owca	Fibrynogen	$10,0 \pm 0,4$	330 000	$1074 \pm 43$	100	
		S-sulfobryn.	$9,8 \pm 0,4$	330 000	$1043 \pm 43$	97,1	
		$\gamma$ łańcuch	0	47 000	0	0	
		B $\beta$ łańcuch	0	56 000	0	0	
A $\alpha$ łańcuch	$23,0 \pm 0,7$	62 000	$460 \pm 14$	42,7	Fosfoseryna		

\* Wartości wyliczone z danych otrzymanych w wyniku elektroforezy białek w żelu poliakrylamidowym z siarczanem dodecylu sodu.

nogen rodzimy, sulfitolizowany czy też N-końcowy „węzeł dwusiarczkowy” trombina wykazuje taką samą specyficzną działalność. Rozbija mianowicie 4 wiązania arginylo-glicynowe, uwalniając fibrynopeptydy A i B. Podczas przedłużonej proteolizy fibrynogenu, trombina dodatkowo rozszczepia jeszcze kilka innych wiązań peptydowych spośród 250 wiązań wrażliwych na działanie trypsyny. Między innymi rozbić ulega wiązanie arginyłowe w pozycji 19 łańcucha  $A\alpha$ , w wyniku czego odszczepiony zostaje peptyd Gly—Pro—Arg.

Niezależnie od struktury (a więc pochodzenia (trawionego fibrynogenu, trombina uwalnia z niego fibrynopeptyd B znacznie wolniej niż peptyd A. Uwolnienie fibrynopeptydu A zapoczątkowuje powstawanie włóknika, w którym następuje liniowa polimeryzacja monomerów fibryny — koniec z końcem (*end-to-end*), natomiast odszczepienie fibrynopeptydu B umożliwia dodatkowo polimeryzację równoległą — bok z bokiem (*side-to-side*). W rezultacie tworzy się trójwymiarowa siatka włóknika.

Potwierdzają to doświadczenia, w których fibrynogen wykrzepiano różnymi enzymami proteolitycznymi. Np. jeżeli użyto enzymu jadu miedzianki południowej (*Agkistrodon c. contortrix*), który uwalnia peptyd B znacznie szybciej niż peptyd A, to skrzep nie tworzył się tak długo, dopóki odpowiednia ilość peptydu A nie została uwolniona (48). Reptilaza — enzym jadu *Bothrops jararaca*, ma zdolność odszczepiania tylko peptydu A. Powstały w wyniku jej działania skrzep różni się od włóknika trombinowego właściwościami fizykochemicznymi — lepkością i zdolnością rozpraszania światła (49). Również z nienormalnego fibrynogenu „Detroit” trombina odszczepia tylko fibrynopeptyd A (50, 51). W fibrynogenie tym, w pozycji 17 łańcucha  $A\alpha$  zamiast argininy znajduje się seryna. Te wszystkie obserwacje sugerują, że konformacja N-końcowej części łańcucha  $A\alpha$  ma pierwszorzędowe znaczenie dla powstawania w pełni spolimeryzowanego włóknika.

Szczegółowa analiza budowy N-końcowego „węzła dwusiarczkowego” wykazała, że sekwencja aminokwasowa w części C-końcowej fibrynopeptydu A prawie nie ulegała zmianom ewolucyjnym i jest podobna w fibrynogenach wszystkich ssaków (12). Dotyczy to przede wszystkim aminokwasów w pozycjach 1, 5, 6 i 9. W każdym przypadku w fibrynopeptydach A występują w tych miejscach następujące aminokwasy: Arg, Gly, Glu i Phe.

Z położenia fenyloalaniny w cząsteczce w pozycji 9 (licząc od wiązania arginyłowego) można wnioskować, że obecność reszty hydrofobowej w stałej odległości od rozszczepianego wiązania jest niezbędna dla prawidłowego działania trombiny.

Sprawdzono to w szeregu doświadczeń z syntetycznymi peptydami, w których fenyloalaninę umieszczano we wzrastających odległościach od zstryfikowanej reszty arginyłowej. Wszystkie peptydy hamowały aktyw-



19'	18'	17'	16'	15'	14'	13'	12'	11'	10'	9'	8'	7'	6'	5'	4'	3'	2'	1'
	<sup>2</sup> HN—Ala—Asp—Ser—Gly—Glu—Gly—Asp—Phe—Leu—Ala—Glu—Gly—Gly—Val—Arg—COOH																	

Cztowiek  
Szympanś  
Małpa szara  
Pawian  
Szczer  
Świnka morska  
Królika  
Pies, lis  
Niedźwiedź brunatny  
Kot  
Foka szara  
Borsuk  
Norka  
Słoń  
Osioł, muł  
Zebra  
Byk  
Bizon europejski  
Bizon  
Bawół  
Jeleń mieszany  
Jeleń  
Łoś amerykański  
Muntjak  
Renifer  
Owca, koza  
Świnia, dzik  
Lama  
Wigonia  
Wielbłąd  
Kangur  
Torbacz  
Jaszczurka

Schemat 3. Sekwencja aminokwasowa fibrynopeptydów A niektórych zwierząt (12)

ność trombiny (12). Najefektywniejszym inhibitorem był dziewięciopeptyd o konformacji spiralnej, którego łańcuch miał długość 1,3nm. Za wnioskiem, iż dla skuteczności działania trombiny potrzebna jest fenyloalanina w pozycji 9 przemawia fakt, że enzym ten rozszczepia również jedno z czterech wiązań arginyłowych hormonu — sekretyny, w której w pozycji 9 od trawionego wiązania znajduje się także fenyloalanina (12).

#### IV. Budowa fibrynopeptydów

Fibrynopeptydy wyizolowane z fibrynogenu ludzkiego są bardzo niejednorodne. Okazało się, że trombina odszczepia 4 różne fibrynopeptydy: A, AP, AY i B (29). Na podstawie wyliczonych stosunków molowych stwierdzono, że peptyd B stanowi połowę odszczepionego materiału peptydowego. Z trzech pozostałych peptydów, AP i AY są analogami fibrynopeptydu A. Peptyd A stanowi 70% w tej grupie, AP 20 i peptyd AY — 10%. Ta niejednorodność peptydów grupy A może być wynikiem degradacji fibrynogenu lub fibrynopeptydów *in vivo*, bądź *in vitro* w czasie izolowania. Może to jednak świadczyć, że te same lub poszczególne osobniki syntetyzują kilka rodzajów fibrynogenów, jako materiał wyjściowy do badań stosowano bowiem osocze krwi pochodzące od wielu dawców. Różnica między fibrynopeptydami A i AP polega na tym, że w tym ostatnim reszta serynowa w pozycji 3 jest zestryfikowana grupą fosforanową. Warto dodać, że struktura Asp-(FosfoSer)-Gly występująca w peptydzie AP jest identyczna ze strukturą otaczającą reaktywną resztę seryny w cząsteczkach niektórych enzymów a także w cząsteczce trombiny (52).

Fibrynopeptyd AY ma analogiczną sekwencję aminokwasową jak peptyd A, różni się tylko brakiem N-końcowej alaniny, a więc ma krótszy łańcuch o jeden aminokwas.

Fibrynopeptydy zbadanych ssaków zawierają 13—21 aminokwasów, przy czym spośród aminokwasów występujących w naturalnych białkach nie udało się wykryć cysteiny, metioniny i tryptofanu (Schemat 3, 4) (12).

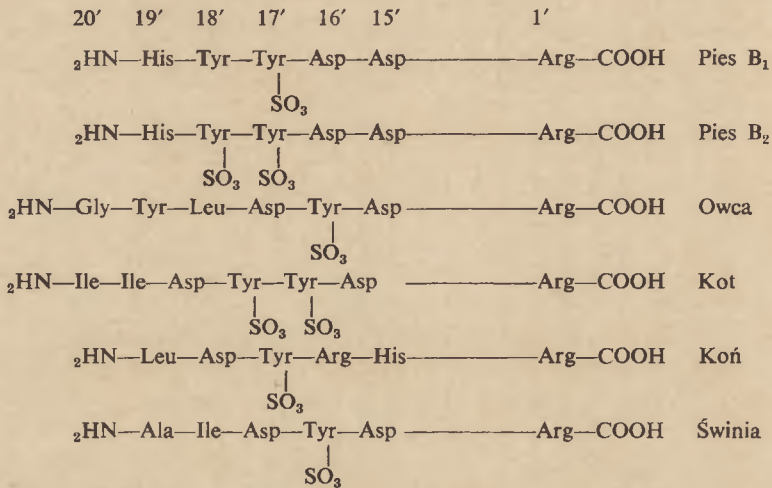
Występowanie silnie kwaśnej reszty fosforanowej w ludzkim fibrynopeptydzie A stanowi analogię do obecności reszty siarczanowej w fibrynopeptydzie B niektórych zwierząt (53). Wykazano, że reszta siarczanowa estryfikuje tyrozynę, zlokalizowano też pozycję O-sulfotyrozyny w peptydach B fibrynogenu kilku ssaków (Schemat 5).

Jak widać, niektóre peptydy posiadają dwie sąsiadujące ze sobą reszty tyrozyny zestryfikowane kwasem siarkowym (np. u psa i kota). W fibrynogenie psa wykryto nadto dwa typy peptydów B ( $B_1$  i  $B_2$ ), które różnią się ilością grup siarczanowych. W fibrynopeptydzie  $B_1$  poczynając od końcowego aminokwasu O-sulfotyrozyna zajmuje pozycję 17, a tyrozyna 18. W peptydzie  $B_2$  obie te pozycje są reprezentowane przez O-sulfo-





tyrozynę. W fibrynopeptydach B innych ssaków reszty O-sulfotyrozyny występują w następujących pozycjach: u owcy — 16, kota — 16, 17, świni i konia — 16 i 17.



Schemat 5. Rozmieszczenie reszt O-sulfotyrozyny w fibrynopeptydach B niektórych zwierząt (50)

Fibrynopeptydy odszczepiane przez trombinę wykryto także w fibrynogenie ptaków i innych kręgowców. Stwierdzono, że trombina wołowa podobnie jak i trombina ptasia odszczepia kilka fibrynopeptydów z fibrynogenu ptaków. Analiza aminokwasowa głównego fibrynopeptydu kaczek i gęsi wykazała, że pod względem składu aminokwasowego jest on podobny do peptydu B ssaków. Charakteryzuje się on bowiem dużą ilością kwasu asparaginowego i glutaminowego, prawdopodobnie zawiera resztę tyrozyny zestryfikowaną kwasem siarkowym jak również zablokowaną  $\alpha$ -aminową grupę N-końcowego aminokwasu. W fibrynogenie ptaków nie stwierdzono odszczepiania peptydu, odpowiadającego fibrynopeptydowi A ssaków, jakkolwiek peptyd C<sub>3</sub> występujący w minimalnej ilości w supernatancie nadskrzepowym kaczki miał zbliżony skład aminokwasowy (10, 54).

Fibrynopeptydy A i B godne są uwagi ze względów taksonomicznych. Porównanie sekwencji aminokwasowej fibrynopeptydów pochodzących z fibrynogenów różnych zwierząt dostarcza cennych informacji, wykorzystywanych przez systematyków podczas ustalania filogenezy organizmów. Warto podkreślić niemal identyczną budowę fibrynopeptydów A z krwi Naczelnych z fibrynopeptydem A człowieka oraz bardzo duże podobieństwo pierwszych dziewięciu aminokwasów fibrynopeptydów A (licząc od wiązania Arg—Gly, rozszczepianego przez trombinę) z krwi pozostałych grup ssaków. Nieporównanie większe różnice w strukturze pierwszorzędowej występują w fibrynopeptydach B. Tylko w pozycji



1 fibrynopeptydów B wszystkich zwierząt znajduje się ten sam aminokwas, tj. arginina. Można więc przypuszczać, że w przeciwieństwie do A, fibrynopeptydy B ulegały zmianom ewolucyjnym.

## V. Niejednorodność fibrynogenu

### V-1. Mikroheterogenność cząsteczek

Badania rozpuszczalności oczyszczonego preparatu fibrynogenu wołowego w roztworach o pH bliskim punktowi izoelektrycznemu i przy różnej sile jonowej, pozwalały na wysunięcie wniosku, że w preparatach fibrynogenu istnieją co najmniej dwie jego formy identyczne pod względem struktur wyższego rzędu (55). Obserwacje te potwierdzono stosując rozdział rodzimego fibrynogenu ludzkiego na kolumnie z DEAE-celulozy (56, 57). Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym fibrynogenu eluującego się z DEAE-celulozy w szczycie II wykryto, że zawiera on dwie odmiany łańcucha  $\gamma$  o jednakowych masach cząsteczkowych, ale różniące się ruchliwością elektroforetyczną. Ponieważ łańcuchy  $\gamma$ ,  $\gamma'$  występowały w stosunku molowym 1:1, można sądzić, że ogólny wzór cząsteczki tego fibrynogenu jest  $(A\alpha B\beta)_2\gamma\gamma'$ . Cząsteczki fibrynogenu eluujące się w szczycie I mają wzór  $(A\alpha B\beta\gamma)_2$ .

Fibrynogen wołowy otrzymany z krwi pojedynczych osobników jest również niejednorodny. Stwierdzono, że w wyniku chromatografii na kolumnie z DEAE-Sephadex A-50 rozdziela się on na trzy frakcje, a każda z nich zawiera w różnych proporcjach dwie odmiany łańcucha  $\gamma$  oznaczone jako  $\gamma_1$  i  $\gamma_2$ . Łańcuchy  $\gamma_1$  i  $\gamma_2$  różnią się zawartością aminokwasów, zwłaszcza histydyny, glicyny i tryptofanu oraz kwasu sjałowego.

Pewną heterogenność wykazano ponadto badając łańcuchy polipeptydowe  $A\alpha$ . Można przypuszczać, że analogicznie do różnych fibrynopeptydów A (AP, AY, AYP) fibrynogen zawiera następujące odmiany łańcuchów  $\alpha$  —  $A\alpha$ ,  $AP\alpha$ ,  $AY\alpha$  i  $AYP\alpha$ . W związku z tym Blombäck i wsp. (18) sugerują możliwość występowania licznych symetrycznych i asymetrycznych dimerów cząsteczki fibrynogenu jak np.  $AP\alpha A\alpha(B\beta\gamma)_2$ ,  $(AP\alpha B\beta\gamma)_2$ , itp.

Ponieważ fibrynopeptyd AP podobnie jak i fibrynogen ulega defosforylacji *in vitro* w obecności fosfatazy alkalicznej (58), a fibrynopeptyd AY z łatwością powstaje w wyniku inkubacji fibrynopeptydu A z surowicą (18) można uważać, że łańcuchy polipeptydowe  $A\alpha$ ,  $AY\alpha$  i  $AYP\alpha$  powstają w wyniku działania enzymów osocza — egzo-peptydaz i fosfataz na łańcuch polipeptydowy  $AP\alpha$ . Sądzi się przeto, że cząsteczka fibrynogenu bezpośrednio po syntezie składa się tylko z łańcuchów  $AP\alpha$ .

Badając podobnie fibrynogen wołowy (15) wykryto, że poszczególne frakcje tego białka eluowane z kolumny z DEAE-Sephadex A-50 różnią

się nie tylko ilością łańcuchów polipeptydowych  $\gamma_1$  i  $\gamma_2$ , lecz i stopniem ufosforylowania łańcuchów polipeptydowych  $A\alpha$  i  $B\beta$  (41). Wyliczono nawet, że w natywnym fibrynogenie wołowym może występować 36 odmian cząsteczek o różnym składzie łańcuchów  $\gamma$  oraz o różnym stopniu ufosforylowania (15).

Ostatnie badania dotyczące zawartości i rozmieszczenia reszt fosforanowych w fibrynogenie świni ujawniły dodatkowe źródło mikroheterogenności łańcuchów polipeptydowych  $A\alpha$  (43). Stwierdzono, że w skład dimerycznej cząsteczki mogą wchodzić łańcuchy polipeptydowe w równym stopniu ufosforylowane i różniące się jedynie miejscem powiązania fosforu z białkiem, tj. z grupą hydroksylową seryny lub treoniny (Tabela 3).

Znacznie mniej wiemy o rozmieszczeniu reszt siarczanowych w fibrynogenie. Widać już, że poszczególne łańcuchy polipeptydowe różnią się między innymi zawartością reszt siarczanowych (53).

#### V-2. Występowanie w osoczu produktów częściowego rozpadu fibrynogenu

W wyniku frakcjonowania osocza, a dokładniej — I frakcji Cohna różnymi stężeniami alkoholu etylowego, glicyny, alaniny i glikolu polietylenowego otrzymano kilka frakcji ludzkiego fibrynogenu o wysokiej krzepliwości (96—99%), które różniły się rozpuszczalnością i czasem trombinowym (13, 59). Dokładnie scharakteryzowane zostały frakcja I—4 (słabo rozpuszczalna) oraz frakcje I—8 i I—9 (bardzo dobrze rozpuszczalne). Po sulfitolizie tych frakcji i rozdzieleniu powstałych S-sulfopochodnych na kolumnie z CM-celulozy, we wszystkich trzech przypadkach otrzymano identyczne profile elucji (13). Mapki peptydowe hydrolizatów trypsynowych łańcuchów  $\gamma$  i  $B\beta$  pochodzących z frakcji I—4, I—8 i I—9 były identyczne, podczas gdy mapka peptydowa łańcucha  $A\alpha$  z frakcji I—4 zawierała kilka dodatkowych peptydów, nieobecnych lub występujących w niewielkich ilościach na chromatogramach hydrolizatów łańcuchów  $A\alpha$  wyizolowanych z frakcji I—8 i I—9. Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym łańcuchy  $\gamma$  i  $B\beta$  poszczególnych frakcji wędrowały jako pojedyncze pasma, łańcuchy  $A\alpha$  zaś rozdzielały się na kilka składników o masach cząsteczkowych od 15 400 do 70 900. Okazało się, że frakcja I—4 zawierała w niewielkim stopniu uszkodzony łańcuch  $A\alpha$ , podczas gdy we frakcji I—9 był on prawie całkowicie zdegradowany. Dane te pozwoliły na wniosek, że materiał o większej rozpuszczalności (frakcje I—8, I—9) jest katabolicznym produktem natywnego fibrynogenu. Analiza N-końcowych aminokwasów w poszczególnych łańcuchach polipeptydowych frakcji I—4, I—8 i I—9 wykazała obecność w nich reszt aminokwasowych charakterystycznych dla łańcuchów  $A\alpha$ ,  $B\beta$  i  $\gamma$  natywnego fibrynogenu. Można było przeto przypuszczać, że w pierwszym etapie



katabolizmu fibrynogenu następuje rozbitcie kilku wiązań peptydowych (przypuszczalnie wiązań lizylo—X lub arginylo—X) w C-końcowym regionie łańcucha polipeptydowego A $\alpha$ . Obecność produktów degradacji w preparacie fibrynogenu może tłumaczyć niektóre rozbieżności w wynikach oznaczeń masy cząsteczkowej i innych właściwości fibrynogenu.

Przedstawione wyniki badań upoważniają do stwierdzenia, że obserwowana przez wielu badaczy (13, 15, 55, 56, 57, 60) niejednorodność preparatów fibrynogenu otrzymanych z krwi pojedynczych osobników jest zjawiskiem bardzo złożonym i wynika z nałożenia się efektów kilku zjawisk:

Po pierwsze może być spowodowana zanieczyszczeniem preparatów produktami częściowej degradacji fibrynogenu, które podobnie jak białko rodzime charakteryzują się wysoką krzepliwością; po drugie łańcuchy polipeptydowe wchodzące w skład dimerycznej cząsteczki mogą różnić się składem aminokwasowym i zawartością cukrów; po trzecie poszczególne łańcuchy polipeptydowe mogą być w różnym stopniu ufosforylowane, jak również mogą różnić się ilością reszt siarczanowych.

Artykuł otrzymano 20.11.1973, po rewizji autorskiej przyjęto 12.12.1974.

## PIŚMIENNICTWO

1. Copley, A. L. (1966), *Post. Bioch.* 14, 343—349.
2. Lalałło, Z. (1966), *Post. Hig. Med. Dośw.* 22, 657—829.
3. Budzyński, A. (1969), *Post. Hig. Med. Dośw.* 23, 293—369.
4. Henschen A. (1964), *Arkiv Kemi* 22, 355—375.
5. Henschen, A. (1964), *Arkiv Kemi* 22, 1—28.
6. Dudek-Wojciechowska, G. A., Kłoczewiak, M., Lalałło, Z. S., Kopeć, M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 295, 536—542.
7. Henschen, A., Edman, P. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 263, 351—367.
8. Henschen, A. (1964), *Arkiv Kemi* 22, 375—391.
9. Clegg, J. B., Bailey, K. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* 63, 525—527.
10. Hann, C. S. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 181, 342—344.
11. Gerbeck, C. M., Yoshikawa, T., Montgomery, R. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 134, 67—75.
12. Söderquist, T., Blombäck, B. (1971), *Naturwissenschaften* 58, 16—23.
13. Mosesson, M. W., Finlayson, J. S., Umfleet, R. A., Galanakis, D. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 5210—5219.
14. Capet-Antonini, F. C., Guinand, S. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 200, 486—496.
15. Mosher, F. D., Blout, E. R. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 6896—6903.
16. Kowalska-Loth, B., Blombäck, B. (1973), *Streszczenia prac XI Zjazdu P. T. Bioch.*, str. 188.
17. Gärlund, B., Kowalska-Loth, B., Gröndahl, N. J., Blombäck, B. (1972), *Thrombosis Research* 1, 371—395.

18. Blombäck, B., Hessel, B., Iwanaga, S., Reuterby, J., Blombäck, M. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 1496—1512.
19. Blombäck, B., Gröndahl, N. J., Hessel, B., Iwanaga, S., Wallen, P. (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 5806—5820.
20. Furlan, M. Beck, E. A. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 631—644.
21. Pizzo, S. V., Schwartz, M. L., Hill, R. L., McKee, R. A. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 636—645.
22. Marder V. J., Budzyński, A. Z., James, H. L. (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 4775—4781.
23. Kopeć, M., Teisseyre, E., Dudek-Wojciechowska, G., Kłocze-wiak, M., Pankiewicz, A., Latałło, Z. S. (1973), *Thrombosis Research* **2**, 283—292.
24. Gafney, P. J., Brasher, M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **295**, 308—313.
25. Gafney, P. J. (1973), *Thrombosis Research* **2**, 201—218.
26. Nakamura, S., Iwanaga, S., Suzuki, T. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **336**, 86—99.
27. Hall, C. E., Slayter, H. S. (1959), *J. Bioch. Biophys. Cytology* **5**, 11—15.
28. Cartwright, T., Kekwick, R. G. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **236**, 550—562.
29. Blombäck, B., Blombäck, M., Edman, P., Hessel, B. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* **115**, 371—396.
30. Blombäck, B., Blombäck, M., Gröndahl, N. J., (1965), *Acta Chem. Scand.* **19**, 1789—1798.
31. Doolittle, R. F., Lorand, L., Jacobson, A. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **69**, 161—173.
32. Okude, M., Iwanaga, S. (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 450—457.
33. Okude, M., Iwanaga, S. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **251**, 185—196.
34. Mester, L., Moczar, E., Szabadas, L. (1967), *C. R. Acad. Sci.* **265**, 877—891.
35. Mester, L. (1969), *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, 635—648.
36. Iwanaga, S., Blombäck, B., Gröndahl, N. J., Hessel, B., Wal-len, P. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 280—283.
37. Gafney, P. J. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **263**, 452—458.
38. Dmochowski, A., Krajewski, T. (1961), *Proc. 5th Int. Congr. Biochem.*, Moscow, Section 16, 348.
39. Fantl, P., Ward, H. A. (1962), *Biochim. Biophys. Acta* **64**, 568—570.
40. Blombäck, B., Blombäck, M., Searle, J. (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 148—151.
41. Krajewski, T., Cierniewski, C. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **271**, 174—181.
42. Krajewski, T. Banaś, Z., Cierniewski, C. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* **332**, 95—98.
43. Cierniewski, C., Krajewski, T. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **351**, 372—378.
44. Witt, I., Müller, H., Künzer, W. (1969), *Thromb. Diath. Haemorrh.* **22**, 101—108.
45. Witt, I., Müller, H. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **211**, 402—404.
46. Witt, I., Hasler, K. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* **271**, 357—362.
47. Fantl, P., Ward, H. A. (1965), *Biochem. J.* **96**, 886—889.
48. Herzig, R. H. (1969), *Blood* **34**, 842—846.
49. Laurent, T. C., Blombäck, B. (1958), *Acta Chem. Scand.* **12**, 1875—1891.



50. Blombäck, B., (1970), *Symp. Zool. Soc. Lond.* 27, 167, Academic Press. Inc.
51. Blombäck, B., Blombäck, M., Henschen, A., Hessel, B., Iwanaga, S., Woods, K. R. (1968), *Nature* 218, 130—134.
52. Gladner, J. A., Laki, K. (1958), *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 1263—1269.
53. Krajewski, T., Blombäck, B. (1968), *Acta Chem. Scand.* 22, 1339—1346.
54. Hann, C. S. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 124, 398—399.
55. Hartley, R. W., Waugh, D. F. (1960), *J. Amer. Soc.* 82, 978—983.
56. Finlayson, J. S., Mosesson, M. W. (1963), *Biochemistry* 2, 42—46.
57. Finlayson, J. S., Mosesson, M. W. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 82, 415—417.
58. Teger-Nilsson, A. C. (1968), *Acta. Chem. Scand.* 22, 3171—3176.
59. Mosesson, M. W., Sherry, S. (1966), *Biochemistry* 5, 2829—2835.
60. Brummel, H. C., Montgomery, R. (1970), *Anal. Biochem.* 33, 28—35.





BRONISŁAWA GRODECKA \*)

## Hormon wzrostu

### Growth Hormone

Jednym z czynników decydujących o prawidłowym rozwoju fizjologicznym organizmów żywych jest hormon wzrostu. Wytwarzany on jest w przednim płacie przysadki mózgowej, w komórkach surowiczych typu  $\alpha$ , które w obrazie elektronomikroskopowym charakteryzują się dużą gęstością elektronową i wymiarami ziarnistości 350—500nm. Uwalnianie hormonu z komórek przysadki i włączanie go do krwioobiegu odbywa się za pośrednictwem odpowiedniego hormonu uwalniającego („releasing hormone”) produkowanego przez podwzgórze. Hormon uwalniający hormon wzrostu wyizolowany z podwzgórza świni jest deka-peptydem posiadającym następującą sekwencję aminokwasową: H—Val—His—Leu—Ser—Ala—Glu—Glu—Lys—Glu—Ala—OH(1). Hormon wzrostu zaś jest polipeptydem, o masie cząsteczkowej około 20 000, wykazującym w działaniu swoistość gatunkową. Hormon wyizolowany z przysadek określonych gatunków zwierząt nie stymuluje wzrostu zwierząt z gatunków o wyższym szczeblu rozwoju rodowego. W przypadkach odwrotnych natomiast zawsze stwierdza się jego działanie biologiczne. Cechę swoistości działania hormonu potwierdzono również w układzie doświadczalnym *in vitro*, w którym badano zdolność wiązania hormonu (znakowanego trytem) przez błony erytrocytów, w zależności od ich gatunkowego pochodzenia. Wykazano, że błony erytrocytów człowieka wiążą tylko ludzki hormon wzrostu, natomiast błony erytrocytów szczura wiążą zarówno ludzki jak i wołowy hormon (2,3).

### I. Heterogenność preparatów hormonu wzrostu

Hormon wzrostu otrzymuje się z przysadek zwierzęcych bądź ludzkich sposobami konwencjonalnymi, opisanym na początku lat sześćdziesiątych i stosowanymi do chwili obecnej (4—9). Aktywność biologiczną hormonu oznacza się metodą *tibia test* mierząc przyrost grubości nasad chrząstki kości goleniowej młodych hipofizektomizowanych, szczurów,

\*) Mgr inż., Zakład Hormonów, Centralne Laboratorium Surowic i Szczepionek, ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

które otrzymały hormon (10). Większość uzyskiwanych preparatów hormonu wzrostu badana metodami wolnej elektroforezy, sączenia molekularnego, ultrawierowania, czy oznaczania skrajnych aminokwasów wykazywała homogenność, której nie udało się jednak potwierdzić metodą elektroforezy w żelu skrobiowym lub poliakryloamidowym (11—16). Praktycznie wszystkie preparaty hormonu wzrostu w badaniach elektroforetycznych wykazywały heterogenność. Niejednorodny był hormon uzyskiwany z pojedynczych przysadek, jak również hormon izolowany różnymi metodami z materiału zbiorczego. Analiza elektroforetyczna w żelu poliakryloamidowym kilku różnych preparatów ludzkiego hormonu wzrostu ujawniła w każdym z nich po 4 frakcje wykazujące jednakową intensywność zabarwienia i ruchliwość elektroforetyczną. Preparaty wołowego hormonu wzrostu rozdzielały się również na kilka frakcji, spośród których 3 w każdym z preparatów nie różniły się w obrazie elektroforetycznym. W preparatach hormonu z przysadki człowieka, małpy i świni wykazano obecność 3 identycznych komponent elektroforetycznych. Poszczególne frakcje elektroforetyczne wyeluowane z żelu, w immunodiffuzji z surowicą przeciwko hormonowi wzrostu dawały pojedyncze zlewające się ze sobą linie precipitacyjne. Takie same linie tworzyły się jeżeli do reakcji użyto przeciwciał skierowanych przeciwko każdej pojedynczej frakcji elektroforetycznej, co świadczyło o identyczności immunologicznej tych frakcji. Frakcje elektroforetyczne nie różniły się między sobą, jak również w porównaniu z hormonem poddawany elektroforezie, aktywnością biologiczną, składem aminokwasowym i skrajnymi aminokwasami (12, 19—21).

Molekularną heterogenność hormonu próbowano tłumaczyć w różny sposób. W niektórych badanych preparatach hormonu stwierdzono obecność enzymów proteolitycznych i przypuszczano, że obserwowane w elektroforezie frakcje są artefaktem wynikłym z enzymatycznej degradacji cząsteczki (22, 23). Badano również hydrolityczny wpływ plazminy na właściwości elektroforetyczne ludzkiego hormonu wzrostu, rozdzielającego się w żelu poliakryloamidowym na 4 frakcje\*. Stwierdzono, że ilość frakcji elektroforetycznych oraz ich właściwości biologiczne i fizyko-chemiczne w hormonie trawionym nie zmieniały się, posiadały one jedynie zwiększoną w stosunku do frakcji hormonu nietrawionego ruchliwość w polu elektrycznym (24—26).

Heterogenność elektroforetyczną hormonu dość często tłumaczono różnym stopniem dezamidacji jego cząsteczek. Badania kinetyczne nad dezamidacją ludzkiego i wołowego hormonu wzrostu w środowisku silnie alkalicznym wykazały bowiem, że istnieje korelacja pomiędzy ilością wydzielanego amoniaku, a konwersją jednorodnego hormonu w mnogie frakcje o szybszej ruchliwości elektroforetycznej (27).

\* Patrz również w tym zeszycie Sprawozdanie z IX Zjazdu FEBS, str. 248 (Red.).



Najczęściej jednak zjawisko heterogenności łączono z tendencją hormonu do agregacji. Metodą sączenia molekularnego wykazano, że hormon wzrostu może tworzyć homologiczne, wysokocząsteczkowe agregaty białkowe pozbawione aktywności biologicznej. W trakcie wielokrotnego sączenia hormonu przez Sephadex G-100 i G-200 stwierdzono, że 20—40% materiału nakładanego na kolumnę regularnie ulega agregacji. Duży wpływ na stosunek ilościowy formy zagregowanej do monomerycznej miały: skład jonowy, siła jonowa i pH środowiska, w którym prowadzono filtrację żelową (11, 12). Czynniki te zmieniały również hydrodynamiczne właściwości cząsteczki określane przez pomiar współczynnika sedymentacji, lepkości wewnętrznej oraz analityczną dializę i filtrację żelową. Uzyskane wyniki pomiarów wskazywały na tworzenie się wysokocząsteczkowych zagregowanych form hormonu (28). Polimeryczne formy hormonu tworzyły się również pod wpływem: mocznika, redukcji (29), długotrwałego przechowywania w stanie zamrożenia (30), utleniania kwasem nadmanganowym (31), znitrowania grup tyrozynowych (32), oraz zalkilowania reszty tryptofanu (33).

Czynniki odpowiedzialnymi za elektroforetyczną heterogenność hormonu mogą być: polimorfizm molekularny, enzymatyczne lub inne uszkodzenia cząsteczki i agregacja międzymolekularna. Ponieważ ekstrakty solne i preparaty uzyskane z pojedynczych przysadek, podobnie jak hormon izolowany z bardzo wielu przysadek zawierały zawsze więcej niż jedną frakcję o czynności wzrostowej, mało prawdopodobnym wydaje się, aby w grę wchodziły tu osobnicze cechy danego gatunku. Fakt powyższy oraz to, że niejednorodność stwierdzano w hormonie izolowanym i oczyszczanym zarówno w środowisku alkalicznym, obojętnym jak i kwaśnym, nie przemawiałyby również za preparatywnym uszkodzeniem cząsteczki. Możliwe jednak, że w niektórych przypadkach może dochodzić bądź do enzymatycznego nadtrawienia cząsteczki, bądź jej dezamidacji w wyniku czego mogą się pojawiać dodatkowe komponenty elektroforetyczne. Najbardziej prawdopodobną przyczyną heterogenności hormonu, wydaje się być międzymolekularna asocjacja cząsteczek zachodząca, jak to wynikało z przeprowadzonych badań, samoistnie lub też pod wpływem niektórych czynników chemicznych i fizycznych. W wyniku tego procesu mogą się tworzyć agregaty o zróżnicowanym ciężarze cząsteczkowym i ładunku, a więc o ruchliwości elektroforetycznej, co w żelu poliakrylamidowym daje niejednorodny obraz materiału.

## II. Struktura hormonu wzrostu

### II-1. Właściwości fizykochemiczne i struktura pierwszorzędowa.

Udowodniono, że hormon wzrostu niezależnie od pochodzenia jest białkiem prostym. Podawane w literaturze wyniki oznaczeń masy cząsteczkowej tego hormonu bywały rozbieżne nie tylko w obrębie danego

gatunku ale i tych samych technik oznaczania (31, 34—37). Ostatecznie ustalono, że masa cząsteczkowa owczego hormonu wzrostu wynosi 20 300, świńskiego 20 200, a wołowego 20 800 (14, 38, 39). Wyniki oznaczeń masy cząsteczkowej ludzkiego hormonu wzrostu dały wartość 21 500 (40). Można więc powiedzieć, że niezależnie od pochodzenia masa molekularna hormonu wzrostu wynosi około 20 000, co pokrywa się z minimalną masą molekularną wyliczoną z empirycznie ustalonej sekwencji aminokwasowej ludzkiego, wołowego i owczego hormonu wzrostu (41—43).

W tablicy 1 zestawiono szereg właściwości fizyko-chemicznych hormonu wzrostu różnego pochodzenia. Jak widać nie różni się on masą cząsteczkową, ma podobny współczynnik sedymentacji, wartość pK tyrozyn oraz podobną zawartość formy spiralnej. Od strony C-skrajnej cząsteczka zakończona jest zawsze tym samym aminokwasem — fenyloalaniną. Fenyloalanina stanowi również zakończenie łańcucha peptydowego od strony N-skrajnej, jedynie w cząsteczce wołowego hormonu wzrostu w tej pozycji występuje alanina. Różne wartości punktu izoelektrycznego oraz współczynników dyfuzji sugerują różnice gatunkowe w składzie aminokwasowym tego białka.

Badania strukturalne nad ludzkim hormonem wzrostu zostały zapoczątkowane w Laboratorium Badawczym Hormonów Uniwersytetu Kalifornijskiego w San Francisco, kierowanym przez C. H. Li. W 1964 r. w Ośrodku tym określono skład aminokwasowy ludzkiego hormonu wzrostu i sekwencję pierwszych kilku aminokwasów od strony N-skrajnej łańcucha polipeptydowego (45,46). Po wstępnych pracach nad określeniem pierworzędowej struktury ludzkiego hormonu wzrostu, Li i podał sekwencję aminokwasową całej cząsteczki, składającej się ze 188 reszt aminokwasowych (47—49). Struktura ta została zakwestionowana przez Nialla, który wykazał odmienność sekwencji aminokwasowej w obrębie zbadanych reszt aminokwasowych 1—45, 75—109, 127—146 i 162—169, co stanowiło około 50% aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym (50, 51). W roku 1971 Li zaproponował nowy model cząsteczki hormonu, złożony ze 190 reszt aminokwasowych (52), który w odpowiednich odcinkach łańcucha polipeptydowego miał taką samą sekwencję aminokwasową jak niekompletny model cząsteczki przedstawiony przez Nialla. Obecnie przyjętym modelem struktury pierwszorzędowej ludzkiego hormonu wzrostu jest model przedstawiony przez Li w 1972 r., który różni się od uprzednio zaproponowanego przez tego samego autora, obecnością dodatkowego aminokwasu — glutaminy w pozycji 69 (40). Cząsteczka ludzkiego hormonu wzrostu składa się ze 191 reszt i ma następujący skład aminokwasowy: I<sub>1</sub>, y<sub>2</sub>, His<sub>3</sub>, Arg<sub>11</sub>, Asp<sub>11</sub>, Thr<sub>10</sub>, Ser<sub>16</sub>, Glu<sub>13</sub>, Pro<sub>6</sub>, Gly<sub>8</sub>, Asn<sub>9</sub>, Gln<sub>14</sub>, Ala<sub>7</sub>, Cys<sub>4</sub>, Val<sub>7</sub>, Met<sub>3</sub>, Ile<sub>8</sub>, -Leu<sub>26</sub>, Tyr<sub>6</sub>, Phe<sub>13</sub>, Trp<sub>1</sub>. Pojedynczy łańcuch polipeptydowy zakończony z obydwu stron fenyloalaniną, spięty jest dwoma mostkami dwusiarczkowymi pomiędzy resztami cysteiny w pozycjach 53 i 165 oraz 182 i 186. Cząsteczka zawiera 1 tryptofan w pozycji 86, 3 histydyny, 3 metioniny



Tabela 1.

## Właściwości fizyko-chemiczne hormonu wzrostu

Rodzaj badań	Hormon wzrostu z przysadki				
	człowieka	małpy	wołu	owcy	świni
Współczynnik sedymentacji $S_{20,w}$	2,18 (40)	1,88 (44)	2,14 (37)	2,1 (14)	2,1 (39)
Współczynnik dyfuzji $D_{20,w} \times 10^7$	8,88 (40)	7,20 (44)	10,64 (37)	brak danych	9,2 (39)
Masa cząsteczkowa	21 500 (40)	20 500 (35)	20 800 (37)	20 300 (14)	20 200 (39)
Punkt izoelektryczny	4,9 (40)	5,5 (44)	6,9 (44)	6,3 (14)	7,25 (39)
pK tyrozyn	10,8 (40)	11,0,2 (44)	9,45 (34)	brak danych	brak danych
% konformacji heliksowej	55 (40)	brak danych	52 (56)	brak danych	brak danych
Aminokwas					
C-skrajny	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
N-skrajny	Phe	Phe	Ala	Phe	Phe

oraz 8 tyrozyn. Według tych danych około 88% aminokwasów znalazło się w zupełnie innym położeniu niż to podawał autor we wcześniejszych swoich doniesieniach.

H-Phe-Pro-Thr-Ile-Pro-Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-Asp-Asn-Ala-Met-Leu-Arg-Ala-His-Arg-Leu-				
1	5	10	15	20
His-Gln-Leu-Ala-Phe-Asp-Thr-Tyr-Gln-Glu-Phe-Glu-Glu-Ala-Tyr-Ile-Pro-Lys-Glu-Gln-				
25	30	35	40	
Lys-Tyr-Ser-Phe-Leu-Gln-Asn-Pro-Gln-Thr-Ser-Leu-Cys-Phe-Ser-Glu-Ser-Ile-Pro-Thr-				
45	50	55	60	
Pro-Ser-Asn-Arg-Glu-Glu-Thr-Gln-Gln-Lys-Ser-Asn-Leu-Gln-Leu-Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-				
65	70	75	80	
Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Glu-Pro-Val-Gln-Phe-Leu-Arg-Ser-Val-Phe-Ala-Asn-Ser-				
85	90	95	100	
Leu-Val-Tyr-Gly-Ala-Ser-Asn-Ser-Asp-Val-Tyr-Asp-Leu-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-				
105	110	115	120	
Ile-Gln-Thr-Leu-Met-Gly-Arg-Leu-Glu-Asp-Gly-Ser-Pro-Arg-Thr-Gly-Gln-Ile-Phe-Lys-				
125	130	135	140	
Gln-Thr-Tyr-Ser-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Ser-His-Asn-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-				
145	150	155	160	
Gly-Leu-Leu-Tyr-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Met-Asp-Lys-Val-Glu-Thr-Phe-Leu-Arg-Ile-Val-				
165	170	175	180	
Gln-Cys-Arg-Ser-Val-Glu-Gly-Ser-Cys-Gly-Phe-OH				
185	190			

Schemat 1. Sekwencja aminokwasowa ludzkiego hormonu wzrostu wg Li (40)

## II-2. Struktura drugorzędowa cząsteczki natywnej i zmodyfikowanej

Spektrofotometryczne badania drugorzędowej struktury ludzkiego hormonu wzrostu przeprowadzono metodą dyspersji rotacji optycznej (ORD) oraz przez pomiar dichroizmu kołowego (CD) w zakresie długości fali 220—500nm. W środowisku wodnym o zakresie pH 1,3—13 zawartość formy spiralnej w cząsteczce hormonu wzrostu nieznacznie się zmieniała; wynosiła 58—43%. Zmiany w drugorzędowej strukturze ludzkiego hormonu wzrostu występowały dopiero w 8 M moczniku o pH 1,3 w 50% kwasie octowym oraz 5M roztworze chlorowodoru guanidyny (53, 54). W wołowym hormonie wzrostu zawartość formy spiralnej wynosiła 52% i podobnie jak w hormonie ludzkim struktura spiralna zanikała dopiero przy wysokich stężeniach mocznika i bardzo niskich wartościach pH (55—57). Tak więc około połowa łańcucha polipeptydowego w hormonie wzrostu posiada konformację spiralną, która jest trwała nawet w dość skrajnych warunkach pH.

Rolę wiązań dwusiarczkowych w kształtowaniu struktury ludzkiego hormonu wzrostu badano przez porównanie właściwości fizyko-chemicznych cząsteczki natywnej i zredukowanej. Obecne w ludzkim hormonie wzrostu 2 wiązania dwusiarczkowe zredukowano, grupy sulfhydrylowe



zablokowano jodoacetamidem, po czym wykonano oznaczenia ciężaru cząsteczkowego, lepkości, zawartości konformacji spiralnej, swobody jonizacji tyrozyn i podatności na trawienie trypsyną (58, 59). Masa cząsteczkowa hormonu natywnego i S-karbamidometylowanego wynosiła około 23 000, świadczyło to o monomerycznej postaci tych obu form białka. Lepkość wewnętrzna hormonu natywnego i zredukowanego wynosiła odpowiednio 4,3 i 5,0 ml/g. Tę drobną różnicę w lepkości można zapewne tłumaczyć zmianą stosunków osiowych lub uwodnieniem hormonu zredukowanego. Redukcja i alkilacja wiązań dwusiarczkowych nie zmieniła swobody jonizacji tyrozyn, z których dwie miareczkowały się dopiero w roztworze 5M chlorowodoru guanidyny, co świadczy o umiejscowieniu ich wewnątrz cząsteczki. Nie zmieniały się również właściwości spektropolarymetryczne hormonu zredukowanego, który podobnie jak natywny zawierał 55% formy spiralnej. Hormon zredukowany łatwiej jednak uległ trawieniu trypsyną. Zwiększona podatność hormonu zredukowanego na proteolizę wynika zapewne ze zmian konformacyjnych rozluźniających strukturę białka, ale nie dających się jednak wykryć metodami fizycznymi. W wyniku reoksydacji zredukowanych wiązań dwusiarczkowych można było wtórnie otrzymać cząsteczkę hormonu o tej samej masie cząsteczkowej i właściwościach spektralnych co hormon natywny. Hormon natywny i reoksydowany różniły się podatnością na trawienie trypsyną, która szybciej hydrolizowała cząsteczkę reoksydowaną (60).

Z powyższych danych wynika, że zerwanie mostków dwusiarczkowych w hormonie wzrostu nie powodowało uchwytnych zmian we właściwościach fizycznych i strukturalnych tego białka. Można przeto uważać, że wiązania S—S nie stanowią głównej siły stabilizującej łańcuch polipeptydowy cząsteczki hormonu, a są jedynie dodatkowym czynnikiem usztywniającym jej konformację. Za wnioskiem tym przemawia również zwiększona podatność hormonu zredukowanego na tryptyczne trawienie.

Nitrowanie reszt tyrozyny w ludzkim hormonie wzrostu wykazało, że w środowisku wodnym znitrowaniu ulega tylko 6 tyrozyn, a pozostałe 2 nitrują się dopiero w 5M roztworze chlorowodoru guanidyny. Można przypuszczać, że tyrozyny nie ulegające nitrowaniu są identyczne z tyrozynami nie dającymi się wykryć przez potencjometryczne miareczkowanie w środowisku wodnym (61).

Modyfikacji chemicznej poddano również tryptofan, który odgrywa istotną rolę w stabilizowaniu struktury białek, poprzez hydrofobową interakcję z niepolarnymi resztami aminokwasów. Zalkilowanie 2-nitrofenylosulfochlorkiem (NPS-Cl) jedynej reszty tryptofanu, jaką posiada ludzki hormon wzrostu nie wywołało żadnych zmian w strukturze tego białka. Ale wprowadzenie do cząsteczki 2-hydroksy-5-nitrobenzylbromku (HNB-Br) doprowadzało do nieodwracalnej denaturacji hormonu, który na skutek tego stawał się podatniejszy na trawienie enzymami proteolitycznymi. Fakt, że alkilacja tryptofanu przebiegała ilościowo dopiero w

środoisku 50% kwasu octowego, a jonizacja chromoforowych pochodnych była prawidłowa w 6M chlorowodorku guanidyny świadczy o tym, iż reszta tryptofanu jest głęboko ukryta wewnątrz cząsteczki (62).

### III. Struktura, a aktywność biologiczna hormonu wzrostu

Omówione w poprzednim rozdziale badania nad chemicznie zmodyfikowaną cząsteczką hormonu wzrostu miały również na celu znalezienie zależności pomiędzy budową, a aktywnością wzrostową i laktogenną tego białka. Aktywność biologiczna hormonu jest bardzo stabilna i nie znika po traktowaniu go mocznikiem, jonami, metalami ciężkimi, jak również pod wpływem ogrzewania. Ogrzewanie hormonu przez 15 minut w 100°C lub przetrzymywanie go przez kilka godzin w 0,1N NaOH lub 0,01N HCl nie prowadziło do utraty czynności biologicznej (63). Nawet po 12-godzinnym ogrzewaniu w 2M kwasie octowym lub 3-godzinnym w 0,1N NaOH w temperaturze 60°C, preparaty hormonu wzrostu zachowywały, odpowiednio, 80 i 100% aktywności biologicznej (64). Immunoreaktywność hormonu wzrostu badana metodą podwójnej dyfuzji w żelu agarowym i testem hemaglutynacji biernej obniżała się dopiero po 0,5—1 godzinnym ogrzewaniu w 100°C, w środowisku alkalicznym (65). Aktywność biologiczna i immunologiczna pozostawała niezmienną po odszczepieniu skrajnych aminokwasów, po odszczepieniu z cząsteczki — chymotrypsyną i trypsyną — około 25%, a pepsyną do 45% aminokwasów. Dopiero utlenianie hormonu kwasem nadmanganowym doprowadziło do całkowitej utraty aktywności biologicznej i obniżenia aktywności serologicznej (66—68).

Zachowanie aktywności biologicznej przez hormon traktowany kwasem lub ługiem wiąże się zapewne ze zdolnością tego białka do utrzymania struktury spiralnej w skrajnych wartościach pH. Dezorganizacja tej struktury, zachodząca pod wpływem wysokich stężeń mocznika, prawdopodobnie nie powoduje nieodwracalnych zmian konformacyjnych prowadzących do utraty czynności biologicznej.

Zerwanie wiązań dwusiarczkowych w ludzkim hormonie wzrostu i alkilacja grup sulfhydrylowych jodoacetamidem nie zmieniały jego aktywności wzrostowej ani laktogennej, ale alkilacja kwasem jodooctowym prowadziła do całkowitego zaniku czynności wzrostowej (58). Również hormon reoksydowany nie wykazywał różnic w działaniu wzrostowym i laktogennym w porównaniu z natywnym, zatem wiązania dwusiarczkowe nie są odpowiedzialne za funkcje biologiczne tego hormonu.

Zmiany w czynności wzrostowej i laktogennej hormonu stwierdzono jednak w przypadkach chemicznej modyfikacji cząsteczki, takich jak alkilacja tryptofanu, nitrowanie reszt tyrozynowych, acetylacja grup hydroksylowych, aminowych i imidazolowych, czy estryfikacja grup karboksylowych.



Zalkilowanie reszty tryptofanu 2-nitrofenylosulfochlorkiem (NPS-Cl) nie obniżało aktywności wzrostowej hormonu w przeciwieństwie do podstawnika 2-hydroksy-5-nitrobenzylbromku (HNB-Br), który ją znacznie modyfikował. Po wprowadzeniu do cząsteczki 1 mola HNB aktywność wzrostowa hormonu obniżała się 3-krotnie, a po podstawieniu 2 moli zanikała całkowicie. Ta różnica w działaniu obydwu podstawników na aktywność wzrostową hormonu jest zapewne odzwierciedleniem zmian konformacyjnych w cząsteczce (nieodwracalna krzywa miareczkowania z zawyżoną wartością  $pK$  i zwiększona podatność na trawienie trypsyną), występujących po alkilacji tryptofanu odczynnikami HNB-Br. Modyfikacja reszty tryptofanu, niezależnie już od rodzaju wprowadzonego odczynnika, prowadziła do całkowitego zaniku aktywności laktogennej hormonu. Być może w białku tym istnieją dwa oddzielne centra aktywne — wzrostowe i laktogenne, przy czym w przypadku tego ostatniego istotną rolę może odgrywać tryptofan.

Znitrowanie 6 spośród 8 obecnych w ludzkim hormonie wzrostu reszt tyrozynowych nie powodowało znamiennego obniżenia aktywności wzrostowej ani laktotropowej w porównaniu z białkiem natywnym. Znitrowanie jednak pozostałych 2 tyrozyn dostępnych dopiero w 5M roztworze chlowodorku guanidyny, a więc ukrytych wewnątrz cząsteczki prowadziło do zaniku obydwu aktywności — wzrostowej i laktogennej, co może sugerować, że tyrozyny te odgrywają rolę w czynności biologicznej hormonu.

Aktywność wzrostowa wołowego hormonu zmieniała się także po acetylowaniu go bezwodnikiem octowym (69). Wprowadzenie 9 grup acetylowych na mol białka nie zmieniało jego aktywności wzrostowej w porównaniu z natywnym hormonem. Natomiast całkowita acetylacja cząsteczki, czyli wprowadzenie 18 grup acetylowych, niszczyła aktywność wzrostową, przy czym hormon acetylowany hamował działanie hormonu natywnego obniżając jego czynność o około 30%. Deacetylacja hormonu za pomocą chlowodorku hydroksyloaminy przywracała mu pełną aktywność biologiczną. Całkowita ekstryfikacja grup karboksylowych niszczyła również aktywność tego białka. Wprowadzenie 6 grup metylowych na mol hormonu nie obniżało jeszcze jego aktywności wzrostowej, obecność 8 grup redukowała aktywność do 50%, przy 15 zestryfikowanych grupach pozostawała już tylko śladowa aktywność, a przy 22 i więcej zanikało działanie biologiczne hormonu (70).

Porównanie przez Chillemi i wsp. (71) I rzędowej struktury ludzkiego hormonu wzrostu i owczej prolaktyny wykazało, że istnieje duży stopień homologii w sekwencji aminokwasowej obydwu tych hormonów. Odcinkiem różnicującym sekwencyjnie te hormony są reszty 94—158 w ludzkim hormonie wzrostu i 98—167 w prolaktynie. Ponieważ prolaktyna posiada tylko aktywność laktogenną, a hormon wzrostu laktogenną i wzrostową sądzono, że właśnie obszar aminokwasowy, którym różnią się te dwa hormony może być odpowiedzialny za aktywność wzrostową.

Rzeczywiście syntetyczne peptydy odpowiadające sekwencji aminokwasowej fragmentów 87—123 i 124—155 w ludzkim hormonie wzrostu wykazywały aktywność biologiczną w *tibia test*. Wydaje się jednak, że należy zachować daleko idącą ostrożność w interpretowaniu wyników oznaczeń aktywności biologicznej syntetycznych peptydów i produktów chemicznego rozszczepienia cząsteczki stwierdzono bowiem, że związki chemiczne używane do tych celów reagują niespecyficznie w *tibia test* (71).

Mimo szerokiego zakresu badań nad cząsteczką hormonu nie udało się znaleźć bezpośrednio związku pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną tego białka. Możliwe, że w łańcuchu polipeptydowym hormonu istnieje określona sekwencja aminokwasowa decydująca o jego aktywności biologicznej, a chemiczna modyfikacja aminokwasów, w tym lub sąsiadującym odcinku łańcucha, prowadzi do jej zaniku. Na pewno jednak o aktywności wzrostowej nie decydują wiązania dwusiarczkowe i reszta tryptofanu, a do jej przejawiania się nie jest konieczna obecność całej cząsteczki złożonej ze 191 reszt aminokwasowych.

#### IV. Działanie metaboliczne, wzrostowe i laktogenne hormonu wzrostu

Bezpośrednim skutkiem wprowadzenia hormonu wzrostu do organizmu jest retencja azotu, potasu, sodu, wapnia jak również fosforu i wody. Ważne znaczenie ma jego kataboliczny wpływ na gospodarkę tłuszczową organizmu. Poprzez aktywację wewnątrzkomórkowej lipazy stymuluje on wydzielanie wolnych kwasów tłuszczowych, których ilość we krwi zwiększa się kilkakrotnie po podaniu hormonu. Kwasy te po uprzedniej fosforylacji w komórkach wątroby, są zużywane do energetycznego utrzymywania czynności komórek, dla celów budulcowych — głównie błon komórkowych i syntezy sterydów. Działanie wzrostowe i anaboliczne hormonu wzrostu odbywa się za pośrednictwem krążącej we krwi somatomedyny (*sulphation factor*). Jest to peptyd o masie cząsteczkowej około 4 000, który pod wpływem hormonu wzrostu uwalniany jest z wątroby, a prawdopodobnie i nerki. Za jego pośrednictwem hormon wzrostu stymuluje inkorporację siarczanu do siarczanu chondroityny w chrząstkach, tymidyny do DNA, urydyny do RNA, oraz przemianę proliny w hydroksyprolinę kolagenu. Hormon wzrostu stymuluje również syntezę białek i glikoproteidów w chrząstkach oraz włączanie aminokwasów do białek tkanek mięśniowych (73—75). Konsekwencją działania hormonu wzrostu jest wzmożona synteza kwasów nukleinowych oraz białek w skórze, mięśniach i kościach, w wyniku czego organizm rozwija się prawidłowo. Znaczenie tego hormonu w procesach rozwoju osobniczego zmienia się jednak w różnych okresach życia. Stwierdzono, że rozwój zarodków u hipofizektomizowanych szczurów przebiega normalnie. Również noworodki z usuniętą przysadką rozwijają się prawidłowo do 28 dnia życia i dopiero po



tym okresie następuje gwałtowne zahamowanie wzrostu (1). Obserwacje te, jak również wyniki badań histochemicznych, które wykazały, że w komórkach wydzielniczych przysadek ludzkich hormon wzrostu pojawia się dopiero w 12 tygodniu życia, pozwalają przypuszczać, iż w okresie płodowym i wczesnym stadium życia wzrost jest autonomiczny i niezależny od obecności hormonu. Decydujący wpływ na wzrost ma on w okresie młodocianym, a zwłaszcza dojrzewania.

Aktywność laktotropowa hormonu wzrostu mierzona makroskopowymi zmianami w wolach gołębi wynosi 2—5j.mn./mg białka. Prolaktynę jako odrębne białko dawało się wyizolować z przysadek wszystkich ssaków z wyjątkiem naczelných. Dlatego przez długi okres czasu uważano, że prolaktyna ludzka jako odrębne białko nie istnieje, zaś ludzki hormon wzrostu spełnia dwie funkcje — wzrostową i laktogenną. W ostatnich latach wyizolowano jednak z przysadek ludzkich prolaktynę o wysokiej aktywności właściwej — 20—30j.mn./mg białka i bardzo niskiej czynności wzrostowej, rzędu 0,3j.mn./mg białka (76—78). Jednocześnie za pomocą badań histochemicznych wykazano, że przysadki małp i ludzi zawierają 2 typy komórek kwasochłonnych: oranżo- i karminochłonne. W przysadkach pacjentek będących w okresie przed i poporodowym ilość komórek karminochłonnych znacznie wzrasta, nie reagują one jednak z surowicą przeciwko hormonowi wzrostu, podczas gdy oranżochłonne wiążą ją swoiście. Świadczy to, że prolaktyna i hormon wzrostu wytwarzane są przez różne rodzaje komórek przysadki (79). Również poziom prolaktyny określany stopniem wydzielania mleka w hodowli narządowej gruczołu piersiowego myszy, (czułość metody 5ng/ml) w surowicach kobiet karmiących i z mlekotokiem okazał się bardzo wysoki, sięgając do 130 ng/ml, przy jednocześnie niskim poziomie hormonu wzrostu, rzędu 0,3—5ng/ml (80).

Wyniki powyższych badań pozwalają bezspornie stwierdzić, że przysadka naczelných oprócz hormonu wzrostu posiadającego aktywność wzrostową i laktotropową wytwarza również prolaktynę odpowiedzialną za działanie laktogenne.

## V. Aspekty fizjopatologiczne ludzkiego hormonu wzrostu

W stanach patologicznych wywołanych zaburzeniami w wydzielaniu hormonu wzrostu poprzez przysadkę mózgową, zarówno z powodu jej niedoczynności jak i nadczynności, bardzo ważnym czynnikiem diagnostycznym jest określenie poziomu tego hormonu w surowicy. Stężenie hormonu wzrostu w płynach ustrojowych jest bardzo niskie i nie daje się oznaczyć metodami biologicznymi. Próby jego określenia za pomocą precypitacji ilościowej, testu zahamowania hemaglutynacji lub wiązania dopełniacza nie dały pozytywnych rezultatów ze względu na stosunkowo małą swoistość i czułość. Przełomowym momentem dla endokrynologii klinicznej

stało się wprowadzenie radioimmunologicznych metod oznaczania hormonów, po opracowaniu przez Greenwoda i Huntera (81) metody znakowania hormonu wzrostu jodem radioaktywnym. Znakowany jodem hormon stanowi w reakcjach radioimmunologicznych swoisty wskaźnik o wysokiej czułości, rzędu  $10^{-10}$ g.

Stosowany do oznaczania hormonu wzrostu test radioimmunologiczny jest oparty na ilościowym wiązaniu antygeny (hormon znakowany i nieznakowany) ze swoistym przeciwciałem (surowica przeciwko hormonowi wzrostu). Przy stałej objętości surowicy (rozcieńczonej zwykle kilkadziesiąt do kilkuset tysięcy razy) i hormonu znakowanego (0,1—1ng), ilość wiążącego się w kompleks hormonu znakowanego, będzie zależała od stężenia hormonu nieznakowanego obecnego w mieszaninie inkubacyjnej. Zależność ta przy zastosowaniu logarytmicznej skali stężeń jest liniowa, co po zmierzeniu radioaktywności zawartej w kompleksie pozwala z krzywej kalibracyjnej oznaczyć ilość hormonu w analizowanej próbce. W literaturze opisano szereg metod radioimmunologicznego oznaczania hormonu, które różnią się jedynie techniką oddzielania hormonu wolnego od związanego z przeciwciałem. Do tego celu stosuje się chromatoelektroforezę (82), żywice jonowymienne (93), węgiel aktywowany (84), lub talk (85). Utworzony kompleks może też być wytrącany kwasem trójchlorooctowym, po uprzednim strawieniu wolnego hormonu ficyną aktywowaną zredukowanym glutationem (86). Najczęściej jednak stosowana jest metoda podwójnych przeciwciał, polegająca na wytrącaniu kompleksu za pomocą drugiego przeciwciała skierowanego przeciwko przeciwciału związanemu w kompleks (87—91). W ostatnich latach wprowadzone zostały metody fazy stałej; hormon z badanego roztworu wychwytywany jest przez przeciwciała kowalencyjnie związane z nierozpuszczalnymi nośnikami jak Sephadex, czy polistyren (92—94).

Wprowadzenie metod radioimmunologicznych, pozwalających z dużą czułością oznaczać hormon wzrostu we krwi, dało możliwość wykrywania ilościowych zmian w poziomie tego hormonu w płazmie ludzkiej, w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych. Poziom hormonu wzrostu oznaczony w płazmie ludzi zdrowych, będących w stanie spoczynku, jest niski i wynosi 0—10ng/ml. Ulega on jednak znacznym wahaniom pod wpływem bodźców fizycznych, metabolicznych i psychogennych. Wydzielanie hormonu wzrostu do krwioobiegu odbywa się rzutami kierowanymi przez niepoznany jeszcze system regulacyjny. W czasie snu wydzielanie hormonu odbywa się zazwyczaj około 90 minuty od chwili zaśnięcia, ale może występować również w okresach późniejszych (95). Czynnikiem stymulującymi wydzielanie hormonu wzrostu mogą być: stress psychiczny, wysiłek fizyczny, przedłużone głodzenie, ostry uraz, a także podanie argininy lub hormonów takich jak: glukagon, wazopresyna czy insulina (96). U ludzi zdrowych pod wpływem tych czynników, a zwłaszcza w następstwie hipoglikemii poadulinowej dochodzi do zwiększonego wydzielania przez



przysadkę hormonu wzrostu i wtedy poziom jego we krwi podnosi się kilkakrotnie, mogąc osiągać wartość do 100ng/ml.

W przypadkach karłowatości przysadkowej poziom hormonu wzrostu we krwi jest podobny do stwierdzonego u ludzi zdrowych ale pod wpływem bodźców nie dochodzi do wzmożonego wydzielania hormonu. To dynamiczne różnicowanie w stopniu wydzielania hormonu wzrostu do krwioobiegu ludzi zdrowych i osobników z hipopituitaryzmem (zwłaszcza w stanach hipoglikemii poinśulinowej) zostało wykorzystane do opracowania testów, mających duże znaczenie kliniczne w diagnozowaniu niedoczynności przysadki mózgowej.

W akromegalii i gigantyzmie przysadkowym występuje nadmierne wydzielanie hormonu spowodowane przez gruczolak kwasochłonny przysadki lub przerost jej komórek wydzielniczych. W tych przypadkach poziom hormonu wzrostu w surowicy jest bardzo wysoki i może dochodzić do 1000ng/ml. Dzięki badaniom radioimmunologicznym taki stan patologiczny można nie tylko łatwo wykryć ale również śledzić wyniki postępowania leczniczego. Ze względu na pobudzające działanie wzrostowe i metaboliczne ludzki hormon wzrostu znalazł zastosowanie w leczeniu zaburzeń rozwojowych wywołanych częściową lub całkowitą niedomogą przedniego płata przysadki. Pozytywne wyniki leczenia karłowatości przysadkowej u ludzi zostały opisane przez wielu autorów (73, 82, 97—99). Ludzki hormon wzrostu do chwili obecnej jest lekiem niezastąpionym w przypadkach karłowatości przysadkowej. Podawany pacjentom w dawkach 5—10mg tygodniowo, powoduje normalny lub przyspieszony przyrost długości ciała, wynoszący od kilku do kilkunastu centymetrów rocznie. Największe przyrosty obserwowane są w pierwszym roku zastosowania kuracji, w następnych latach tempo wzrostu zmniejsza się, niemniej jednak w sposób ciągły jest utrzymywane, podczas gdy u pacjentów nieleczonych obserwuje się prawie całkowite zahamowanie wzrostu. Efektywność wyników leczenia uzależniona jest od dojrzałości układu kostnego i nie udaje się pobudzić wzrostu jeżeli nasady kostne są już zamknięte. Zdaniem niektórych autorów mniejsze tempo wzrostu obserwowane w miarę trwania kuracji jest wynikiem powstawania przeciwciał, które mogą blokować efekty terapeutyczne. Jakkolwiek ludzki hormon wzrostu, jako białko gatunkowo swoiste, nie powinien dawać reakcji immunologicznej, to jednak liczni autorzy w surowicach pacjentów leczonych tym hormonem stwierdzili obecność przeciwciał, które jednak nie w każdym przypadku prowadziły do zahamowania wzrostu (100—103). Obserwowane zjawisko antygenności hormonu można tłumaczyć uszkodzeniem hormonu w czasie preparatyki, odmiennością hormonu krążącego we krwi od hormonu zawartego w przysadce, bądź polimorfizmem różnicującym cechy antygenowe tego białka.

*Artykuł otrzymano 6.2.1974, po rewizji autorskiej przyjęto 17.12.1974.*

## PIŚMIENNICTWO

1. Schally A. V., Yoshihiko Baba, Nair R. M. G., (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 6647—6650.
2. Jenkin P. M., (1970), *Control of Growth and Metamorphosis, Animal Hormones (cz. II)* Pergamon Press, Oxford, New York.
3. Cambiaso C. L., Dellacha J. M., Santomé J. A., Paladini A. C., (1971), *FEBS Letters* **12**, 236—238.
4. Papkoff H., Li C. H., Wan-Kyng Lin, (1962), *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 216—225.
5. Dellacha J. M., Sonenberg M., (1964), *J. Biol. Chem.* **239**, 1515—1520.
6. Reisfield R. A., Lewis U. J., Brink N. G., Steelman S. L., (1962), *Endocrinology*, **71**, 559—563.
7. Wilhelmi L., (1961), *Canad. J. Biochem. Biophys.* **39**, 1659—1665.
8. Roos P., Fevold H. R., Gemzel C. A., (1963), *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 525—531.
9. Raben M. S., (1958), *Recent Progress in Hormone Research*, red. G. Pinkus, t. 15, str. 71—115, Academic Press, New York, London.
10. Papkoff H., Li C. H., (1962), w *Methods in Hormone Research*, red. R. I. Dorfman t. II, str. 683—692, Academic Press, New York, London.
11. Hunter W. M., (1965), *Biochem. J.* **97**, 199—208.
12. Saxena B. B., Henneman P. H., (1966), *Biochem. J.* **100**, 711—717.
13. Reisfield R. A., Hallows B. C., Williams D. E., Brink N. G., Stelman S. L., (1963), *Nature*, **197**, 1206—1207.
14. Dellacha J. M., Enro M. A., Santomé J. A., Paladini A. C. (1970), *Europ. J. Biochem.* **12**, 289—295.
15. Peckham W. D., (1967), *J. Biol. Chem.* **242**, 190—196.
16. Swislocki N. J., Sonenberg N., Kikutani M., (1971), *Biochem. J.* **122**, 633—640.
17. Kaplan S. L., Grumbach M. M., (1962), *Nature*, **196**, 336—338.
18. Laron Z. L., Assa S., (1962), *Nature*, **194**, 491—492.
19. Barret R. J., Friesen H., Astwood E. B., (1962), *J. Biol. Chem.* **237**, 432—439.
20. Free C. A., Sonenberg N., (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 5076—5082.
21. Reusser F., (1964), *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 410—414.
22. Lewis U. J., (1962), *J. Biol. Chem.* **237**, 3141—3145.
23. Lewis U. J., (1963), *J. Biol. Chem.* **238**, 3330—3335.
24. Chrumbach A., Yadley R. A., Ben-David M., Rodbard D., (1973), *Endocrinology* **93**, 848—857.
25. Yadley R. A., Chrumbach A., (1973), *Endocrinology* **93**, 858—865.
26. Yadley R. A., Rodbard D., Chrumbach A., (1973), *Endocrinology*, **93**, 866—873.
27. Lewis U. J., Cheever W. C., Hopkins W. C., (1970), *Biochim. Biophys. Acta* **214**, 498—508.
28. Dellacha J. M., Enro M. A., Paladini A. C., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **168**, 95—105.
29. Dixon J. S., Li C. H., (1966), *Science*, **154**, 785—786.
30. Kjeda J. M., Kolli E. A., Ryszka F. J., Sinicyna A. L., Chochołow A. S., (1968), *Biochimija*, **33**, 852—860.
31. Fonss-Bech P., (1966), *Biochem. J.*, **101**, 43C—44C.
32. Lin Ma., Brovetto-Cruz J., Li C. H., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 444—450.



33. Brovetto-Cruz J., Li C. H., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4695—4701.
34. Edelhoch H., Condliffe P. G., Lippoldt R. E., Burger H. G., (1966), *J. Biol., Chem.* **241**, 5205—5212.
35. Andrews P., (1966), *Nature*, **209**, 155—157.
36. Wallis M., Dixon H. B. F., (1966), *Biochem. J.* **100**, 593—600.
37. Dellacha J. M., Enro M. A., Faiferman J., (1966), *Experientia* **209**, 16—17.
38. Dellacha J. M., Santomé J. A., (1968), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **148**, 313—318.
39. Conde R. D., Paladini A. C., Santomé J. A., Dellacha J. M., (1973), *Eur. J. Biochem.* **32**, 563—568.
40. Li C. H., (1972), *Proc. Am. Phil. Soc.* **116**, 365—382.
41. Santomé J. A., Dellacha J. M., Paladini A. C., Wolfenstein C. E. M., Pena C., Poskus E., Daurat S. T., Biscoglio M. J., De Sese Z. M. M., De Sengüesa A. V. F., (1971), *FEBS Letters*, **16**, 198—200.
42. Graf L., Li C. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 168—176.
43. Li C. H., Gordon D., Knerr J., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* **156**, 493—508.
44. Butt W. R., (1967), *Hormone Chemistry*, str. 76—90, D. Van Nostrand Company LTD London.
45. Li C. H., Straman B., (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 175—176.
46. Lin W. K., Dixon S. J., Li C. H., (1964), *Biochim. Biophys. Acta* **93**, 428—429.
47. Li C. H., Lin W. K., Dixon S. J., (1966), *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 2050—2051.
48. Li C. H., Dixon S. J., Chung D., (1968), *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 272—274.
49. Li C. H., Dixon S. J., Lin W. K., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* **133**, 70—91.
50. Niall H. D., Hogan M. L., Sauer R., Rosenblum L. Y., Greenwood F. C., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 866—869.
51. Niall H. D., (1971), *Nature, New Biology*, **231**, 90—91.
52. Li C. H., Dixon S. J., (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* **146**, 233—236.
53. Bewley T. A., Li C. H., (1967), *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 201—207.
54. Bewley T. A., Li C. H., (1972), *Biochemistry*, **11**, 884—888.
55. Edelhoch H., Condliffe P. G., Lippoldt R. G., Burger H. G., (1966), *J. Biol. Chem.* **241**, 5205—5212.
56. Aloy S. M., Edelhoch H., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 830—836.
57. Aloy S. M., Edelhoch H., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 1146—1152.
58. Bewley T. A., Bovertto-Cruz Y., Li C. H., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4701—4708.
59. Dixon S. J., Li C. H., (1966), *Science*, **154**, 785—786.
60. Bewley T. A., Li C. H., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* **138**, 338—346.
61. Lin M., Bovertto-Cruz J., Li C. H., (1971), *Biochim. Biophys. Acta* **229**, 444—450.
62. Bovertto-Cruz J., Li C. H., (1969), *Biochemistry*, **8**, 4695—4701.
63. Dixon J. S., Li C. H., (1962), *J. Gen. Phys.*, **45**, 169—171.
64. Li C. H., Papkoff H., (1953), *J. Biol. Chem.* **204**, 391—402.
65. Laron Z., Yed-Lehach A., Assa S., Kowadlo-Silbergeld A., (1964), *Acta Endocrinol.* **46**, 465—472.
66. Trenkle A., Li C. H., Sadri K. K., Roberdson H., (1962), *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 288—293.
67. Papkoff H., Li C. H., (1964), *Metabolism*, **13**, 1082—1092.

68. Sinicyna A. L., Keba J. M., Isiczenko N. A., Bogaczewa J. D., (1965), *Probl. Endokr. Gorm.* **11**, 56—58.
69. Oikawa A., Dellacha J. M., Sonenberg M., (1967), *Biochem J.*, **104**, 947—952.
70. Liberti J. P., Alfano J., Sonenberg M., (1969), *Biochim. Biophys. Acta* **181**, 176—183.
71. Chillemi F., Aiello A., Pecile A., (1972), *Nature, New Biology*, **238**, 243—245.
72. Pena C., Hocht J. P., Santomé J. A., Dellacha J. M., Paladini A. C., (1972), *FEBS Letters*, **27**, 338—340.
73. Tanner J. M., (1972), *Nature* **237**, 433—439.
74. Daughaday W. H., (1972), *Nature* **235**, 107.
75. Knut Uthne, (1973), *Acta Endocrinol. Suppl.* **175**, 1—35.
76. Lewis U. J., Singh R. N. P., Seavey B. K., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1169—1176.
77. Hwang P., Guyda H., Friesen H., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 1955—1958.
78. Guyda H. J., Friesen H. G., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 1068—1074.
79. Herbert D. C., Hayashida T., (1970), *Science* **169**, 378—379.
80. Frantz A. G., Kleinberg D. L., (1970), *Science* **170**, 745—747.
81. Greenwood F. C., Hunter W. M., (1963), *Biochem. J.* **89**, 114—123.
82. Westphal O., (1968), *Acta Paediatrica Scandinavica*, Suppl. **182**, 1—81.
83. Franchimont P., (1965), *Ann. Endocr.* **26**, 627—631.
84. Kam-Seng Lau, Gottlieb C. W., Herbert V., (1966), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **123**, 126—131.
85. Rosselin G., Assan R., Yalow R. S., Berson S. A., (1966), *Science* **212**, 355—357.
86. Mitchell M. L., Cellins S., Byron J., (1969), *J. Clin. Endocr. Metabolism* **29**, 257—264.
87. Cerasi E., Della Casa L., Luft R., Roovte A., (1966), *Acta Endocr.* **53**, 101—119.
88. Garcia I. F., Linoot J. A., Manougani E., Born J. L., Lewerence J. H., (1967), *J. Clin. Endocr., Metabolism*, **27**, 1395—1402.
89. Lambert A. E., Luyck A., Zehnd G. R., (1967), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **126**, 405—409.
90. Melani F., Groschel-Stewart U., Lawenci J., (1968), *Acta Endocr.* **57**, 549—556.
91. Schiller B., Grodecka B., Kasperska A., Lenartowska I., (1971), *Endocr. Pol.* **22**, 1—10.
92. Wide L., Porath J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 257—260.
93. Catt K., Niall H. D., Treager G. W., (1967), *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 820—830.
94. Catt K., Treager G. W., (1967), *Science*, **158**, 1570—1571.
95. Sassin J. F., Parker D. C., Mace J. W., Gotlin J. W., Jonson L. C., Rossman I. G., (1969), *Science*, **165**, 513—515.
96. Brown G. M., Reichlin S., (1972), *Psychosomatic Medicine* **34**, 45—61.
97. Rosenbloom A. L., (1966), *J. Am. Med. Ass.* **198**, 364—368.
98. Prader A., Zachmann M., Poley I. R., Illig R., Szey I., (1967) *Helv. Paediatr. Acta* **22**, 423—438.
99. Aceto T., Frasier S. D., Hayles A. B., Meyer-Bahlburg H. F. L., Parker M. L., Munschauer R., Chiro G., (1972), *J. Clin. Endocr. Metabolism* **35**, 483—496.



100. Frieser S. D., Smith F. G., (1966), *Am. J. Dis. Child* 112, 383—395.
101. Illig R., (1970), *J. Clin. Endocr.* 31, 679—685.
102. Chalkley R., Tanner I. M., (1971), *Arch. Dis. Child* 46, 160—167.
103. Kasperska A., Schiller B., Grodecka B., Lenartowska I., Zakrzewski K., (1972), *Endocr. Pol.* 23, 57—73.





## Z ŻYCIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

### XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

XII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, zorganizowany przez Oddział Warszawski P.T.Bioch., odbył się w Warszawie w dniach 4—7 września 1974.

Obrady Zjazdu odbywały się na terenie Uniwersytetu Warszawskiego, udostępnionym przez J.M. Rektora U.W. Prof. dr Zygmunta Rybickiego.

W Zjeździe uczestniczyło ponad 500 osób z różnych ośrodków krajowych oraz zaproszeni przez Komitet Organizacyjny: Prof. dr. E. M. Bradbury (*Dept. Physics Portsmouth Polytechnic, Wielka Brytania*) oraz Dr G. Goodwin (*Chester Beathys Res. Inst. London, Wielka Brytania*). W obradach również wziął udział Prof. dr A. Lis, (*Nucl. Acid Res. Lab., Orgeon Portland, USA*).

Otwarcia Zjazdu dokonała Przewodnicząca Komitetu Naukowo-Organizacyjnego XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Dr Izabella Namysłowska, witając członków Komitetu Honorowego, którzy zaszczylicili swą obecnością uroczystość otwarcia a mianowicie: Zastępcę Przewodniczącego Rady Państwa i Przewodniczącego Ogólnopolskiego Komitetu Frontu Jedności Narodu Prof. dr Janusza Groszkowskiego, Prezesa Polskiej Akademii Nauk prof. dr Włodzimierza Trzebiatowskiego i Sekretarza Naukowego Wydziału V PAN Prof. dr Bogdana Dobrzańskiego. W przemówieniu powitalnym zostały podkreślone wielowiekowe tradycje Uniwersytetu Warszawskiego jako ośrodka postępowej myśli naukowej. Następnie Dr Namysłowska przekazała przewodniczenie Uroczystej Sesji Otwarcia Prof. dr Tomaszowi Borkowskiemu — Prezesowi Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W ramach sesji otwarcia referat inauguracyjny, poświęcony historii polskiej biochemii, wygłosił Członek Honorowy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Prof. dr Bronisław Filipowicz. Mówca w swym pięknym wystąpieniu uzmysłowił wielki udział polskiej myśli naukowej w rozwoju światowej biochemii. Pełny tekst wykładu inauguracyjnego został wydrukowany w 4-tym numerze *Postępów Biochemii* w roku 1974.

Dalsze obrady Zjazdu toczyły się w ramach dwóch sympozjów i czterech sekcji.

Sympozjum o białkach chromatyny zawdzięcza swój zakres i poziom inicjatywie i ogromnemu wkładowi pracy Przewodniczącego Sympozjum Doc. dr Kazimierza Toczko (Warszawa), któremu stan zdrowia niestety nie pozwolił na osobiste prowadzenie obrad. Współprzewodniczącą Sympozjum była Prof. dr Wanda Mejbbaum-Katzenellenbogen (Wrocław).

Organizatorem Sympozjum Kwasy Nukleinowe był Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Dyrektor Instytutu Prof. dr K. L. Wierchowski). Sympozjum połączone było z sesją sprawozdawczą grupy tematycznej 09314 — Podstawy molekularnej genetyki (Problem węzłowy 0931). Sprawna organizacja i przebieg zarówno Sympozjum jak i sesji sprawozdawczej, były wynikiem dużego wkładu pracy i energii Doc. dr D. Hulanickiej i Dr W. Jachymczyka.

W ramach sympozjum białka chromatyny ogłoszono następujące referaty:

The role of histones in chromosome structure and control of mitosis — E. M. Bradbury

Studies on nonhistone proteins of chromatin — G. Goodwin

Białka niehistonowe chromatyny — L. Kłyszajko-Stefanowicz (Łódź)

Transkrypcja chromatyny komórek zwierzęcych — M. Chorąży, M. Grabowska,

Z. Krawczyk (Gliwice)

Biosynteza i metabolizm histonów — H. Panusz, Z. Milewska, J. Bartkowiak,

G. Graczyk, J. Dobrzelewski (Łódź)

Oczyszczanie i własności proteazy chromatynowej — T. Kurecki (Warszawa)

Cytochemia jądra i jąderka — A. Vorbrodt (Gliwice)

Struktura jądra metafazalnego — L. Cieciora (Łódź)

W czasie sympozjum Kwasy Nukleinowe zebrani wysłuchali następujących referatów:

Tautomeria i struktura elektronowa puryn i pirymidyn — J. S. Kwiatkowski (Toruń)

Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów — S. Szala (Gliwice)

Enzymy uczestniczące w metabolizmie roślinnych kwasów rybonukleinowych — J. Pawełekiewicz (Poznań)

Hormonalna regulacja metabolizmu kwasów nukleinowych w komórce roślinnej — K. Kleczkowski (Warszawa)

Rola struktury RNA bakteriofaga  $f_2$  w regulacji syntezy białek fagowych — P. Szafranski (Warszawa)

Ponadto, w ramach obu sympozjów, oraz w czasie obrad w sekcjach oraz Sesji Sprawozdawczej wygłoszono prawie 300 komunikatów. Miarą aktualności referatów sympozjalnych i komunikatów była liczna frekwencja i ożywione dyskusje, toczone się jeszcze w kulturalnych.

Dyskusje naukowe a także towarzyskie przeniosły się również na teren spotkania towarzyskiego. Zorganizowane w znanej „Stodole” z dużym wyczuciem i zaangażowaniem osobistym przez Doc. dr Leszka Tomaszewskiego, spotkanie miało charakter nieco odmienny niż dotychczasowe, bowiem połączone było ze znakomitymi występami zespołów studenckich.

Wielkim zainteresowaniem cieszyła się również, zorganizowana w ramach Zjazdu, wystawa aparatury naukowej, w której uczestniczyły z firm krajowych: Unipan i Biomed a z firm zagranicznych: LKB (Szwecja), Beckman (USA), MSE (Anglia), Biorad (Anglia), Amicon (Holandia), Porc Ing. Comp. (Szwajcaria). Wystawcy zagraniczni wygłaszali odczyty na temat najnowszych zastosowań ostatnio wyprodukowanych modeli aparatury do prac naukowo-badawczych.

Zjazd miał również znaczenie organizacyjne dla Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, ponieważ w jego ramach odbyło się Walne Zebranie Członków Towarzystwa, połączone z wyborem nowych władz.

Program i przebieg XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego jeszcze raz potwierdziły celowość organizowania dorocznych Zjazdów Towarzystwa i ich roli dla postępu badań i ożywienia kontaktów osobistych, co jest bardzo ważne zwłaszcza dla młodej kadry naukowej.

*Izabella Namysłowska, Jerzy Witwicki*



## **Wyciąg z protokołu z VIII Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego**

VIII Walne Zebranie Członków PTBioch. odbyło się 5.9.1974 r. w Warszawie.

Zebranie otworzył Prezes PTBioch. Prof. dr Tomasz Borkowski. Przewodniczącym zebrania został wybrany jednogłośnie Prof. dr Przemysław Szafrąński. Stwierdził on prawomocność Zebrania Walnego, ponieważ zostało ogłoszone i zwołane w terminach przepisanych Statutem PTBioch. (§ 19 p. 1 i 2 oraz § 18). Ze względu na brak quorum w pierwszym terminie, Zebranie odbyło się w drugim terminie przy obecności 184 osób upoważnionych do głosowania. Przewodniczący przedstawił następnie porządek dzienny Walnego Zebrania, który został zaaprobowany.

Porządek dzienny Walnego Zebrania:

1. Otwarcie i zagajenie
2. Wybór Przewodniczącego i Sekretarza oraz powołanie protokółantów.
3. Wybór Komisji Wnioskowej oraz Komisji Mandatowo-Skrutacyjnej.
4. Przyjęcie protokołu z VII Walnego Zebrania z dnia 10.IX.1971 r.
5. Sprawozdanie z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w okresie VII kadencji od 10.IX.1971 do 5.IX.1974 r.
  - a) Sprawozdanie prezesa
  - b) Sprawozdanie skarbnika
  - c) Sprawozdanie Naczelnego Redaktora kwartalnika „Postępy Biochemii”.
6. Wnioski ustępującego Zarządu Głównego
  - a) Nadanie godności członka honorowego
7. Sprawozdanie Głównej Komisji Rewizyjnej.
8. Dyskusja nad sprawozdaniem.
9. Wybór Zarządu Głównego i Głównej Komisji Rewizyjnej
10. Wolne wnioski.

Na Sekretarza Zebrania powołano Dr Józefa Zajęca.

Po przyjęciu porządku dziennego oraz protokołu z VII Walnego Zebrania odbyły się Wybory Komisji Wniosków i Komisji Skrutacyjnej. Koordynatorem Komisji Wniosków został prof. dr Mariusz Żydowo. Komisję skrutacyjną powołano w następującym składzie: doc. dr Konstancja Raczyńska-Bojanowska (przewodnicząca), dr Barbara Grzelakowska-Sztabert, mgr Zbigniew Grzelczak, mgr Jacek Jankowski, dr Magdalena Jeleńska, mgr Danuta Korszyńska, mgr Małgorzata Landman, mgr Joanna Michalik, mgr Janina Saska, mgr Włodzimierz Walczak (członkowie).

Następnie prof. dr T. Borkowski złożył sprawozdanie z działalności Towarzystwa za okres VII Kadencji — 10.9.71 — 5.9.1974 (Patrz Sprawozdanie Prezesa str. 235).

Ustępujący Zarząd zgłosił wniosek o nadanie godności Członka Honorowego PTBioch. prof. dr Irenie Chmielewskiej. Laudację Czcigodnej Kandydatki przedstawił prof. dr T. Borkowski. W wyniku tajnego głosowania nadano godność Członka Honorowego PTBioch. prof. dr Irenie Chmielewskiej.

Następnie dr A. Mazanowska przedstawiła sprawozdanie Głównej Komisji Rewizyjnej i zgłosiła wniosek o udzielenie absolutorium ustępującemu Zarządowi. Po dyskusji, nad sprawozdaniem Zarządu wniosek przyjęto przez aklamację.

W dyskusji, która koncentrowała się wokół przyszłej działalności zjazdowej Towarzystwa głos zabierali: prof. dr Z. Zielińska, prof. dr P. Szafrąński, doc. dr J. Au-

gustyniak, prof. dr S. Niemierko, prof. dr M. Żydowo, prof. dr L. Działoszyński, dr J. Barańska, doc. dr M. A. Dancewicz, prof. dr S. Angielski, doc. dr E. Wolna, doc. dr J. Malec, prof. dr K. Zakrzewski. Wypowiedzi w dyskusji zawierały krytyczne uwagi odnośnie formy i treści komunikatów zgłaszanych na Zjazdy i zastanawiano się nad celowością powoływania w przyszłości Komisji kwalifikującej komunikaty do druku i wygłaszania.

Dyskutowano następnie zmiany częstotliwości odbywania Zjazdów PTBioch. Sugerowano, aby Zjazdy odbywały się co trzy lata, a sympozja i zjazdy monotematyczne częściej. Część dyskutantów była jednak zdania, że Zjazdy doroczne są dobrą tradycją i dają możliwość szerszej konfrontacji osiągniętych rezultatów badawczych.

Wysunięto również propozycję wprowadzenia nowych form prezentowania doniesień na Zjazdach.

W zakończeniu dyskusji przegłosowano następujący wniosek: Zjazdy PTBioch. powinny odbywać się co roku, z dopuszczeniem formy plakatowej, przy czym wybór formy prezentowania prac pozostawiać organizatorom. Nie należy wprowadzać bariery poziomu zgłaszanych komunikatów.

Wniosek ten jest jednak tylko sugestią dla Nowego Zarządu i organizatorów przyszłego Zjazdu.

Zgodnie z porządkiem dziennym dokonano następnie wyboru nowych władz Towarzystwa. Kandydatury zostały wysunięte przez ustępujący Zarząd, jak również przez zebranych.

Następnie odbyło się tajne głosowanie na poszczególne kandydatury. W głosowaniu na Prezesa i VPrezesa oddano 180 głosów, w tym ważnych 179, na członków Zarządu Głównego oddano 180 ważnych głosów, a na członków Głównej Komisji Rewizyjnej oddano 169 głosów, w tym ważnych 168.

W wyniku głosowania zostali wybrani:

Prof. dr Lech Wojtczak (Warszawa)

Prof. dr Tadeusz Chojnacki (Warszawa)

Pozostali członkowie Zarządu Głównego: prof. dr Zofia Zielińska (Warszawa), doc. dr Andrzej Legocki (Poznań), doc. dr Zofia Lassota (Warszawa), dr Barbara Czartoryska (Warszawa), dr Renata Dąbrowska (Warszawa), prof. dr Piotr Maślowski (Toruń), doc. dr Elżbieta Wolna (Wrocław), prof. dr Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz (Łódź), prof. dr Stanisław Bitny-Szlachto (Warszawa), prof. dr Wacław Minakowski (Olsztyn), doc. dr Jerzy Chmielowski (Katowice), dr Wiesław Makarewicz (Gdańsk), prof. dr Eugeniusz Gąsior (Lublin), doc. dr Wiktor Rzczycki (Białystok) oraz Główna Komisja Rewizyjna: prof. dr Tomasz Borkowski (Lublin), doc. dr hab. Antoni Dancewicz (Warszawa), doc. dr Witold Walerych (Poznań).

Na zakończenie prof. dr T. Chojnacki podziękował zebranych za wybór w imieniu własnym i nieobecnego prof. dr Lecha Wojtczaka.

*dr hab. Renata Dąbrowska*  
Sekretarz Zarządu Głównego Polskiego  
Towarzystwa Biochemicznego



## Sprawozdanie

### z działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w latach 1971—1974

W okresie od ostatniego Walnego Zebrania Członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w czasie trzyletniej kadencji Zarządu Głównego, działalność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zmierzała do pełnej realizacji głównych celów statutowych, a mianowicie, popierania rozwoju biochemii i jej szerokiej popularyzacji. W zasadzie podstawowe założenia statutowe były wypełnione mimo pewnych obiektywnych trudności jakie wyłoniły się w ostatnich latach.

Ogólna liczba członków P.T.Bioch. wzrosła w ciągu ostatnich trzech lat o 71 osób i wynosi obecnie 1038. Skupieni są oni w 12 Oddziałach zorganizowanych w głównych ośrodkach uniwersyteckich kraju. Największą liczbę członków P.T.Bioch. skupia oddział warszawski, najmniejszą oddział toruński.

#### Oddziały Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

Oddział	Liczba członków	
	1971	31.6.1974
Białystok	41	40
Gdańsk	47	44
Katowice	56	53
Kraków	65	69
Lublin	51	62
Łódź	89	108
Olsztyn	39	38
Poznań	97	98
Szczecin	46	38
Toruń	19	18
Warszawa	305	372
Wrocław	87	92
Zagraniczni		6

Wzrost ilościowy członków występuje głównie w oddziale warszawskim i łódzkim. W pozostałych oddziałach stan liczbowy nie uległ większym zmianom w ciągu ostatniego trzechlecia. Mimo dopływu nowych członków naszego Towarzystwa obserwuje się niepokojąco dużą liczbę skreśleń wynikającą z niedopełniania statutowych obowiązków członków wpłacania składek. Sprawa regulowania składek członkowskich jest szczególnie drażliwa w działalności naszego Towarzystwa, gdyż wiąże się ona z zobowiązaniami finansowymi wynikającymi z prenumeraty *Postępów Biochemii*. Członkowie otrzymujący kwartalnik a nie wpłacający należności łącznej za prenu-

meratę i składki powiększają stan zadłużenia naszego Towarzystwa, co powoduje dość kłopotliwą sytuację finansową w naszej działalności. W tym miejscu pragnę więc gorąco zaapelować do wszystkich członków Polskiego Towarzystwa Biochemicznego o terminowe dopełnianie swych zobowiązań finansowych wobec Towarzystwa.

Główna i najbardziej efektywna forma działalności Towarzystwa manifestowała się organizacją Zjazdów, sympozjów i konferencji naukowych. W przeciwieństwie do większości towarzystw naukowych nasze Towarzystwo organizuje coroczne ogólnopolskie Zjazdy Biochemiczne. Problem częstotliwości odbywania ogólnopolskich zjazdów był przedmiotem obszernych dyskusji odbywanych w poszczególnych środowiskach biochemicznych. Niezależnie od kontrowersyjnych poglądów dotyczących tego zagadnienia doroczne zjazdy organizowane przez Polskie Towarzystwo Biochemiczne cieszą się niesłabnącym zainteresowaniem polskich biochemików.

Dowodem tego jest utrzymująca się stale i wysoka frekwencja obejmująca od 500—600 uczestników. Tradycją stało się również organizowanie w ramach dorocznych Zjazdów co najmniej dwóch sympozjów specjalistycznych. W okresie sprawozdawczym odbyły się 3 Zjazdy Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

1. X Zjazd P. T. Bioch. — Poznań, wrzesień 1972 r. z dwoma sympozjami na temat:

- a) struktura, funkcja i synteza RNA,
- b) właściwości molekuly białkowej.

2. XI Zjazd P. T. Bioch. — Białystok, wrzesień 1973 r. z dwoma sympozjami na temat:

- a) struktura i funkcja błon biologicznych,
- b) biochemia w naukach rolniczych.

3. XII Zjazd P. T. Bioch. — Warszawa, wrzesień 1974 r. z dwoma sympozjami na temat:

- a) białka chromatyny,
- b) kwasy nukleinowe; Sympozjum zorganizowane przez Instytut Biochemii i Biofizyki PAN.

Jako nowość w przebiegu Zjazdów można uważać zorganizowanie w Białymstoku sesji zamknięcia Zjazdu. W ramach tej sesji odbyła się konferencja na temat nauczania biochemii w szkołach wyższych. Również pewnym novum jest wprowadzenie sesji sprawozdawczej problemu węzłowego 09-3-1 do programu XII Zjazdu P. T. Bioch. w Warszawie. W ogólnej opinii, wszystkie dotychczasowe Zjazdy Biochemiczne zarówno pod względem naukowym jak i organizacyjnym stały na wysokim poziomie, a uczestnicy mieli możliwość zapoznania się z aktualnie prowadzonymi badaniami w większości ośrodków biochemicznych Polski.

W ciągu ubiegłych trzech lat dało się ponadto zauważyć narastające zainteresowanie w organizacji sympozjów i konferencji o bardzo specjalistycznej tematyce. Inicjatorami i organizatorami tych konferencji były poszczególne oddziały P. T. Bioch., a udział w nich brali biochemicy z całej Polski.

W grudniu 1971 r. Oddział szczeciński zorganizował II Dzień Biochemii Pomorskiej Akademii Medycznej.

W 1972 r. w Krakowie odbyło się trzydniowe sympozjum Sekcji Fotobiologicznej P. T. Bioch.

W tym samym roku odbyła się jednodniowa konferencja w Warszawie pt. „Biochemiczne aspekty wrodzonych wad metabolicznych”.

Szczególnie obfity w tego rodzaju imprezy był rok 1973. Odbyły się więc następujące konferencje i sympozja:

1. Jednodniowa konferencja na temat struktury i funkcji białek poświęcona pamięci Prof. Bolesława Skarżyńskiego, zorganizowana przez Oddział krakowski P. T. Bioch.



2. Przez ten sam oddział zorganizowana została jednodniowa ogólnopolska konferencja na temat „Proteazy leukocytów”.
3. Oddział warszawski zorganizował dwudniowe sympozjum na temat „Asparaginaza, enzym o działaniu przeciwnowotworowym”.
4. Wspólnie z Polskim Towarzystwem Endokrynologicznym i Sekcją Cybernetyki Klinicznej Towarzystwa Internistów Polskich zorganizowano w Warszawie jednodniową konferencję na temat „Biomolekularne podstawy interakcji hormon — komórka”.

Te dwa ostatnie sympozja cieszyły się szczególnie dużym zainteresowaniem. Udział w nich wzięło od 250 do 300 uczestników. Przyczyną takiego żywego zainteresowania był zapewne interdyscyplinarny charakter poruszanej tematyki.

W lutym 1974 r. Oddział szczeciński zorganizował już III Dzień Biochemiczny Pomorskiej Akademii Medycznej. W konferencji tej wzięli udział również biochemicy z innych ośrodków naukowych. Oddział łódzki zorganizował konferencję roboczą na temat cyklazy adenylowej.

Oprócz ogólnopolskich zjazdów, sympozjów i konferencji stałą formą aktywności naukowej była działalność wszystkich oddziałów terenowych Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Podobnie jak w latach ubiegłych również i w ostatnich 3 latach liczba zebrań naukowych utrzymywała się na poziomie 80—90 rocznie.

W zebraniach tych udział brali oprócz członków oddziału również zaproszeni goście z kraju i zagranicy. W większości stanowiły one platformę dla prezentacji ważniejszych osiągnięć naukowych poszczególnych członków Towarzystwa jak również i zaproszonych gości.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne jest nadal członkiem Międzynarodowej Unii Towarzystw Biochemicznych oraz Federacji Europejskiej Towarzystw Biochemicznych. Przedstawiciele naszego Towarzystwa uczestniczyli w posiedzeniach wyższych organizacji międzynarodowych odbywanych przy okazji Zjazdów naukowych. Dzięki staraniom Zarządu Głównego P. T. Bioch. weszło w skład Zrzeszenia Polskich Towarzystw Lekarskich co dało nam uprawnienia do opiniowania wyjazdów zagranicznych naszych członków z ramienia Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej. Tym samym uzyskaliśmy możliwość stałego reprezentowania naszego Towarzystwa na forum międzynarodowych organizacji biochemicznych.

Niezależnie od wyżej podanej zasady wielu członków naszego Towarzystwa prezentowało swój dorobek naukowy na międzynarodowych Zjazdach i Sympozjach korzystając z delegacji PAN lub innych resortów. Dlatego też reprezentacja osiągnięć polskiej biochemii na forum międzynarodowym była w ostatnich trzech latach stosunkowo pokaźna.

Ważnym elementem działalności Towarzystwa w ostatnim okresie była organizacja szkoleń z zakresu stosowania nowych technik w laboratoriach biochemicznych kraju. Szkolenia te opierały się głównie o prezentację poszczególnych metod przez wyspecjalizowane w kierunkach produkcyjnych odpowiednie firmy zagraniczne. I tak w roku 1972 Oddział warszawski i krakowski wspólnie z firmą LKB zorganizował dla około 100 uczestników szkolenie z zakresu metody izoogniskowania. W tym samym roku Oddział warszawski, szczeciński i lubelski wspólnie z firmą Pharmacia przeprowadziły szkolenie w technice sączenia molekularnego dla około 100 osób. W roku 1973 Oddział poznański wspólnie z firmą Mikrotechna z Pragi zorganizował kurs obsługi automatycznego analizatora aminokwasów dla około 75 uczestników, a Oddział warszawski był organizatorem teoretycznego kursu z podstaw enzymologii dla 170 osób. Ponadto w roku 1974 zostały poczynione przygotowania dla przeprowadzenia w kilku oddziałach naszego Towarzystwa szkolenia z zakresu chromatografii powinowactwa. Trzeba również podkreślić, że przy okazji corocznych ogólnopolskich Zjazdów Biochemicznych organizowane są wystawy odczyn-

ników i aparatury laboratoryjnej połączone z wykładami i pokazami z zakresu stosowania najnowszych technik.

Polskie Towarzystwo Biochemiczne od wielu lat prowadzi działalność wydawniczą. Dwa tytuły wydawnicze, a mianowicie czasopismo p.n. *Postępy Biochemii* oraz periodyk niestały pod nazwą „Monografia Biochemiczna” są efektem tej działalności. W okresie sprawozdawczym nastąpiły zmiany w zespole redakcyjnym *Postępów Biochemii*. Powołana została nowa Rada Redakcyjna pod przewodnictwem Prof. Dr K. Zakrzewskiego oraz nowy Komitet Redakcyjny pod przewodnictwem Prof. Dr Z. Zielińskiej. W tym miejscu pragnę złożyć serdeczne podziękowanie dla długoletniego przewodniczącego Rady Redakcyjnej Prof. Dr B. Filipowicza oraz redaktorów Doc. Dr Z. Lasotowej i Doc. Dr M. Jeżewskiej za wielki wkład pracy związany z redagowaniem tego popularnego wśród biochemików polskich czasopisma. Obecnie działający Komitet Redakcyjny wykazuje dużo inwencji w swej działalności co daje gwarancję dalszych efektów w tej dziedzinie działalności naszego Towarzystwa.

Problem właściwego doboru materiału mogący stanowić przedmiot publikacji w „Monografiach Biochemicznych” jest przedmiotem stałej troski Zarządu Głównego P. T. Bioch.

W okresie sprawozdawczym ukazał się 27 tom pt. „Powtarzające się sekwencje DNA w genomie wyższych organizmów” oraz tom 28 pt. „Antybiotyki w badaniach procesów biochemicznych”. W trakcie przygotowania znajduje się tom 29, który ma stanowić Zespół Reguł Mianownictwa, skrótów i symboli obowiązujących w nomenklaturze biochemicznej. Wydanie tego tomu jest wynikiem działalności powołanej do życia Komisji Nomenklaturowej P. T. Bioch. Kolejne tomy będą realizowane zgodnie z wstępnie opracowanym planem na lata następane.

Finansowa strona działalności wydawniczej naszego Towarzystwa uległa w okresie sprawozdawczym pewnej zmianie. Od roku 1974 finansowanie „Monografii Biochemicznych” oraz *Postępów Biochemii* przyjęło Biuro Wydawnictw i Bibliotek PAN.

Jedną z form działalności Polskiego Towarzystwa Biochemicznego na rzecz popierania rozwoju biochemii było przyznawanie dorocznych nagród Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za najlepsze prace doświadczalne, artykuły pogładowe oraz prace prezentowane przez młodych biochemików na dorocznych Zjazdach Naukowych P. T. Bioch. Nagrody przyznawał Zarząd Główny na wniosek powoływanych corocznie Komisji pracujących w oparciu o regulamin przyznawanych nagród. Wszystkim przewodniczącym i członkom komisji pragnę złożyć wyrazy uznania i podziękowania za społeczny wysiłek związany z ich działalnością. Dzięki staraniom Zarządu Głównego uzyskano wzrost funduszu nagród co pozwoliło na podwyższenie wysokości poszczególnych typów nagród do następujących kwot:

- |  |                 |
|--|-----------------|
| 1. Nagroda im. J. K. Parnasa                 | 9.000 zł        |
| 2. Nagroda im. B. Skarżyńskiego              | 6.000 zł        |
| 3. Nagrody dla młodych biochemików na łączną |                 |
|  | sumę 17.000 zł. |

Mimo uzyskania wzrostu funduszu nagród problemy finansowe stanowią nadal poważną trudność w dalszym wszechstronnym rozwoju Towarzystwa. W ciągu ostatnich trzech lat budżet naszego Towarzystwa z kwoty 730 tysięcy w roku 1971 uległ obniżeniu do kwoty 626 tysięcy w roku 1973. Tymczasem zarówno liczba członków jak i zakres działalności Towarzystwa uległy wyraźnemu powiększeniu, a dotacje obniżane są o wielkość długów członkowskich.

Inspirującą i kierowniczą rolę we wszystkich formach działania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego spełniał Zarząd Główny. W czasie VII kadencji odbyło się 7 zebrań plenarnych Zarządu Głównego, w tym 3 zebrania z przewodniczącymi Oddziałów P.T. Bioch.



Ponadto odbyto 19 protokołowanych Zebrań Prezydium Zarządu poświęconych rozwiązywaniu bieżących spraw Towarzystwa.

Następujące główne zagadnienia stanowiły podstawę działania Zarządu Głównego VII kadencji:

1. W nawiązaniu do wniosku poprzedniego Zarządu Głównego uporządkowano sprawy personalne członków Towarzystwa zakładając jednolity system kartotek członków na odpowiednich kartach perforowanych.

2. Na skutek starania w Polskiej Akademii Nauk uzyskano wzrost dotacji PAN na doroczne nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

3. Kilkakrotnie występowano do władz PAN w sprawie zwiększenia dotacji finansowej dla Towarzystwa. W związku z planowaną w roku 1974 zmianą form dotowania towarzystw naukowych (przejęcie strony finansowej wydawnictw Towarzystwa przez PAN) starania nasze nie przyniosły konkretnych wyników. Bezpośrednio z tą sprawą wiązała się możliwość realizacji wniosku Komisji Rewizyjnej poprzedniej kadencji, w którym postulowano obniżenie wysokości kosztów uczestnictwa dla naszych członków poprzez zwiększenie udziału PAN w kosztach organizacji Zjazdów. W świetle negatywnych wyników tych starań oraz pogłębiających się trudności finansowych Towarzystwa, zrealizowanie tego postulatu okazało się niemożliwe. Z tych samych przyczyn nie udało się zwiększyć ilości delegacji na Zjazdy opłacane przez Zarząd Główny. Sprawa zasad finansowania kosztów uczestnictwa w Zjazdach naukowych jest na tyle skomplikowana, że Zarząd Główny wystąpił z odpowiednim pismem do Komitetu Biochemicznego PAN z prośbą o zajęcie stanowiska w tej sprawie i ewentualne podjęcie odpowiednich działań interwencyjnych.

4. Jedną z akcji mających na celu zwiększenie funduszy Towarzystwa była rekrutacja na członków wspierających. W tym celu rozesłano do około 40 placówek naukowych i przemysłowych odpowiednie pisma informacyjne wraz z deklaracjami. W wyniku tej akcji liczba członków wspierających wrosła z 2 do 14 co w dalszym ciągu stanowi w budżecie Towarzystwa pozycję znikomą.

5. W ramach stałej współpracy pomiędzy P. T. Bioch. a FEBS wystąpiono do władz PAN z wnioskiem o przyznanie funduszu dewizowego wystarczającego nie tylko na pokrycie składek członkowskich FEBS, ale również na opłacanie prenumeraty biuletynów FEBS w ilości odpowiadającej liczbie członków Towarzystwa. Fundusze takie uzyskano od roku 1972. Ponadto w odpowiedzi na apel władz FEBS o udział wszystkich Towarzystw — członków Federacji w funduszu stypendialnym dla młodych biochemików, wystąpiono z odpowiednim postulatem do władz PAN.

6. Podejmowano akcję mającą na celu usprawnienie importu małych ilości niezbędnych w pracy badawczej odczynników. W tym celu przedstawiciele Zarządu Głównego przeprowadzili szereg rozmów z władzami PCh w Gliwicach i uzyskano poważną poprawę w działalności zaopatrzenia.

7. W celu usprawnienia i skoordynowania działalności Zarządu Głównego z Zarządami oddziałów terenowych wprowadzono jednolity terminarz wyborów do władz oddziałów pokrywający się z czasem kadencji Zarządu Głównego.

8. Rozrastające się obowiązki administracyjne biura Zarządu Głównego, a także przeniesienie siedziby redakcji *Postępów Biochemii* oraz jej archiwum do siedziby Zarządu Głównego przy ul. Freta 16, pogłębiło trudności lokalowe Towarzystwa do rozmiarów, które wpływają negatywnie na pracę biura oraz efektywność pracy obarczonych stałymi funkcjami członków Zarządu. W tej sytuacji podjęto próby polepszenia warunków lokalowych Towarzystwa w drodze uzyskania dodatkowych pomieszczeń przy ul. Freta 16. Wobec tego, że starania te nie przyniosły żadnych rezultatów, zwrócono się do władz PAN o pomoc w tej sprawie. Jak dotąd nie uzyskano pozytywnej odpowiedzi. Obecnie siedzibę biura Zarządu Głównego stanowi jeden mały pokój w lokalu Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Mimo zatrudnienia personelu biurowego w wymiarze 1/2 etatu księgowej i 3/4 etatu sekretarki wiele funkcji administracyjnych Towarzystwa spełniali członkowie Prezydium Zarządu Głównego. W cotygodniowych piątkowych dyżurach społecznie poświęcali wiele cennego czasu na pracę w Zarządzie Głównym. Niech mi więc wolno będzie na zakończenie złożyć wyrazy szczerego uznania i serdeczne podziękowanie dla wszystkich członków Prezydium, którzy swą bezinteresowną pracą utrzymywali stałą aktywność Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.

*Tomasz Borkowski*



## Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego VIII-ej kadencji

Zarząd Główny wybrany przez VIII Walne Zebranie w dniu 5 września 1974 r. ukonstytuował się w dniu 5 października 1974 r. następująco:

### Prezydium:

- Prezes — Prof. dr Lech Wojtczak (Warszawa)  
Viceprezes — Prof. dr Tadeusz Chojnacki (Warszawa)  
Sekretarz — Dr hab. Renata Dąbrowska (Warszawa)  
Skarbnik — Dr Barbara Czartoryska (Warszawa)  
Członkowie — Prof. dr Stanisław Bitny-Szlachto (Warszawa)  
— Prof. dr Zofia Lassota (Warszawa)  
— Prof. dr Zofia Zielińska (Warszawa)

### Członkowie Zarządu:

- Doc. dr Jerzy Chmielowski (Katowice)  
Prof. dr Eugeniusz Gąsior (Lublin)  
Prof. dr Leokadia Kłyszajko-Stefanowicz (Łódź)  
Doc. dr Andrzej Legocki (Poznań)  
Prof. dr Piotr Masłowski (Toruń)  
Dr Wiesław Makarewicz (Gdańsk)  
Prof. dr Wacław Minakowski (Olsztyn)  
Doc. dr Wiktor Rzezycki (Białystok)  
Doc. dr Elżbieta Wolna (Wrocław)

## Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego przyznane w 1974 roku

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego zawiadamia o przyznaniu dorocznych nagród Towarzystwa:

### Nagroda Imienia Bolesława Skarżyńskiego

została przyznana kol. Alinie Grzeleńskiej za pracę „Teorie mechanizmu odporności roślin na choroby infekcyjne” ogłoszoną w kwartalniku *Postępy Biochemii*, 19, 1973, 141—158.

### Nagroda Imienia Jakuba Parnasa

została przyznana zespołowi w składzie: kol. kol. B. Golińska, T. Twardowski i A. B. Legocki za prace — „Purification and Some Properties of Elongation Factor I from Wheat Germ” ogłoszoną w *Biochim. Biophys. Acta* 324, 1973, 156—170 i „Purification and Some Properties of Elongation Factor II from Wheat Germ” ogłoszoną w *Biochim. Biophys. Acta* 324, 1973, 171—183.

Nagrody i wyróżnienia w konkursie dla młodych biochemików przedstawione na XII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Warszawie w 1974 r.

Nagroda I — kol. E. Grąbczewska za pracę E. Grąbczewska, B. Olszańska „Olbrzymi jądrowy RNA embrionów kurzych” (B-25).

Nagroda II — kol. M. Pilarska za pracę M. Pilarska, M. G. Sarzała „Metabolizm lipidów błon sarkoplazmatycznego retikulum w ontogenezie mięśnia szkieletowego królika” (D-19).

Nagroda III — kol. A. Guranowski za pracę „Polimeraza poli(A) z chloroplastów jęczmienia — Częściowe oczyszczanie i charakterystyka” (B-27).

### Wyróżnienia:

Kol. M. Wilk za pracę „Karboksylacja propionylo-CoA w mitochondriach z różnych narządów szczura” (D-27).

Kol. J. Zaleski za pracę J. Zaleski, J. Bryła „Synteza glukozy i mocznika w izolowanych komórkach wątroby królika” (D-34).

Kol. A. Lesicki za pracę „Biochemiczne właściwości kinazy pirogronianowej niektórych tkanek raka *Orconectes Limosus* Raf. (Crustacea)” (D-24).

Kol. A. Stankiewicz za pracę A. Stankiewicz, W. Makarewicz „Inaktywacja cieplna różnych form dezaminazy AMP z mięśni szkieletowych człowieka” (E-38).



## SPRAWOZDANIE

### IX Zjazd Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS)

Budapeszt, 25—30 sierpień 1974

IX Zjazd FEBS został zorganizowany przez Węgierskie Towarzystwo Biochemiczne w Budapeszcie. Honorowym prezydentem Zjazdu był Prof. Albert Szent-Györgyi (USA), a prezydentem zjazdu przewodniczący Węgierskiego Towarzystwa Biochemicznego Prof. F. Guba.

Wykłady plenarne podczas sesji otwarcia wygłosili: Marat Ya. Karpeisky (ZSRR) — „Centra aktywne enzymów: stereochemia i dynamika”; Lars Ernster (Szwecja) — „Bioenergetyka mitochondrialna: fakty i idea”.

Obrady toczyły się w ramach 7 sympozjów i 3 kolokwium, na których przedstawiono również część krótkich doniesień. Przeważającą jednak część doniesień przedstawiono w formie plakatowej.

Tematyka sympozjów i kolokwium przedstawiała się następująco:

Sympozja: 1) Białka systemów kurczliwych

2) Mechanizmy działania i regulacji enzymów

3) Biochemia jądra komórkowego

4) Regulacja transkrypcji

5) Postsyntetyczna modyfikacja makromolekuł

6) Błony biologiczne: struktura i funkcja

7) Struktura przeciwciał i molekularna immunologia

Kolokwia: 1) Regulacja biosyntezy aminokwasów

2) Właściwości oczyszczonych receptorów cholinergicznyc i adrenergicznych

3) Analiza i symulacja układów biochemicznych.

Tematyka doniesień:

Biosynteza białek

Struktura białek i peptydów

Chemia i biochemia polipeptydów

Biochemia lipidów

Biochemia i molekularna biologia krzepnięcia krwi

Zastosowanie enzymów w transformacji związków organicznych

Enzymy i jednostki funkcjonalne łańcucha oddechowego

Biochemia radiacyjna

Biochemia środowiskowa

Czynniki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe

Nowe techniki w biochemii

Izolacja i właściwości elementów subkomórkowych i enzymów

Biochemia kliniczna

Biochemia czynnych związków drobnocząsteczkowych

Biochemia roślin

Biochemia mikroorganizmów.

Podczas sesji zamknięcia Charles Weissmann (Szwajcaria) otrzymał medal imienia Hansa Krebsa, po czym ku Jego czci wygłosił wykład na temat mutagenety.

W zjeździe wzięło udział około 2500 aktywnych uczestników. Po raz pierwszy w Zjeździe FEBS uczestniczyło blisko 200 biochemików z PRL, w tym ponad 120 delegowanych przez resorty.

### Biochemia jądra komórkowego

W 26 referatach sympozjalnych przedstawiono aktualny stan badań nad syntezą i strukturą informacyjnego i rybosomowego RNA, a także nad wzajemnymi oddziaływaniami jądrowo-cytoplazmatycznymi. Strukturę i funkcję DNA i chromatyny omówiono w czasie połączonej sesji sympozjów pt. „Biochemia jądra komórkowego” i „Regulacja transkrypcji”. W trakcie sympozjum wygłoszono 45 komunikatów ustnych (w tym 6 polskich) i 28 doniesień plakatowych (w tym 5 polskich).

Najważniejsze referaty sekcji pt. „Struktura i synteza RNA. Informacyjny RNA” dotyczyły procesów, jakim ulega mRNA od momentu transkrypcji do chwili opuszczenia jądra. G. P. Georgiev w swym referacie wprowadzającym pt. „Organizacja materiału genetycznego w jądrze komórkowym” omówił strukturę pierwotnego produktu transkrypcji mRNA oraz organizację chromatyny w jądrze interfazalnym. Zagadnienie regulacji ekspresji genu w komórkach eukariontów pozostaje do dziś w sferze hipotez. Dysponujemy jednak coraz większą ilością faktów świadczących o występowaniu w jądrze komórkowym olbrzymiego RNA (o masie cząsteczkowej rzędu  $10^7$ ), jako pierwotnego produktu transkrypcji w syntezie mRNA. Olbrzymi RNA zawierałby prócz sekwencji informacyjnych właściwego mRNA położonych bliżej 3' końca cząsteczki i zakończonych sekwencjami oligo(A), również sekwencje regulacyjne nie kodujące białka, a decydujące o ekspresji danego genu w odpowiednim czasie i miejscu komórki. Dane eksperymentalne wskazują że ta programująca część pre-mRNA, odpowiedzialna zresztą za jego wielką masę cząsteczkową, znajduje się bliżej 5' końca cząsteczki; zawiera ona odcinki dwuniciowe tworzące pętle, sekwencje oligo(U), jak również sekwencje komplementarne do powtarzających się odcinków DNA. Nie znana dotąd funkcja tych specyficznych struktur; zdaniem O. Samariny pętle dwuniciowe położone na pograniczu sekwencji informacyjnych i regulacyjnych mogą odpowiadać za przemiany pre-mRNA w jądrze. Przypuszcza się, że pre-mRNA ulega w jądrze częściowej degradacji w swej nieinformacyjnej części. Eksperymentalnie potwierdzono zaś, że 3' koniec pre-mRNA ulega poliadenylacji (ilość reszt adeniny wzrasta do 200), po czym mRNA w połączeniu z białkiem — hipotetyczną informatyną Georgieva i Samariny — opuszcza jądro.

R. P. Perry w swym referacie przytoczył wyniki licznych doświadczeń świadczących o pochodzeniu mRNA z wysokocząsteczkowego prekursora ulegającego wieloetapowej modyfikacji potranskrypcyjnej. Tak więc w czasie dojrzewania pre-mRNA ulega w swej 5' końcowej regulacyjnej części nieznacznej metylacji w ilości 2,2 reszt metylowych na 1000 nukleotydów, oraz poliadenylacji na 3' końcu cząsteczki. Liczba reszt adeniny zmniejsza się następnie w czasie translacji mRNA na poli-somach i prawdopodobnie decyduje o momencie wyłączenia cząsteczki z tego procesu.

Na podstawie dociekań teoretycznych i licznych danych doświadczalnych K. Scherrer w swym referacie pt. „Cellular Information Transfer and mRNA Formation in Eucaryotic Cells” przedstawił najnowszą wersję swojej teorii odnośnie mechanizmu ekspresji genu w organizmach wyższych. Procesy przenoszenia informacji z jednego nośnika na drugi, tzn. kolejno z DNA poprzez RNA do białka, sterowane są — zgodnie z hipotezą kaskadowej regulacji — ze wzrastającą na każdym etapie wybiórczością. Autor wyróżnia regulację pierwotną na poziomie mRNA, oraz



wtórna — potranslacyjną. Mechanizm przenoszenia informacji kodującej (właściwego mRNA) poznano już względnie dobrze, niewiele jeszcze jednak wiadomo o losach tzw. informacji programującej. Być może w skład sekwencji regulujących wchodzi sekwencje poli(A), czy też dodatkowe, niekodujące nukleotydy obecne w badanych przez Scherrera polisomalnym mRNA dla globiny kaczki. Białka swoiście wiążące się z odpowiednimi sekwencjami mRNA mogą być zapewne pośrednikami sygnałów regulacyjnych. Struktury — obecne w postulowanej przez Scherrera tzw. pośredniej formie jądrowego pre-mRNA, takie jak oligo(U), podwójne pętle oligo- i poli(A) — mogą również pełnić rolę sygnałów dla pewnego etapu potranskrypcyjnej regulacji tworzenia się i ekspresji danego mRNA.

Kolejne referaty dotyczyły zastosowania nowych technik do badania struktury jądrowego RNA. Tak np. zastosowanie odwrotnej transkryptazy (polimerazy DNA zależnej od RNA) do syntezy komplementarnego DNA pozwala na wykorzystanie metod badania sekwencji nukleotydów w DNA w celu analizowania struktury pierwszorzędowej mRNA (Proudfoot, Brownlee). RNA zawierający sekwencje informacyjne oddzielić można od innych kwasów nukleinowych poprzez hybrydyzację obecnych w nim oligo- czy poli(A) z poli(U) lub oligo(dT) nawieszonymi na celulozie (Burdon, Pederson). Prowadzi się poszukiwania takich inhibitorów syntezy RNA, które wybiórczo hamują transkrypcję chromosomalnego RNA (Egyhazi).

W sekcji „Struktura i synteza rybosomowego RNA” największe zainteresowania wzbudziły referaty dotyczące prób określenia pierwszorzędowej struktury kwasów nukleinowych. J. Ebel przedstawił sekwencję nukleotydów w 16S rRNA z *E. coli* i *P. vulgaris* podając równocześnie pozycje zmetylowanych nukleotydów. Następnie zaproponował schemat drugorzędowej struktury rRNA w podjednostce 30S rybosomu. 16S rRNA zawierałaby wiele podwójnych pętli różnej długości, poprzedzielanych nierównymi odcinkami jednoniciowymi. Autor scharakteryzował również regiony osłaniane przed działaniem RNazy T<sub>1</sub> przez swoiste białka. Znacznie zawansowane są także prace nad określeniem pierwszorzędowej struktury 23S rRNA z *E. coli*.

Z pracowni H. Buscha pochodzą próbki oznaczenia sekwencji nukleotydów w niewielkich RNA jądrowych, m.in. jąderkowego 5, 8S RNA.

B. Maden omówił obecne poglądy na synteze, modyfikację i ewolucję prekursora rybosomowych RNA. Na tle ustalonej za pomocą mikroskopu elektronowego topografii 45S pre-rRNA, autor przedstawił własne badania nad metylacją sekwencji rybosomowych i nad sekwencjami odrzucanymi podczas procesów dojrzewania. Autor zajął się również zagadnieniem dotyczącym ewolucji cząsteczki pre-rRNA. Regiony istotne dla struktury rRNA i niektóre sekwencje zmetylowane są wysoce zachowawcze dla eukariontów, poczynając od drożdży, poprzez owady, aż do ssaków. Natomiast sekwencje niezmetylowane, odrzucane w trakcie dojrzewania, nie przejawiają charakteru zachowawczego nawet w obrębie gromady ssaków.

Podobne dane dotyczące ewolucji prekursorowego rRNA przedstawił U. Loening. Równocześnie poddał on w wątpliwość szeroko przyjmowany pogląd, że 45S RNA jest pierwotnym produktem transkrypcji genu rybosomowych RNA. W świetle najnowszych doświadczeń, uznawane dotąd za agregaty jąderkowe cząsteczki RNA większe niż 45S, mogą być pierwotnymi produktami transkrypcji rDNA.

Struktura i funkcja DNA oraz chromatyny były tematem sesji dwóch połączonych sympozjów „Biochemia jądra komórkowego” i „Regulacja transkrypcji”. Słuchacze mieli możliwość zapoznać się z nowymi technikami stosowanymi do badań nad transkrypcją pewnych genów oraz nad strukturą genomu.

J. Paul omówił metodę oznaczania ilości kopii danego genu (w tym przypadku globiny myszy) w genomie za pomocą miareczkowania transkrybowanego mRNA tzw. komplementarnym DNA (zsyntetyzowanym przez odwrotną transkryptazę na matrycy polisomalnego mRNA). Grupa J. Paula badała również transkrypcję genu globiny w układzie rekonstruowanej chromatyny. Chromatyna pochodząca z tkanki

nieerytrocytycznej (mózgowej) może prowadzić transkrypcję mRNA globiny tylko wtedy, gdy jej własne białka niehistonowe są zastąpione białkami niehistonowymi embrionalnej chromatyny wątrobowej, zdolnej do syntezy mRNA globiny. Tak więc białka niehistonowe mogą stanowić jeden z czynników transkrypcyjnej regulacji ekspresji genu.

Ta sama grupa zajmuje się również badaniami nad transkrypcyjną i potranskrypcyjną kontrolą ekspresji genu globiny w indukowanych i nieindukowanych do syntezy tego białka komórkach myszy zakażonych wirusem Friend. J. Paul stwierdził ponadto, że w genomie myszy występuje jedna lub najwyżej kilka kopii genu globiny.

Podobnie, J. Bishop w swym wystąpieniu podkreślił, że wszystkie badane w jego pracowni mRNA syntetyzowane są na sekwencjach występujących w genomie pojedynczo.

Pozostałe referaty tej sekcji dotyczyły m.in. metod badania sekwencji i struktury DNA (Zachau, Bernardi) oraz roli histonów (Tsanev) i białek niehistonowych (Rickwood, McCarthy).

Komunikaty prezentowane w ramach sympozjum omawiały syntezę RNA i jego metabolizm, replikację i transkrypcję DNA oraz wpływ hormonów na te procesy. Dotyczyły również struktury i funkcji chromatyny i białek jądrowych, a także enzymów jądrowych.

### Regulacja transkrypcji

Występujący w sympozjum referenci koncentrowali się głównie na problematyce badań struktury przestrzennej DNA-zależnych polimeraz RNA wyodrębnionych i oczyszczonych z szeregu źródeł (bakteriofagi i wirusy — E. K. F. Bautz, Heidelberg, RFN; W. Zillig, München, RFN; A. Travers, Cambridge, Anglia; mitochondria prokariotyczne — E. Wintersberger, Würzburg, RFN; jądra prokariotyczne — P. Chambon, Strasburg, Francja). Oczyszczone enzymy, co samo w sobie stanowi niekiedy poważny problem (np. polimerazy mitochondrialne), badano w układach *in vitro*, oceniając rolę podjednostek (W. Zillig, E. K. F. Bautz) oraz wpływ warunków otoczenia na aktywność enzymów: siły jonowej, obecności określonych kationów, inhibicji przez rifampicynę i jej pochodne i  $\alpha$ -amanitynę. Zainteresowanie badaczy budziła również specyficzność polimeraz w stosunku do różnych matryc DNA (E. Wintersberger, E. K. F. Bautz, P. Chambon). Strukturę kompleksu inicjującego badano metodami fizykochemicznymi w układzie *in vitro* polimerazy RNA z *E. coli* (A. Travers, T. M. Jowin, Göttingen, RFN) poszukując technik badania struktury genu promotorowego w czasie inicjacji. W oparciu o badania sekwencji DNA rejonu promotora ustalono, że specyficzność inicjacji nie jest zapewne określona sekwencją zasad, a raczej specyficzną strukturą przestrzenną promotora E. K. F. Bautz).

Badanie mechanizmów regulacji transkrypcji w organizmach prokariotycznych jest o tyle trudne, że nasza wiedza o strukturze chromatyny, a także samego DNA w jądrze, jest wciąż jeszcze dość ograniczona. Zadowolamy się zatem chwilowo próbami oczyszczenia i klasyfikacji DNA-zależnych polimeraz RNA. W komórce prokariotycznej występuje wiele rodzajów tych polimeraz — o różnej lokalizacji, różnej, nie absolutnej zresztą, specyficzności matrycowej, różnej odporności na rifampicynę (mitochondria) czy  $\alpha$ -amanitynę (jądro). Ta ostatnia cecha służy zresztą, chyba zupełnie mechanicznie, do rozróżniania polimeraz jądrowych (całkowicie odporne, inhibowane niskimi i wysokimi stężeniami  $\alpha$ -amanityny).

Polimerazy RNA występują w wyraźnym nadmiarze do potrzeb życiowych komórki i ich stężenie nie może grać roli regulacyjnej. Czy lokalizacja tych enzymów,



a także ich, integralne często, włączenie w strukturę błon (np. polimerazy mitochondrialne) taką rolę mogą odgrywać, pozostaje nadal problemem otwartym.

Drugim znakiem zapytania, postawionym w ciekawym i błyskotliwym podsumowaniu Sympozjum (H. Bush, Houston, USA) jest oczywiście rola podjednostek w szeregu poznanych polimeraz eukariotycznych i prokariotycznych — istnienie podjednostek nie jest niewątpliwie warunkiem koniecznym specyficznego funkcjonowania enzymu, podjednostki te mogą być identyczne (tak jest zapewne w polimerach mitochondrialnych) lub różne (*E. coli*, polimerazy jądrowe), ale nawet w przypadku najlepiej poznanego enzymu z *E. coli* rola podjednostek wymaga dalszego badania. W przypadku polimeraz jądrowych problem ten jest całkowicie otwarty dla eksploracji.

### Biosynteza białek

W programie Zjazdu FEBS w Budapeszcie problematyka biosyntezy białka potraktowana została marginesowo i ograniczona do grupy tzw. wolnych komunikatów. Główną przyczynę należałoby upatrywać w tym, że zarówno na VIII Zjeździe FEBS w Amsterdamie jak i na Międzynarodowym Kongresie Biochemicznym w Sztokholmie w 1973 r. zagadnienia biosyntezy białek i kwasów nukleinowych były jednym z głównych tematów Zjazdu. Ogółem na ostatnim Zjeździe wygłoszono 19 komunikatów a 54 przedstawiono w formie plakatu. Tak mała ilość komunikatów nie pozwalała na szerszą orientację w aktualnej problematyce biosyntezy białka tym bardziej, że wiele z poważnych ośrodków zajmujących się tą dziedziną badań nie było reprezentowanych. Kilka z przedstawionych tematów zasługuje jednak na wzmiankę w naszym sprawozdaniu, np. Wykorzystanie wirusowych RNA i innych naturalnych mRNA jako matryc w biosyntezie białka *in vitro*. Ostatnio informacyjne RNA wykorzystuje się coraz częściej, w eksperymentach jako modele matryc, tworzą one bowiem przydatne układy dla badania różnych etapów procesu translacji, mechanizmów translacji i swoistości czynników inicjujących. Wiele uwagi poświęcono również technikom izolacji naturalnych mRNA, ich charakterystyce, obecności fragmentów poli(A) itp.

Przedstawiono szereg prac na temat struktury podjednostkowej aminoacylo-tRNA syntetaz zarówno prokariotycznych i eukariotycznych wskazując na ich złożoną czwarterzędową strukturę. Przedstawiono także dane na temat specyficzności różnych syntetaz i mechanizmu rozpoznawania tRNA przez enzym, jakkolwiek żaden z komunikatów nie przyniósł rewelacji.

Zagadnieniom występowania czynnika elongacyjnego EF-1 w komórkach eukariotów w wielu formach oligomerycznych, roli i aktywności biologicznej różnych form EF-1 poświęcono kilka doniesień. Szczególnie interesująca okazała się obecność fosfolipidów i cholesterolu lub jego estrów w ciężkich agregatach EF-1 a ich brak w formach lekkich. Jak się wydaje związki te (fosfolipidy) pełnią regulującą funkcję w interkonwersji różnych form EF-1 podczas syntezy białek w komórkach organizmów wyższych.

### Chemia i biochemia białek, polipeptydów i peptydów

Na IX Zjeździe FEBS omawiano badania zarówno struktury jak i modyfikacji biochemicznej i chemicznej białek i peptydów.

Pełną pierwszorzędową strukturę pepsyny wieprzowej przedstawiła grupa Ste-

panova z Moskwy oraz Moràvek i Kostka z Pragi. Sekwencję prolaktyny z przysadki wołowej oznaczył Wallis z Brighton. Hormon ten posiada jeden łańcuch polipeptydowy składający się z 199 reszt aminokwasów oraz 3 mostki dwusiarczkowe. Autor stwierdził duże podobieństwo w sekwencji prolaktyny i hormonu wzrostowego co potwierdza hipotezę o filogenetycznym pokrewieństwie obu hormonów. Borvendèg i wsp. z Budapesztu otrzymali serię syntetycznych analogów hormonu uwalniającego laktotropinę, wykazując, że najwyższą aktywność biologiczną posiada Arg<sup>8</sup>—analog (25—50% aktywności LHRH). Manning i wsp. uzyskali syntetycznie 1-dezamino-4-wałylo-8-D-argininowy analog wazopresyny. Peptyd ten okazał się jednym z najbardziej swoiście działających czynników antydiuretycznych, o przedłużonym okresie działania. Bauer i Kleinkauf z Berlina Zachodniego badali enzymatyczną degradację hormonu uwalniającego tyreotropinę (pGlu—His—Pro—NH<sub>2</sub>), w surowicy krwi i homogenatach podwzgórza. Autorzy wykazali, że oprócz dezamidacji następuje także uwolnienie dwupeptydu pGlu—His, który ulega dalszej enzymatycznej hydrolizie. Natomiast w badaniach tych nie wykazano otwarcia pierścienia piroolidonowego kwasu piroglutaminowego.

Graf i Li wykazali, że plazmina ludzka rozrywa tylko niektóre wiązania posiadające lizynę lub argininę w beta-lipotropinie i hormonie wzrostowym co różni ten enzym od trypsyny powszechnie używanej do badań struktury białek. Dzięki takiej ograniczonej proteolizie plazminą ludzkiego hormonu wzrostowego wymienieni badacze z San Francisco uzyskali dwa aktywne fragmenty badanego hormonu.

Löffler i Schneider wykazali mały wpływ na aktywność papainy gdy reszty lizyny, tyrozyny i tryptofanu uległy modyfikacji przez działanie dwuazotetrazolu, natomiast zablokowanie grup karboksylowych (prawdopodobnie Asp<sub>158</sub>) estrem etylowym glicyny wobec karbodwuimidu niszczy zupełnie aktywność tej proteazy.

Kassel i Kido z USA przez działanie nadtlenu wodoru w kwaśnym środowisku utleniali reszty metioniny w pepsynie do odpowiedniego sulfooksydu. Zmodyfikowany w ten sposób enzym posiadał niezmienną aktywność proteolityczną z czego autorzy wnoszą, że reszty metioniny nie są istotne dla aktywności enzymu Raggi i wsp. z Pizy badając inaktywację dezaminazy AMP przez 1-fluoro-2,4-dwinitrobenzen doszli do wniosku, że proces ten polega na modyfikacji reszt tyrozynowych istotnych dla aktywności enzymu. Vina i Zhagat z Rygi wykazali, że przeprowadzenie reszty tyrozyny w L-asparaginazie w aminotyrozynę (przez nitrowanie tetranitrometanem a następnie redukcję podsiarczynem sodu) znacznie zwiększa aktywność badanej amidazy. Solovyeva i wsp. z Moskwy wykazali, że dansylowanie wolnych grup aminowych lub fotooksydacja reszt histydyny wobec błękitu metylenowego obniża aktywność klostridiopeptydazy A o ok. 90%. Fotooksydacja lub karbetoksylicja pirowęglanem dwumetylu niszczy aktywność fenyloalanylo-tRNA (Hennecke i Böck z Regensburga) a także mutazy fosfoglicerolu (Carreras i wsp. z Barcelony) co jest dowodem, że reszty histydyny są istotne dla aktywności tych obu enzymów. Również Nicolas i wsp. z Francji stwierdzili, że alkilowanie histydynowych reszt w dehydrogenazie estradiolu za pomocą jodowanych pochodnych substratu niszczy całkowicie aktywność enzymu.

Szczególnie ciekawe wyniki przedstawili Yajima i wsp. z Kyoto. Uzyskali oni alkaliczny inhibitor trypsyny przez syntezę na stałych nośnikach. Syntetyczny polipeptyd, składający się z 58 reszt aminokwasów, posiada 82% aktywności naturalnego inhibitora z trzustki wołowej.

Interesującą hipotezę wysunął Ivanowowie z Sofii. Na podstawie wyznaczonej częstotliwości występowania różnych aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym proinsuliny i trzustkowego inhibitora trypsyny autorzy przypuszczają, że oba te polipeptydy są tworzone z jednego wspólnego prekursora białkowego.



## Przeciwciała — struktura i molekularna immunologia

W sekcji dotyczącej struktury przeciwciał i molekularnej immunologii odbyły się dwa sympozja: A) budowa i funkcja przeciwciał, B) receptory limfocytów i synteza przeciwciał, oraz wygłoszono lub przedstawiono w formie plakatowej 43 komunikaty (w tym 6 z Polski).

Szczególnie interesujące wyniki badań, przedstawione na sympozjum A, dotyczyły ewolucji struktury pierwszorzędowej części zmiennej przeciwciał. Część zmienna (V) obejmuje miejsce wiążące cząsteczki przeciwciała i znajduje się zarówno w łańcuchach ciężkich, jak i lekkich. Badania autorów amerykańskich (J. D. Capra i wsp.) nad aminokwasowymi sekwencjami części zmiennej łańcuchów ciężkich pochodzących z ludzkich immunoglobulin wykazały, że hiperzmiennne obszary są odpowiedzialne przynajmniej częściowo, za idiotypowe determinanty, jak również swoistość przeciwciałową. Porównanie aminokwasowych sekwencji łańcuchów ciężkich przygotowanych z białek szpiczaka oraz immunoglobulin ludzkich i różnych gatunków zwierząt świadczy o podobieństwie ich budowy, aż do wystąpienia pierwszej hiperzmiennnej domeny. Ponadto badanie sekwencji u wielu różnych gatunków ssaków i ptaków udowodniło obecność filogenetycznie uwarunkowanych ugrupowań w częściach zmiennych łańcuchów ciężkich immunoglobulin każdego z tych gatunków. Weduż An-Chuan Wang (Uniwersytet w San Francisco, USA) genom wszystkich eukariotów zawiera duże ilości powtarzalnego DNA, który odgrywa ważną rolę w ewolucji, różnicowaniu i zmienności przeciwciał. Taki powtarzalny DNA uważa się na ogół za DNA „nonsensowny”, ale wyniki autora wskazują, że „nonsensowny” DNA, przynajmniej niektóre, w jednym gatunku, może być „sensowny” w innym. Dla wyjaśnienia roli powtarzalnego DNA autor badał sekwencje aminokwasowe dużej liczby łańcuchów ciężkich i lekkich białek szpiczaka. Stwierdził, że istnieje większa homologia struktury części łańcucha lekkiego pewnej immunoglobuliny pochodzącej z ludzkiego szpiczaka i immunoglobuliny ptasiej, w porównaniu z łańcuchem lekkim innej ludzkiej immunoglobuliny. Świadczy to o tym, że w tym przypadku białko nowotworowe ludzkie jest strukturalnie bliższe białku pochodzącemu z filogenetycznie odległego gatunku, aniżeli prawidłowej ludzkiej immunoglobulinie.

W żywych organizmach oddziaływanie antygen-przeciwciało odbywa się w warunkach na ogół różnych od istniejących w testach immunochemicznych *in vitro*. Aby poznać wpływ warunków otoczenia na reakcję przeciwciał antyhaptenowych z konjugatami hapten-białko, Franek (Instytut Chemii Organicznej w Pradze, Czechosłowacja) przeprowadził doświadczenia w różnych środowiskach z dodatkami syntetycznych polimerów. Wykazał różne zachowanie dwóch rodzajów przeciwciał posiadających tę samą swoistość. Różnica ta była związana prawdopodobnie ze zdolnością tworzenia mostków między cząsteczkami antygeny, a nie różnym powinowactwem wewnętrznym.

Obok problemów związanych z budową i funkcją przeciwciał, ich konformacją i aktywnością, genetyczną i molekularną kontrolą ich biosyntezy, biochemią odpowiedzi immunologicznej, treścią wielu komunikatów były receptory limfocytów, makrofagów i leukocytów, oraz lektyny. Przedstawiono metody izolacji, próby określenia charakteru chemicznego i znaczenia biologicznego tego typu substancji.

## Białka systemów kurczliwych

Zagadnieniom dotyczącym struktury i funkcji białek systemów kurczliwych poświęcono trzy posiedzenia sympozjalne z 24-ma referatami oraz oddzielne sesje, na których przedstawiono 38 krótkich doniesień głównie w formie plakatowej.

Obrady sympozjalne skoncentrowano wokół trzech problemów: mechanizmu ATPazy miozynowej oraz interakcji aktyny z miozyną, systemu regulującego cienkich filamentów, oraz architektury filamentów miozynowych i procesu fosforylacji miozyny. Komunikaty obejmowały szerszy wachlarz zagadnień dotyczących zarówno mięśniowych jak i niemięśniowych systemów kurczliwych.

Badania nad mechanizmem ATPazy miozynowej, prowadzone ostatnio z coraz szerszym zastosowaniem technik umożliwiających pomiary zmian chemicznych i strukturalnych w czasach rzędu milisekund, doprowadziły do wykrycia szeregu etapów pośrednich w procesie hydrolizy ATP katalizowanej przez ten enzym. Obecne badania mają na celu charakteryzację intermedatów oraz wyznaczenie stałych równowagi i stałych szybkości dla poszczególnych stadiów reakcji. Uzyskane przy użyciu niezależnych metod wartości stałych przedstawione przez D. R. Trenthama i wsp. (Bristol, Anglia) oraz przez H. G. Mannherza i wsp. (Heidelberg, RFN) wykazują dużą zgodność. Obie grupy badawcze dochodzą do wspólnego wniosku, że stadium, w którym następuje zmiana konformacji kompleksu enzym—produkt wyznacza ogólną szybkość hydrolizy ATP w temperaturze pokojowej. Dalsze badania zmierzają do precyzyjnego określenia wpływu aktyny na kinetykę poszczególnych stadiów hydrolizy ATP przez miozynę oraz korelacji tych stadiów z różnymi stanami fizjologicznymi mięśnia. Duże nadzieje wiąże się z badaniami rentgenograficznymi na żywym mięśniu, co umożliwi śledzenie zmian struktury mięśnia w różnych fazach cyklu skurcz-rokurcz. Badania w tej dziedzinie referowali Holmes i współpracownicy (Heidelberg, RFN). Wykorzystując analogi ATP do zatrzymania reakcji hydrolizy tego związku na różnych stadiach pośrednich w pęczkach włókien mięśniowych próbowali oni skorelować zmiany tzw. poprzecznych mostków miozyny — za pośrednictwem których filamenty miozynowe łączą się z filamentami aktynowymi — ze stanem fizjologicznym mięśnia.

Referat M. C. Schauba i wsp. (Zurich, Szwajcaria) dostarczył nowych informacji o różnicach pomiędzy miozyną z mięśni szkieletowych białych (szybkich) z jednej strony, a miozyną z mięśni czerwonych (wolnych) oraz sercowego z drugiej. Różna reaktywność grup SH, różnica w stopniu inaktywacji  $K^+$ -ATPazy w odpowiedzi na alkilację grup SH oraz w ochronnym wpływie MgATP i MgADP na aktywność enzymu wydają się wskazywać na strukturalne różnice pomiędzy miozynami z mięśni różnego typu.

Bardzo ciekawe wyniki dotyczące funkcjonalnego uwarunkowania różnic pomiędzy mięśniami szybkimi i wolnymi przedstawił F. A. Sréter (Boston, USA). Te dwa typy mięśni szkieletowych kręgowców oprócz różnic fizjologicznych wykazują szereg różnic biochemicznych, głównie we właściwościach miozyny. Jeżeli mięśnie należące do typu szybkich poddawano *in situ* stałemu drażnieniu za pomocą elektrod umieszczonych w okolicy nerwu z częstotliwością charakterystyczną dla bodźców nerwowych dochodzących do mięśni wolnych, to po kilkunastu tygodniach stwierdzono, że wyizolowaną z tych mięśni miozynę cechowały właściwości charakterystyczne dla miozyny z mięśni wolnych. Po usunięciu drażnienia, w ciągu kilku tygodni następowało odwrócenie zmian przywracające miozynie jej cechy pierwotne — tym samym przywracając mięśniowi cechy charakterystyczne mięśnia szybkiego.

Zmianom niektórych właściwości miozyny z mięśni szybkich i wolnych w trakcie rozwoju oraz po odnerwieniu mięśnia poświęcone były doniesienia I. Sirovy'ego (Praga, Czechosłowacja) i C. Takácsa i wsp. (Szeged, Węgry).

I. Pinset-Härstrom (Gif-sur Yvette, Francja) poruszyła zagadnienie zmienności struktury naturalnych filamentów miozyny w zależności od rodzaju mięśni, a braku jej bezpośredniego odbicia w strukturze sztucznych filamentów otrzymany przez agregację miozyny monomerycznej *in vitro*. Zwróciła ona uwagę na niektóre czynniki decydujące o możliwości odtworzenia filamentów o fizjologicznych rozmiarach i konformacji.



J. Lowy i jego współpracownicy (Aarhus, Dania) są autorami wysuniętej już kilka lat temu koncepcji, że w mięśniu gładkim kręgowców filamenty miozynowe występują w dodatkowo zagregowanej formie wstęgowatych struktur, które w niektórych warunkach mogą dezagregować na pojedyncze filamenty podobne do filamentów miozynowych z mięśni poprzecznie prążkowanych. Przeciwnie stanowisko zajmowali inni autorzy twierdząc, że wstęgowate struktury są artefaktem powstałym w wyniku agregacji pojedynczych filamentów. W swoim referacie na Zjeździe Lowy, przedstawiając nowe wyniki badań rentgenograficznych nad mięśniem gładkim, po raz pierwszy zajął bardziej dyskusyjne stanowisko co do naturalnej formy występowania miozyny w tym typie mięśnia. Zaprezentował on ponadto nowy trójwymiarowy model wstęgowatej struktury miozyny oparty na charakterystycznym upakowaniu pojedynczych filamentów, bez obecności postulowanego poprzednio dodatkowego, bliżej nieokreślonego materiału białkowego jako rdzeń wstęgi.

Referat N. A. Biró (Budapeszt, Węgry) oraz kilka krótkich doniesień z jego laboratorium dotyczyło badań nad proteolityczną fragmentacją cząsteczki miozyny. Istotnym osiągnięciem wcześniejszych badań w tej dziedzinie było określenie właściwości fragmentów cząsteczki otrzymany w wyniku umiarkowanego trawienia, przede wszystkim fragmentów posiadających zachowaną aktywność ATPazy. Badania obecne zmierzają do scharakteryzowania mniejszych peptydów uzyskiwanych po dłuższym trawieniu, w celu dokładniejszego poznania budowy cząsteczki miozyny.

Ostatnio zwrócono uwagę na obecność w preparatach miozyny z mięśni szkieletowych kręgowców śladowych ilości pewnych białek, świadcząca, jak sugerowano, o obecności tych białek jako stałego składnika filamentów miozynowych w mięśniu. Wpływem jednego z nich tzw. białka C na niektóre właściwości miozyny zajęła się I. Kąkol (Warszawa, Polska). Th. Walliman i wsp. (Zürich, Szwajcaria) omówili wiązanie kinazy kreatynowej do filamentów miozynowych oraz zaproponowali model strukturalnego ułożenia cząsteczek tego enzymu w sarkomerze odpowiedzialnego zdaniem autorów za widoczną w mikroskopie elektronowym tzw. linię M w centralnej części sarkomeru.

Dwa komunikaty z Polski (H. Strzeleckiej-Gołaszewskiej i wsp. oraz M. Dydyńskiej) poświęcone były niektórym aspektom interakcji aktyny z miozyną.

Najbardziej dynamicznie rozwijająca się w ostatnim dziesięcioleciu dziedzina biochemii mięśnia obejmuje zespół zagadnień dotyczących regulacji cyklu skurczowego przez tropomiozynę i troponinę, białka towarzyszące aktynie w cienkich filamentach mięśni poprzecznie prążkowanych kręgowców. W nieobecności wolnego  $Ca^{2+}$  tropomiozyna zajmuje w filamentach pozycję blokującą miejsce interakcji aktyny z miozyną. W tym stanie mięsień znajduje się w fazie rozkurczu. W wyniku utrzymania przez mięsień bodźca nerwowego następuje uwolnienie z systemu sarkoplazmatycznego retikulum jonów  $Ca^{2+}$ , które po przejściu do sarkoplazmy ulegają wiązaniu do troponiny, białka o wysokim i specyficznym powinowactwie do tego kationu. Związanie  $Ca^{2+}$  wywołuje zmiany konformacyjne w troponinie, które są transmitowane na ułożone wzdłuż filamentu aktynowego cząsteczki tropomiozyny powodując odblokowanie miejsc interakcji aktyny z miozyną. Wiadomo również, że troponina jest kompleksem trzech składników: TN-I — hamującego interakcję aktyny z miozyną niezależnie od stężenia jonów  $Ca^{2+}$ , TN-C — składnika odpowiedzialnego za wiązanie  $Ca^{2+}$  i po przyłączeniu wapnia antagonizującego działanie składnika TN-I, oraz TN-T — którego charakterystyczną właściwością jest wysokie powinowactwo do tropomiozyny. Obecne badania, których celem jest głębsze wnikięcie w mechanizm regulacji skurczu, koncentrują się nad wzajemną interakcją poszczególnych składników troponiny, ich interakcją z tropomiozyną i aktyną oraz zależnością wszystkich tych wielostronnych oddziaływań od stężenia wolnego  $Ca^{2+}$ . W kolejnych referatach na Zjeździe przedstawiono informacje uzyskane na ten temat przy pomocy różnorodnych metod, jak *spin-labelling*, pomiary fluorescencji

i dichroizmu kołowego (S. Ebashi i wsp., Tokio, Japonia oraz J. Gergely i wsp., Boston, USA), molekularne sączenie na żelu Sephadex, elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, badanie koprecypitacji białek w różnych warunkach oraz wpływu składników troponinowych na strukturę parakryształów tropomiozyny i aktyny (W. Drabikowski i R. Dąbrowska, Warszawa, Polska). Przedstawiono w formie plakatowej wyniki wspólnych badań R. Dąbrowskiej i wsp. (Warszawa) i Z. Podlubnej (Puszczino, ZSRR) nad interakcją TN-T i TN-I z tropomiozyną i aktyną uzyskane przy pomocy mikroskopii elektronowej. Dyskutowane na Zjeździe modele interakcji białek cienkich filamentów przedstawione przez różnych autorów różnią się jeszcze w szczegółach.

Poważnym osiągnięciem w badaniach nad białkami regulującymi jest określenie sekwencji aminokwasów w tropomiozynie (L. B. Smillie i wsp. Alberta, Kanada) i składniku troponiny TN-I (J. N. Wilkinson i wsp., Birmingham, Anglia). Omówiono również enzymatyczną fosforylację składników troponiny oraz lekkich łańcuchów miozyny (S. V. Perry i wsp., Birmingham, Anglia).

Szereg doniesień, na omówienie których brak miejsca w tak krótkim przeglądzie, wskazuje na rosnące zainteresowanie niemięśniowymi systemami kurczliwymi.

### **Izolowanie i właściwości subkomórkowych cząstek i enzymów**

W sekcji pt. „Subcellular particles” przedstawiono 8 komunikatów o różnorodnej tematyce. Dwa z nich dotyczyły analizy biochemicznej i mikroskopowo-elektronowej peroksyosomów izolowanych z wątroby karpia oraz z gruczołów Hardera i opuszkowo-cewkowych szczura. Autorzy H. Goldenberg i wsp. oraz M. Hüttinger i wsp. z Instytutu Chemii Medycznej i Instytutu Mikromorfologii i Mikroskopii Elektronowej Uniwersytetu w Wiedniu) stwierdzili, że nie wszystkie ciała wykazujące aktywność katalazy posiadają komplet enzymów charakterystycznych dla peroksyosomów w szczególności takich, jak na przykład oksydaza  $\alpha$ -hydroksykwasów, oksydaza D-aminokwasów i oksydaza moczanowa. Stwierdzono także, że obecność kryształicznego rdzenia w peroksyosomach nie stanowi cechy swoistej dla obecności oksydazy moczanowej.

Z ciekawszych prac można wymienić próby izolacji frakcji „wzbogaconych” w synaptosomy z mózgu 5-cio dniowych kurcząt. Rozdział prowadzono w skokowym gradiencie fikolu. Synaptosomy rozmieszczone były na interfazach 9—12% i 12—16% (A. B. Oestreicher, C. van Leeuwen, z Holenderskiego Centralnego Instytutu Badań Mózgu, Amsterdam).

Badania przeprowadzone na izolowanych wyspach Langerhansa pozwoliły na ustalenie, że frakcja drobinowa — osiadająca przy 10000g zawiera zespół enzymów biorących udział w procesie konwersji proinsuliny w insulinę (H. Jahr i wsp., Zentralinstitut für Diabetes, Karlsruhe).

W części poświęconej enzymom przedstawiono 41 komunikatów poświęconych głównie zagadnieniom izolacji i charakterystyki biochemicznej. Ze względu na fakt, że prawie każdy z przedstawionych komunikatów dotyczył innego enzymu przedstawię jedynie te, które wydawały się być najbardziej interesujące z punktu widzenia cytologa. Należy tutaj wspomnieć badania przeprowadzone na frakcji mitochondriów uzyskanych z komórek raka włośni Ehrlicha, przez Z. Kovačevića z Uniwersytetu w Nowym Sadzie. Autor ten wykazał, że wspomniane wyżej komórki posiadają aktywność jedynie P-zależnej glutaminazy. Aktywność tego enzymu znaleziono wyłącznie we frakcji mitochondriów, przy czym niektóre z uzyskanych wyników wskazują na jego lokalizację w matrix mitochondriales. Aktywność enzymu jest hamowana przez Triton X-100.



Bardzo interesujące wyniki zostały przedstawione przez M. V. Berridge i A. I. Aronsona z Narodowego Instytutu Badań Medycznych i Wydziału Nauk Biologicznych w Lafayette. Autorzy ci izolowali i badali aktywność endorybonukleazy obecnej w zarodkach jeżowców morskich oraz oocytach *Xenopus*. Enzym ten jest fosfodiesterazą wybiórczo hydrolizującą RNA przy resztach pirymidynowych. Poli(U) jest 30-krotnie szybciej rozszczepiany niż poli(C). Nie stwierdzono hydrolizy dwuniciowego poli(A).poli(U) jak również natywnego i zdenaturowanego DNA. 3' nukleotydową grupą końcową fragmentu „4S” RNA w warunkach *in vitro* — jest głównie urydyna. Takie same fragmenty zostały wyodrębnione z zarodków jeżowców morskich i oocytów *Xenopus* co wskazuje, że enzym ten działa w cytoplazmie w czasie rozwoju tych organizmów. Przypuszcza się, że stwierdzane fragmenty „4S” cytoplazmatycznego RNA — mogą być produktami degradacji. Nie stwierdzono aktywności endonukleazy w jądrach komórkowych.

Z innych komunikatów pragnę wspomnieć o badaniach dotyczących lokalizacji fytazy we frakcji mikrosomalnej błony śluzowej jelita szczura (A. M. Firenzuoli, A. Zanobini — Zakład Biochemii Uniwersytetu we Florencji) oraz lizozymu głównie we frakcji małych limfocytów izolowanych z ludzkich migdałków (F. Antoni, Maria Puskás, Akademia Medyczna im. Semmelweisa, Budapeszt).

Polscy biochemicy przedstawili trzy komunikaty dotyczące izolacji i charakterystyki sulfataz arylowych (K. Strzykała i L. M. Działoszyński, Poznań), D-glukozo-fosfotransferazy z *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RA (M. Szymona, H. Kowalska i J. Widomski, Lublin) oraz charakterystyki molekularnej i funkcji obojętnej proteazy izolowanej z ziarnistości leukocytów obojętnochłonnych krwi konia (A. Koj i A. Dubin, Kraków). Proteaza ta o c.c.z. około 24000, posiada optimum działania przy pH 8, w obecności 5M mocznika. Obojętna proteaza wykazuje właściwości podobne do elastazy trzustkowej, jest inaktywowana przez DFP i izocjanian butylu, jak również jest hamowana przez białka obecne we frakcji płynnej cytoplazmy leukocytów, oraz przez  $\alpha_1$ -antytrypsynę i  $\alpha_2$ -makroglobulinę.

## Błony biologiczne — struktura i funkcja

Na Sympozjum to złożyło się 20 referatów sympozjalnych i 310 komunikatów, głównie w formie doniesień plakatowych; w tej liczbie 87 komunikatów dotyczyło mitochondriów. Doniesienia podzielone były tematycznie na sesje dotyczące ultrastruktury i składników błon, zagadnień transportu jonów i nieelektrolitów, enzymów związanych z błonami, ATPaz, mitochondrialnego transportu elektronów i łańcucha oddechowego.

W sympozjum, najobszerniejszą pod względem przedstawionych doniesień była sesja „Składniki i ultrastruktura błon”. Zgodnie z najpowszechniej przyjętym modelem błony białka umieszczone są w podwójnej „płynnej” warstwie lipidowej. Referaty sympozjalne dotyczyły charakteru i wzajemnej interakcji lipidów i białek, ich rozmieszczenia i ruchliwości. Niejednorodne rozmieszczenie lipidów powoduje tworzenie się w błonie erytrocytów obszarów o różnych własnościach fizycznych; towarzyszy temu nierównomierne rozmieszczenie białek. Badania nad sztucznymi błonami wykazały wysoką specyficzność oddziaływań lipid-białko, a zastosowanie proteolitycznych i lipolitycznych enzymów pozwala stwierdzić, że oddziaływania te mogą być zarówno natury hydrofobowej jak i elektrostatycznej (L. van Deenen, Holandia). Białka penetrujące w głąb warstwy lipidowej wiążą się z lipidami hydrofobowymi rejonami spirali  $\alpha$ -helix. Potwierdzają to badania w których rekonstruowano błony erytrocytów po ich zsolubilizowaniu 2-chloroetanolem (P. Zachler, Szwajcaria). Naturalną interakcję między lipidami i białkami zaburzają ana-

stetyki. Badania fizyko-chemiczne sugerują, że zmieniają one konformację białek, wywołując tym zmianę uorganizowania lipidów w błonie (G. Curatola i wsp., Włochy).

Charakterystyczne aktywności i funkcje błon zależne są od „ruchliwości” — płynności jej składników. Imidoestry, tzw. czynniki *cross-linking*, wiążąc kowalencyjnie cząsteczki lipidów i białek „unieruchamiają” błonę i powodują na przykład zahamowanie transportu elektronów w mitochondriach i chloroplastach (W. Packer, USA).

Powszechnie przyjmowana jest teoria, że przepuszczalność i płynność błon reguluje cholesterol: obniża on ruchliwość łańcuchów kwasów tłuszczowych fosfolipidów znajdujących się w fazie płynnego kryształu, a zwiększa ich ruchliwość w fosfolipidach będących w fazie żelu. B. de Kruyff i wsp., (Holandia) omówili wpływ cholesterolu na przejście fazowe w sztucznych błonach lipidowych wykazując, że reaguje on wybiórczo z tym rodzajem molekularnym lecytyny, który ma niższą temperaturę przejścia fazowego.

Większość błon biologicznych posiada fosfolipidy rozmieszczone nierównomiernie po zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni. Tę asymetrię, jak również wymianę fosfolipidów między obiema powierzchniami błony, bada się stosując technikę NMR (L. Bergelson, ZSRR). Badając układy modelowe I. Berden (Anglia) stwierdził, że nierównomierne rozmieszczenie fosfolipidów nie jest wywołane ich różnym ładunkiem. Coraz częściej rozważany jest model, w którym kwasy tłuszczowe fosfolipidów są skierowane nie tylko do środka błony ale i na zewnątrz. Układ taki zaproponowali J. Gallay i wsp. (Francja) dla błon mikrosomalnych kory nadnerczy.

Omawiano też glikoproteidy błon biologicznych. W mikrosomach wątroby mogą być one luźno związane z błoną, ulegając łatwo solubilizacji, lub też związane ściśle (G. Dallner, Szwecja). W błonie wirusa Semliki Forest glikoproteidy tworzą „kolce” penetrujące przez błonę w głąb nukleokapsydu (H. Garoff i K. Simons, Finlandia). Grupa badaczy ze Sztokholmu scharakteryzowała i omówiła syntezę sjałoproteidów mikrosomów i cytoplazmy wątroby szczura (H. Svenson, F. Autuori, L. Linqvist, L. Eriksson, G. Dallner). Somosi i wsp. (Węgry), E. Wyroba (Polska) badali glikoproteidy błon w mikroskopie elektronowym stosując różne fizyko-chemiczne metody.

Glikolipidy błon limfocytów scharakteryzowali G. Lewis i wsp. (Anglia).

Wiele komunikatów dotyczyło charakterystyki białek błon biologicznych, na przykład spektryny (F. Hulla, RFN, O. Bjerrum, Dania). Porównanie białek integralnych i peryferyjnych błon sarkoplazmatycznego retikulum mięśni szybkich i wolnych przedstawili A. Margreth i G. Salviati (Włochy).

Niezwykle interesującym zagadnieniem jest biogeneza i dyferencja błon. W dwu doniesieniach z Polski (E. Zubrzycka, i wsp., M. Pilarska i M. G. Sarzała) przedstawiono charakterystykę błon sarkoplazmatycznego retikulum w czasie ontogenezy mięśnia szkieletowego królika. Ontogenetycznych zmian w składzie białkowym mieliny dotyczył komunikat B. Zgorzelewicz (RFN).

Ponieważ składniki błon charakteryzuje się często po ich rozdzieleniu i wyodrębnieniu, w kilku komunikatach przedstawiono zastosowanie różnych czynników solubilizujących. Omówiono również izolację i oczyszczanie błon przy pomocy różnych metod, na przykład zonalnego wirowania (A. Schlegel i R. Schwyzer, Szwajcaria). Zastosowanie mikroskopu elektronowego i innych nowoczesnych technik było tematem kilku doniesień, na przykład mikroskop kontrastowo-fazowy z jednoczesnym zastosowaniem polaryzacji i interferencji światła pozwala na badanie żywych błon (J. Zangger i M. Taufer, Austria).

W sesji poświęconej ATPazom wiele komunikatów omawiało zależność aktywności tych enzymów od obecności fosfolipidów w błonie. Usunięcie fosfolipidów hamuje aktywność ATPaz (B. Siemon i wsp., RFN), która może być przywrócona



dotatkami określonych fosfolipidów (J. Walker, Anglia; B. Rolofson i L. van Deenen, Holandia), ale tylko wtedy kiedy aktywność enzymu nie została zahamowana całkowicie (N. Green, Anglia). Lipidy obojętne nie pełnią tak specyficznej roli w aktywności ATPazy. Usunięcie całego cholesterolu i tylko 25% fosfolipidów nie wpływa na aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy błon erytrocytów. Enzym jest słabo hamowany przez wybiórcze usunięcie sfingomieliny (B. Rolofson i L. van Deenen, Holandia). Aktywność ATPazy błon sarkoplazmatycznego retikulum, posiadających zdolność do aktywnego transportu wapnia, omawiana była w kilku doniesieniach (V. Madeira i wsp., Portugalia; J. Suko i W. Hasselbach, Austria, RFN; N. Green, Anglia). W sesji tej I. Dobosz i wsp. (Polska) przedstawili komunikat, w którym scharakteryzowali błony sarkoplazmatycznego retikulum i błony plazmatyczne u szczurów miotonicznych.

Rozmieszczenie wielu białek w błonie jest ostatnio szeroko omawianym tematem. Dotyczy to zarówno białek integralnych, penetrujących błonę niekiedy wzdłuż całej jej grubości, jak i białek powierzchniowych, tak zwanych peryferyjnych. W sesji „Enzymy związane z błonami” w wielu doniesieniach omawiano lokalizację enzymów w błonach plazmatycznych i wewnątrzkomórkowych, ich usytuowanie po wewnętrznej lub zewnętrznej powierzchni błony. Na przykład stosując przeciwciała przeciwko całej komórce, jedowanie w odpowiednich warunkach i badając rozkład badanego zewnątrzkomórkowo substratu Newby i wsp. (Anglia) stwierdzili, że 5' nukleotydaza zlokalizowana jest po zewnętrznej stronie błony plazmatycznej komórek tłuszczowych. W sesji tej w referacie z Polski (E. Janczura i wsp.) omówiono genetyczne uwarunkowanie glukozylacji lipopolisacharydów u bakterii.

W sesji dotyczącej wybranych zagadnień w kilku doniesieniach omawiano system transportujący elektrony u bakterii (A. Paterson i wsp., Szkocja; N. Pytewa, ZSRR). A. Jasaitis i A. Kondrasnin (ZSRR) zrekonstruowali system transportujący elektrony i protony z lipidów, oksydazy cytochromowej, cytochromu i bakteriorodopsyny. Omówiono specyficzne receptory dla hormonów znajdujących się bądź w cytoplazmie bądź na powierzchni komórek (D. Duval i wsp., Francja; S. Gammeltoft i J. Gliemann, Dania; J. Zapf i wsp., USA) i receptory dla różnego typu związków, na przykład glutamianu (R. James, G. Lunt, Anglia). W sesji tej omówiono wpływ promieniowania  $\gamma$  na zależne od temperatury elektryczne przewodnictwo zawiesiny erytrocytów (G. Bartosz i wsp., Polska).

## Transport przez błony biologiczne

Dwie sesje wykładowe poświęcono zagadnieniu transportu przez błony biologiczne. Obserwuje się wyraźny wzrost liczby prac dotyczących tej tematyki, prezentowanych zarówno w piśmiennictwie jak i na zjazdach naukowych. W większości prac nadal materiałem są erytrocyty, mitochondria lub komórki nabłonkowe, coraz szerzej jednak korzysta się z modelowego układu jaki dostarczają sztuczne błony lipidowe — *black films*.

Zagadnieniem szeroko dyskutowanym na Zjeździe był mechanizm sprzęgania transportu przez błonę z energią nietermiczną. Gdy występuje jakiegokolwiek sprzężenie tego rodzaju transport nazywamy aktywnym. Do opisu sprzężenia transportu z energią nietermiczną stosuje się najczęściej trzy modele mechanizmów (A. Kotyk, Praga; E. Hainz, Frankfurt nad Menem) — system fosfotransferazy u bakterii: 1) sprzężenie bezpośrednio związane z reakcją chemiczną (np.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPaza), 2) sprzężenie przepływu z przepływem (np.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  — symport w bakteryjnym pobieraniu cukrów), 3) sprzężenie przez chemiczną modyfikację substancji transportowanej. Zakłada się zwykle, że sprzężenie energii z transportem zachodzi przez

zmianę konformacyjną białka transportującego, co wiąże się z kolei ze zmianami w jego ruchliwości, jego powinowactwie do substancji transportowanej czy też w jego otoczeniu.

Z bardziej szczegółowych doniesień na uwagę zasługuje ciekawe podsumowanie kilkuletnich badań (G. Semenz, Zurich) nad kompleksem enzymatycznym sacharazy-izomaltazy z jelita cienkiego. Autor postuluje udział tego kompleksu w transporcie galaktozy i fruktozy przez błonę komórkową.

Do zagadnień szeroko dyskusowanych podczas Zjazdu należał problem wzajemnych oddziaływań białek i lipidów w błonach biologicznych. Ogólnie akceptowany model błony biologicznej jako „płynnej” struktury mozaikowej, przypisuje dużą rolę wzajemnym oddziaływaniom białek i lipidów. W szczególności omawiano wpływ zmiany stanu skupienia lipidów w błonie na enzymy błonowe. Liczni badacze przedstawiali efekty zmian temperatury na właściwości białek błonowych. Na wyróżnienie zasługuje ciekawe doniesienie J. M. Haslama (Liverpool). Porównał on z sobą preparaty mitochondrialne o różnej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych. Mitochondria takie udało mu się otrzymać przez hodowlę mutantu drożdżowego, ole-1, na pożywkach o różnej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych. Mitochondria o znacznie zaniżonym poziomie nienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych (20%) są rozprężone w temperaturze pokojowej. ATPaza mitochondrialna której aktywność związana jest ze stanem błony mitochondrialnej, w zależności swej aktywności od temperatury (krzywa Arrheniusa) wykazuje wyraźnie przegięcie w temperaturze 27°C. Mitochondria otrzymane z komórek hodowanych na pożywce z dodatkiem nienasyconych kwasów tłuszczowych (83% nienasyconych kwasów tłuszczowych w lipidach błonowych) są sprężone w temperaturze pokojowej i punkt przegięcia krzywej Arrheniusa dla aktywności ATPazy znajduje się w temperaturze 8°C. Stąd też, autor wnioskuje, iż skład lipidowy błony wpływa na minimalną temperaturę w której można stwierdzić sprężenie mitochondriów.

Wiele prezentowanych prac dotyczyło mitochondriologii. W dziedzinie tej następuje stały rozwój takich nurtów badawczych, jak badania nad transportem przez błony mitochondrialne, oksydacyjną fosforylacją, biogenezą mitochondriów i ich składników białkowych i lipidowych czy też powiązaniem między metabolizmem mitochondrialnym i cytoplazmatycznym. J. Williamson, K. LaNoue, (Filadelfia) przedstawili wyniki, które pozwalają postulować regulację metabolizmu komórkowego, w szczególności takich przemian jak cykl mocznikowy czy glukoneogeneza, na poziomie transportu asparagianinu przez błonę mitochondrialną. Od kilku lat dyskutuje się możliwość regulacji metabolizmu komórkowego na poziomie innego mitochondrialnego układu transportowego, translokazy nukleotydów adeninowych. Temu zagadnieniu poświęcono nawet na Zjeździe dyskusję okrągłego stołu, zorganizowaną przez prof. L. Wojtczaka (Warszawa) i prof. J. M. Tagera (Amsterdam). W dyskusji wzięło udział kilkudziesięciu uczestników, wśród nich tej miary biochemicy jak: prof. P. V. Vignais (Grenoble), prof. van den Bergh (Utrecht), prof. J. Williamson (Filadelfia) i inni. W toku dyskusji podsumowano stan wiedzy o hamowaniu translokazy nukleotydów adeninowych przez naturalnie występujące w organizmie każdego zwierzęcia tioestry kwasów tłuszczowych i CoA, acylo-CoA. Od lat postuluje się fizjologiczną rolę tego hamowania w regulacji metabolizmu komórkowego, jak na razie brak jednak potwierdzenia tej hipotezy wynikającego z badań na całych komórkach. Pierwsze doniesienia z takich badań nakazują wielką powściągliwość przy odnoszeniu badań nad hamowaniem translokacji nukleotydów adeninowych *in vitro* do sytuacji fizjologicznej.

W sesji zatytułowanej „Enzymy i funkcjonalne jednostki łańcucha oddechowego” przedstawiono prace dotyczące między innymi wstępowania pojedynczego cytochromu P-450 w mikrosomach wątroby szczura (C. Barone, C. Massacci i wsp., Włochy),



oraz własności cytochromu  $c_3$  i jego roli w transporcie elektronów w chromatoforach z *Rhodospirillum rubrum* (M. Baltscheffsky, B. Frąckowiak, Szwecja). Wever i wsp. z Holandii prezentowali wyniki badania fotooksydacji kompleksu karboksy-cytochrom c oksydazy metodą EPR, a Z. Kaniuga i K. Staroń z Polski dyskutowali występowanie odmiennej wrażliwości jądrowej i mikrosomalnej reduktazy cytochromu c na tenonitrltrójlfluoroaceton.

Inna polska grupa (Pastuszko i wsp.) przedstawiła dane dotyczące mechanizmu regulacji dehydrogenazy izocytrynianowej we frakcji cytoplazmatycznej komórek centralnego systemu nerwowego. Autorzy postulują występowanie aktywnego centrum, zawierającego grupy  $-SH$ , na które oddziałują inhibitory tego enzymu (ATP, NADH i NADPH).

Niewątpliwie najciekawszym komunikatem tej sesji było doniesienie P. Cerletiego i wsp. z Włoch. Badając rekonstrukcję dehydrogenazy bursztynianowej autorzy wyjaśnili funkcję innego enzymu mitochondrialnego — rodanazy. Wiadomo, że rodanaza występuje w mitochondriach w dużej ilości. Enzym ten badano stosując niefizjologiczną reakcję przejścia cyjanku w rodanek, nie umiano jednak wytłumaczyć biologicznej roli rodanazy. Wydaje się, że w mitochondriach enzym ten regeneruje labilną siarkę niektórych dehydrogenaz i w ten sposób otrzymuje ich aktywność.

### Biochemia lipidów

Komunikaty tej sesji dotyczyły składu lipidowego tkanek, problemów biosyntezy lipidów oraz niektórych zagadnień wybranych.

W zakresie metabolizmu dwa z przedstawionych komunikatów dotyczyły „aktywacji” kwasów tłuszczowych. I tak na podstawie danych kinetycznych Groot i wsp. z pracowni prof. Hülsmana w Rotterdamie sugerują występowanie oddzielnego enzymu w mitochondriach wątroby świnki morskiej katalizującego aktywację kwasu propionowego. Enzym ten według ich poglądów mógłby występować obok syntetazy acetylo-CoA. Kwasy tłuszczowe o średniej długości łańcucha poczynając od kwasu zawierającego 4 atomy węgla w cząsteczce byłyby aktywowane przez inny specyficzny enzym. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja syntetazy acylo-CoA długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w brunatnej tkance tłuszczowej była tematem doniesienia Pedersena i wsp. z Oslo. Według tych autorów enzym w tej tkance wydaje się być głównie zlokalizowany w zewnętrznej błonie mitochondriów a nie w endoplazmatycznym retikulum. Udział dwóch systemów mitochondrialnego i mikrosomalnego w procesie biosyntezy kwasów tłuszczowych poprzez tak zwane wydłużanie łańcucha był tematem doniesienia Quagliariello i wsp. (Włochy). Autorzy ci stosując kwas p-chlorofenoksy-izomasolowy (Cofibrate) zaobserwowali, iż hamuje on wyłączenie system mikrosomalny i to nawet w stopniu znacznie większym aniżeli syntezę *de novo* z malonylo-CoA katalizowaną przez frakcję cytoplazmatyczną. Dwa inne doniesienia dotyczyły zagadnienia biosyntezy fosfolipidów alkiłowych. Radomińska-Pyrek i wsp. (Polska) przedstawili dane dotyczące hamowania syntezy alkiło-acylo-glicerolofosfocholiny i fosfoetanoloaminy przez nienasycone kwasy tłuszczowe. Kwasy te nie hamują bądź nawet działają stymulująco na syntezę fosfolipidów dwuacylowych. Paltauf (Austria) doniósł o występowaniu we frakcji cytoplazmatycznej wątroby czynnika natury białkowej stymulującego desaturację 1-O-alkil-*sn*-glicerolofosfoetanoloaminy katalizowaną przez frakcję mikrosomalną śledziony.

Z zakresu badań nad wymianą cząsteczek fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi i sztucznymi wykazano możliwość transportu netto fosfatyloinozytolu do liposomów zbudowanych wyłącznie z lecytyny i kwasu fosfatydowego (Zborowski i Wojtczak, Polska i Helmkamp i wsp., Holandia). Proces ten stwierdzony został

zarówno przy użyciu frakcji cytoplazmatycznej wątroby jak i oczyszczonych białek z tkanki mózgowej. Według danych Helmkampa i wsp. z frakcji cytoplazmatycznej tkanki mózgowej można wyizolować dwa aktywne białka o zbliżonym ciężarze cząsteczkowym (około 30 000) odpowiedzialne za wymianę fosfatydyloinozytolu. Białka te różniły się nieco w odporności na trawienie trypsyną. W przeciwieństwie do opisanego wcześniej przez Wirtza białka odpowiedzialnego za wymianę lecytyny nie były one tak wysoce specyficzne i katalizowały obok wymiany fosfatydyloinozytolu również i wymianę lecytyny. Transport fosfatydyloinozytolu do liposomów „lecytinowych” został również wykazany przez Bergelsona (ZSRR) przy użyciu metody magnetycznego rezonansu jądrowego NMR.

### Regulacja biosyntezy aminokwasów

Do ważniejszych doniesień dotyczących regulacji biosyntezy aminokwasów w mikroorganizmach, a prezentowanych w czasie kongresu należą wyniki prac grupy J. C. Patte'a (Orsay, Francja) nad aspartokinazami *E. coli*. Bakteria ta posiada trzy różne aspartokinazy związane z drogami biosyntezy odpowiednio lizyny, treoniny i metioniny. I tak lizyna hamuje aktywność aspartokinazy III, a enzym hamuje aspartokinazę II, a aspartokinaza I ulega represji przez metioninę. Enzymy I i II wykazują jednocześnie aktywność dehydrogenazy homoserynowej. P. Truff-Bachi (Instytut Pasteura) stwierdził, że przeciwciała anty aspartokinazie I łączą się również z aspartokinazami II i III co wskazuje na pokrewieństwo tych enzymów i sugeruje, że geny kodujące te enzymy mogły powstać przez powielenie jednego pierwotnego genu i następującą po tym ewolucję tych duplikatów.

Zupełnie inną sytuację obserwuje się w *Acetobacter aceti*, w której to bakterii występuje tylko jedna aspartokinaza będąca różnym białkiem od dehydrogenazy homoserynowej i podlegająca hamowaniu przez kombinacje lizyny i treoniny (J. O'Sullivan, Szwajcaria).

W ostatnich latach bardzo posuwały się prace nad wyjaśnieniem mechanizmu regulacji operonu histydynowego u *Salmonella typhimurium* i *E. coli*. R. Cortese (Włochy) referował pracę nad rolą histydyny-tRNA<sup>HIS</sup> w regulacji tego operonu (problematyka ta wyszła z pracowni B. N. Ames, USA). Okazuje się, że wszystkie mutacje regulacyjne dotyczące tego operonu z wyjątkiem mutacji operatorowych dotyczą genów związanych z powstawaniem histydynylo-tRNA. Wykazano szczególnie rolę w regulacji pseudourydyny w rejonie antykodonu w tRNA. Mutanty pozbawione aktywności enzymu modyfikującego tRNA, który przekształca uracyl w pseudourydynę mają charakter plejotropowy. Stwierdza się u nich także derepresję operonów *leu* i *ilv* co świadczy, że zmodyfikowane tRNA uczestniczy w regulacji wytwarzania enzymów biosyntezy leucyny, izoleucyny i waliny. Jak dotąd nie znaleziono genu wytwarzającego aporepresor w systemie regulacji histydyny. Okazuje się, że rolę aporepresora w tym systemie spełnia prawdopodobnie enzym fosforybzylo-ATP pyrofosforylaza (E.C.2.4.2.17) kodowany przez gen *G*. Wykazał to F. Blasi (Włochy) w doświadczeniach *in vitro*, w których badano transkrypcje operonu histydynowego.

Prace nad biosyntezą aminokwasów siarkowych z grzybów ujawniły istnienie różnych mechanizmów regulacji tej biosyntezy w komórkach przedstawicieli różnych gatunków. W przypadku *Saccharomyces cerevisiae* stwierdzono dwa systemy regulacyjne: pierwszy działa na poziomie transkrypcji i efekтором (korepresorem) jest w nim metionyno-tRNA<sup>Met</sup>, drugi zaś najprawdopodobniej na poziomie translacji i efekтором jest w nim adenosylometionina (grupa de Robichon-Szulmajster, Francja). W komórkach *Aspergillus nidulans* rolę efektorów w systemie represji tych



samych enzymów biosyntezy aminokwasów siarkowych, które były badane u drożdży spełniają cysteina i homocysteina (A. Paszewski i J. Grabski).

Z badań nad biosyntezą aminokwasów siarkowych w bakteriach na uwagę zasługuje otrzymanie dwóch nowych mutacji regulacyjnych u *Salmonella*: jedna powoduje niewrażliwość syntetazy cysteinowej na represję, druga powodująca ośmiokrotne zwiększenie wytwarzania transacetylazy serynowej (D. Hulanicka, T. Kłopotowski). Ciekawe obserwacje poczynili S. Laakso i wsp. (Finlandia), którym udało się adaptować *Pseudomonas fluorescens* do wzrostu na DL-metioninie jako jedynym źródłem węgla. Stwierdzili przy tym, że metionina jest w tych warunkach także źródłem cysteiny. Dotychczas nie jest u bakterii znana droga przekształcania metioniny w cysteinę.

### Własności oczyszczanych cholinergicznyc i adrenergicznych receptorów

W referacie kolokwialnym De Robertis (Argentyna) przedstawił ogólne dane dotyczące wyodrębnienia i własności białek receptorowych. Substancje receptorowe są białkami hydrofobowymi stanowiącymi integralną część błony. Białka receptora cholinergicznego otrzymuje się głównie z tkanki elektrycznej i mięśni szkieletowych, natomiast białka receptorów adrenergicznych z mięśnia komory serca. Izoluje się je z błon komórkowych przy pomocy detergentów lub rozpuszczalników organicznych. Do oczyszczenia białek receptorowych stosuje się często chromatografię powinowactwa.

Często stosowaną metodą badania własności receptora jest użycie toksyn łączących się specyficznie z danym białkiem receptorowym. Z obserwacji takich kompleksów w mikroskopie elektronowym wynika, że receptor cholinergiczny z tkanki elektrycznej *Torpedo* składała się z podjednostek o masie 45 000 daltonów (Nickel, RFN). Podobne wyniki otrzymała Heilbronn (Szwecja) prowadząc rozdział elektroforetyczny białek receptorowych. Stwierdziła ona występowanie dwóch białek (295 000 i 410 000 daltonów) dysocjujących na podjednostki o masie około 50 000 daltonów. Doświadczenia z zastosowaniem dializy równoważnej (Walser, Szwajcaria) lub chromatografii powinowactwa (Kriwaczek, Szwajcaria) potwierdziły postulowaną wcześniej odrębność strukturalną i funkcjonalną receptora cholinergicznego i białka o aktywności esterazy acetylocholinowej.

Przedstawione wyniki badań własności receptora adrenergicznego dotyczyły głównie wpływu związków stymulujących ten receptor (serotonina, noradrenalina) na aktywność cyklazy adenylowej. Stwierdzono, że jest to zależność specyficzna gatunkowo (Wollemann, Węgry). Obserwowano również stymulujący efekt neurohormonów na aktywność  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPazy z mózgu szczura (Wollemann, Węgry).

Ważnym zagadnieniem prowadzącym do wyjaśnienia mechanizmu przekaźnictwa synaptycznego jest badanie metabolizmu neurotransmiterów. Wiele tego typu badań wykonuje się wykorzystując hodowle tkankowe (Massarelli, Francja) lub izolowane narządy (Widlund, Szwecja; Hiripi, Węgry; Adamic, Jugosławia). Niektóre prace omawiały doświadczalnie wywołane zmiany ilości neurotransmitera w tkance (Seyfried-Potempska, Polska; Kibby, Anglia).

Dużo uwagi poświęcono również problemom metodycznym, jak na przykład nowe metody oczyszczania białek receptorowych, frakcjonowanie wirowanie zakończeń nerwowych. Na uwagę zasługuje fakt, że coraz częściej stosuje się metody immunologiczne (Jørgensen, Dania).

## Biochemia i molekularna biologia krzepnięcia krwi

W sekcji „Biochemia i molekularna biologia krzepnięcia krwi” następujące prace wzbudziły największe zainteresowanie. S. Magnusson (University of Aarhus, Dania) przedstawił olbrzymi postęp ostatnich lat w poznaniu pierwszorzędowej struktury protrombiny i jej aktywacji. Ustalono pełną sekwencję aminokwasów tego jednołańcuchowego białka o masie cząsteczkowej 69 000. Poznano kolejne etapy ograniczonej proteolizy przez czynnik Xa — mechanizm przejścia protrombiny w trombinę (masa cząsteczkowa 39 000) składająca się z 2 łańcuchów polipeptydowych (A-49 B-259 aminokwasów) połączonych mostkiem S—S. Wykazano, że anomalna protrombina syntetyzowana w nieobecności witaminy K różni się od normalnego proenzymu mniejszym elektrycznym ładunkiem ujemnym peptydu otrzymanego po trawieniu protrombiny trypsyną. Brak witaminy K ma powodować upośledzenie post rybozomalnej modyfikacji protrombiny, w wyniku której w resztkach kwasu glutaminowego w pozycjach 7 i 8 pojawiają się 2 dodatkowe grupy karboksylowe, zwiększające ujemny ładunek tej okolicy cząsteczki. Muczбек (Węgry) i Laki (USA) wykazali, że trombina w pH 8,0 i w nieobecności jonów  $Ca^{++}$  degraduje aktywną do dwóch par peptydów (masa cząsteczkowa 26 000 i 10 000). Szybsza jest reakcja trombiny z F niż z G aktywną. W czasie katalizowanego przez trombinę krzepnięcia czystego fibrynogenu w obecności F-aktywny ostatni ulega stechiometrycznemu wiązaniu z monomerym fibryny w stosunku 2:1. Wydaje się, że trombina może wyzwać te same reakcje pomiędzy fibryną i białkiem kurczliwym płytek tak zwanych trombosteniną lub aktomiozynom płytkowym. Bejun i wsp. (Węgry) badali hamowanie krzepnięcia fibrynogenu pod wpływem trombiny przez 2 trójpeptydy Gly-Val-Arg i Gly-Pro-Arg. Pierwszy z tych peptydów zajmuje pozycję 14—16 drugi 17—19 od  $NH_2$ -końca łańcucha  $\alpha$  fibrynogenu. Wiązanie arginyłowe 16—17 jest miejscem szybkiego ataku trombiny w którego następstwie odszczepiany jest fibryno peptyd A (1—16). Trombina ma zdolność również do hydrolizy wiązania 19—20 z dużą mniejszą szybkością. Wykazano, że wyżej wspomniane peptydy hamują krzepnięcie oraz, że ich aktywność inhibitorowa znacznie wzrasta gdy grupa  $COOH$  końcowa zostaje zastąpiona przez  $CHO$  lub  $CH_2OH$ .

Ekenstain i wsp. (Szwecja) przedstawili wyniki badań nad syntezą substratu N-benzoyl-L-Ph-L-Val-L-Arg-p-nitroanilid-HCl dla proteaz serynowych i kinetyką reakcji szeregu enzymów (trombina, plazmina, trypsyna, brinaza, reptilaza) z tym syntetycznym substratem. Zastosowanie prostej metody kalorymetrycznej dla śledzenia aktywacji plazminogenu i protrombiny zreferował Latałło (Polska). Węgrzynowicz i wsp. (Polska) przedstawili wyniki badań nad rozmieszczeniem  $^3H$  w fibrynogenie acetylowanym bezwodnikiem kwasu octowego zawierającym atom trytu w grupie metylowej. Stwierdzenie preferencyjnej inkorporacji  $^3H$  do odszczepianego przez trombinę fibrynopeptydu A czyni tak acetylowany fibrynogen dogodnym substratem dla badania enzymatycznej fazy krzepnięcia. Ani jod radioaktywny ani danyl nie ulegają wbudowaniu do fibrynopeptydów ludzkiego i wołowego fibrynogenu. Krajewski i Wachowicz (Polska) wykazali, że trombocyty ptaków nie podlegają agregacji przez czynniki zlepiające płytki ssaków i że wiąże się to zapewne ze stwierdzoną przez autorów znacznie niższą zawartością nukleotydów adeninowych w trombocytach ptasich.

## Czynniki antyrakowe i antywirusowe

W sekcji „Czynniki przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe” przedstawiono 32 komunikaty, z czego 6 na jednej z sesji przedpołudniowych w postaci referatów, pozostałe zaś w formie plakatowej (poster).



Interesujący był referat J. M. Baló-Banga i wsp. (Budapeszt), który mówił o wpływie antyblastycznych heksitoli na aktywność metaboliczną DNA i RNA. Mitolactol (DBD, 1,6-dwubromodulcytol) i diepoxydulcytol(DAD), substancje używane w praktyce klinicznej, hamowały włączanie  $^3\text{H}$ -tymidyny *in vivo* i *in vitro* do DNA komórek rakowych Yoshida. Stwierdzono przy tym, że znakowanie satelitarnego DNA było 5—10 krotnie bardziej zredukowane niż głównej frakcji DNA. Wyższe dawki heksitolu hamowały również włączanie  $^3\text{H}$ -urydyny do wszystkich frakcji jądrowego RNA. Przy odpowiednio niskich dawkach i krótkim działaniu stwierdzono indukcję odbudowy DNA i podwyższenie włączania prekursora do pewnych frakcji jądrowego RNA. Syntezę jąderkowego rRNA natomiast hamują nawet niskie dawki heksitoli. H. Chelibanova-Lorer (Sofia) przedstawiła badania nad wpływem D-glukozaminy i D-galaktozaminy na urydynofosforany nowotworu szpiku i wątroby myszy oraz na włączanie kwasu  $^{14}\text{C}$ -orotowego do nukleotydów rRNA i nukleotydów rozpuszczalnych w kwasie. D-glukozaamina bardziej hamowała tempo włączania prekursora do nukleotydów w komórkach nowotworowych, podczas gdy D-galaktozamina wywierała większy wpływ na komórki prawidłowe wątroby. Głównym produktem otrzymanym po zastosowaniu obu tych aminocukrów była UDP-N-acetyloheksosoamina, której zawartość wzrastała kilkakrotnie zarówno w komórkach nowotworowych i wątrobie. M. Szekerke (Budapeszt) omówił badania nad wyjaśnieniem mechanizmu i specyficzności funkcji nośnikowej w lekach przeciwnowotworowych związanych z nośnikami peptydowymi. Przebadano temperatury topnienia modelowych estrów dwupeptydowych z DNA i wykazano, między innymi, zależność interakcji od stosunku peptyd/zasada. Conroy P. J., (Anglia) w swoim wystąpieniu przedstawił wpływ nienasyconego aldehydu 4-hydroksy-2-pent-en-1-al(HPE) na włączanie *in vitro* radioaktywnych prekursorów do komórek przeszczepialnych nowotworów (Ehrlich carcinoma, Gardner lymphosarcoma i Sarcoma 180). Stwierdził on obniżenie włączania  $^3\text{H}$ -tymidyny do DNA w 90—99% i znacznie mniejsze hamowanie włączania  $^3\text{H}$ -urydyny do RNA i  $^3\text{H}$ -leucyny do białek (30—50%). Cysteina, dodana na 30 minut przed traktowaniem komórek nowotworowych HPE, częściowo chroniła przed działaniem tego nienasyconego aldehydu, który chętnie reaguje z grupami SH.

Spośród prac przedstawionych w formie afiszowej znaczna część stanowiła nowe osiągnięcia w tym zakresie. E. Gönczöl i wsp. (Węgry) wykazali rozpad DNA w mysich komórkach L lub w komórkach HEP-2, do form DNA o niskim ciężarze cząsteczkowym, po infekcji tych komórek wirusem opryszczki pospolitej (*Herpes simplex*). Niskocząsteczkowe DNA pojawiały się po 8—10 godzinach i ilość ich wzrastała w czasie do 24 godzin. Cytomegłowirus powodował także komórkową fragmentację DNA w skażonych komórkach ludzkich fibroblastów, zjawisko to jednak obserwowano dopiero po 48—72 godzinach. B. N. Stepanienko i wsp. (Moskwa) syntetyzowali 5 różnych analogów i stereoisomerów urydyny o działaniu antywirusowym, z których największą aktywność wykazywała beta-D-ksylofuranozylotymina. Ilona L. Kahan i wsp. (Węgry) przedstawiła badania nad arginazą jako czynnikiem przeciwwirusowym, a występującym w ludzkich oraz króliczych łzach. Enzymy te różnią się od produkowanych w wątrobie pod względem ruchliwości elektroforetycznej. S. Singh i wsp. (Hamburg) prezentował wyniki badań etylo-dezoksyurydyny (EDU), aktywnej wobec wirusa opryszczki. Substancja ta o bardzo małej toksyczności jest obiecującym czynnikiem w chemioterapii pewnych typów nowotworów. EDU wykazuje zdolność do synchronizacji mysich komórek L, włącza się do DNA tych komórek bez wpływu na aberację chromosomów w stężeniach do 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . J. M. Hais i wsp. (Czechosłowacja) przebadali cytostatyki pochodne kwasów akrylowego i krotonowego wykazując, że czynniki te hamują dekarboksylazę aromatycznych L-aminokwasów. Przyczynowego stosunku między tą inhibicją i działaniem cytostatycznym jednak jeszcze nie wykazano, substancje te bowiem działają także na inne enzymy. Być może, że rodzaj interakcji odpowiedzialnej za działanie cytostatyczne jest analogiczny z od-

powiedzialnym za ich wpływ inhibitorowy na enzymy. Bardzo interesujący wydaje się wpływ soku z czerwonego buraka na wzrost kilku zwierzęcych nowotworów. Doniesienie na ten temat przedstawił E. Tyihák i wsp. (Węgry). Sok ten powodował 50—60% opóźnienie wzrostu nowotworów, a czynnikami wywołującymi ten efekt okazały się białka zasadowe zawierające N<sub>ε</sub>-metylowaną lizynę i N<sup>ε</sup>-metylowaną argininę.

W obradach tej sekcji swoje doniesienia prezentowały również zespoły z Polski. Zainteresowanie wzbudziła praca J. Grundboeck-Juško (Polska), dotycząca oczyszczania chalonu z frakcji subkomórkowych śledziony wołowej. Stwierdzono, że komórki śledziony wołowej posiadają dwa chalony, z których jeden wykazywał aktywność antymitotyczną w stosunku do komórek śledziony myszy, drugi w stosunku do komórek węzłów limfatycznych. Dwa te chalony różnią się wyraźnie ruchliwością elektroforetyczną na żelu poliakrylamidowym. Przedstawiciele Ośrodka warszawskiego W. Rossowski i wsp. izolowali komponenty białkowe z powierzchni komórek nowotworowych leukemii L-1210. Otrzymali kilka frakcji zawierających <sup>3</sup>H-fukozę, z których najbardziej radioaktywna była glikoproteidem o właściwych H-2<sup>d</sup> antygenowych. Niektóre z pozostałych frakcji, znakowanych w mniejszym stopniu wykazywały nowotworową aktywność antygenową. Ośrodek białostocki przedstawił badania nad charakterystyką pewnych nowotworów. E. Bańkowski przedstawił wyniki badań nad nierozpuszczalnym kolagenem z nowotworu indukowanego u szczurów metylocholanrenem. W. Gałasiński scharakteryzował kwasy nukleinowe izolowane z tkanek szczurów z doświadczalnym nowotworem Guerin. W. Rzeczycki ilustrował wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem polikationów na efekt Pasteura. Wyniki tej pracy pozwalają na sugestię, że zmiany metaboliczne mitochondriów wątroby szczura wywołane przez protaminę lub inne zasadowe polikationy są podobne do zmian w mitochondriach izolowanych z tkanek nowotworowych.

### Mechanizm działania i regulacji enzymów

W ramach powyższej sekcji zostało wygłoszonych 22 referatów sympozjalnych, 59 komunikatów oraz 236 prac przedstawiono na sesjach plakatowo dyskusyjnych. Z Polski prezentowano 3 komunikaty a 19 prac przedstawiono w postaci plasz i plakatów.

Referaty sympozjalne obejmowały 3 grupy tematyczne. Pierwsza dotyczyła działania i regulacji enzymów w aspekcie strukturalnym i kinetycznym. W trzech referatach szkoła węgierska przedstawiła swoje osiągnięcia w badaniach nad dehydrogenazą D-gliceroaldehydo-3-fosforanu (GPDH) i aldolazą. Z pozostałych referatów bardzo ciekawy przedstawił Luisi wsp. o mechanizmie reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę alkoholową. Autorzy, przy pomocy techniki zatrzymanego przepływu wykazali, że w dwufazowo przebiegającej reakcji utlenienia alkoholu benzyłowego, faza szybka ulega zmianie na skutek izotopowego podstawienia deuterem atomów wodoru w grupie metylenowej. Natomiast zastąpienie NAD, jego tiolowym analogiem, prowadzi do wzrostu o rząd liczby obrotów enzymu z jednoczesnym zanikiem dwufazowego przebiegu katalizowanej reakcji. Doświadczenia te pozwoliły wykazać, że czynnikiem ograniczającym reakcję w natywnych warunkach jest desorpcja zredukowanej cząsteczki koenzymu.

W drugiej grupie tematów sympozjalnych, które poświęcono interakcji enzymów w układach złożonych zwracał uwagę referat Lynena tyczący wielofunkcyjnego kompleksu syntetyzującego kwasy tłuszczowe. Genetyczny aspekt powyższych badań przedstawił Schweizer dowodząc, że 8 różnych biochemicznie funkcji wieloenzymowego kompleksu syntetazy kwasów tłuszczowych jest kodowanych przez dwa



różne loci, w których fuzje genów pozwoliły na wytworzenie bardzo ścisłych związków strukturalnych i funkcjonalnych wśród enzymów kompleksu syntetazy kwasów tłuszczowych.

Trzecie sympozjum dotyczyło regulacji aktywności enzymów *in vivo*. Z ogłoszonych prac dwie zwróciły szczególną uwagę: jedna przedstawiona przez Rapaporta, w sposób syntetyczny ujmowała dotychczasową wiedzę odnośnie regulacji przemian w erytrocytach ze szczególnym uwzględnieniem ciągu glikolitycznego; druga przedstawiona przez Holzera poświęcona była omówieniu roli proteaz w rozwoju komórek drożdżowych.

Wśród sesji naukowych obejmujących komunikaty (5 grup tematycznych), wysoce specjalistyczną a zarazem bardzo licznie reprezentowaną grupę (16 doniesień w tym 2 z Polski) stanowiły prace odnoszące się do dehydrogenazy D-gliceroaldehydo-3-fosforanu. Dwie z przedstawionych prac zmierzały do wyjaśnienia przyczyn mikroheterogenności krystalicznych preparatów GPDH, którą zaobserwowano jeszcze w latach 1968—1969 (*Biochemistry* 7, 1671 (1968); *Science* 165, 1260 (1969)). Maretzki i wsp. na podstawie badań immunologicznych i elektroogniskowania wysunęli przypuszczenie, że mikroheterogenność wywołana jest wtórną zmianą cząsteczek dehydrogenazy na skutek preparacji. Podobny wniosek można było wysunąć na podstawie doniesienia Boiteux i Hess, którzy pokazali, że kinetyczne właściwości GPDH z drożdży zależą od preparacji. Wyniki te, jak i wcześniejsze badania wykazujące identyczność struktury I-rzędowej 4 podjednostek tego enzymu stanowią interesujący punkt wyjścia do dalszych badań. Kilka dalszych prac, w tym jedna z Polski, dotyczyło funkcji oraz mechanizmu wymiany podjednostek w GPDH. Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać przypuszczenie, że cząsteczki GPDH złożone są z dwóch par, funkcjonalnie różnych podjednostek.

W grupie dziesięciu komunikatów dotyczących fosforylazy zwracała uwagę praca Griffiths i wsp., którzy przy pomocy znaczników spinowych zaobserwowali szereg zmian konformacyjnych podczas tworzenia wieloskładnikowego układu: glikogen, fosforylaza a i b oraz kinaza fosforylazy. 5 komunikatów przedstawiono o dehydrogenazie alkoholowej w tym 4 dotyczyło problemów kinetycznych.

W sekcji komunikatów poświęconych regulacji *in vivo* (dwie serie po 11 prac) zwracała uwagę liczniejsza niż zazwyczaj liczba doniesień poświęconych indukcji enzymów roślinnych. W tej grupie znajdowała się też praca Kempel i wsp. poświęcona mechanizmowi indukcji reduktazy azotanowej.

Kontynuacją sympozjalnego referatu Holzera była seria sześciu komunikatów odnoszących się do udziału kontrolowanej proteolizy w regulacji właściwości takich enzymów jak fosfofruktokinazy, RNA-azy, syntetazy gramicydynowej i dehydrogenazy mleczanowej. We wszystkich przypadkach uzyskano częściowo zdegradowane preparaty, niekiedy o 1/3 masy wyjściowej, wykazujące aktywność enzymatyczną, o odmiennych właściwościach kinetycznych.

W sesji plakatowo dyskusyjnej przedstawiono prace dotyczące dehydrogenazy pirogronianowej, mleczanowej, innych dehydrogenaz i transaminaz, heksokinazy, fosfofruktokinazy, cholinesterazy, proteaz, enzymów działających na glutation, enzymów erytrocytarnych i mitochondrialnych, unieruchomionych enzymów, mechanizmu działania i regulacji, badania centrów aktywnych i kinetyki, wpływu nukleotydów na aktywność enzymatyczną, substratów i ich analogów, chemicznej modyfikacji enzymów oraz ciągów metabolicznych i ich regulacji. Do najliczniej prezentowanych prac należała seria odnosząca się do regulacji metabolizmu (50 prac w tym 5 z Polski) a do najciekawszych grupa 8 prac, w tym jedna z Polski, poświęconych kinazie pirogronianowej. W naszym odczuciu prace te stanowiły znacznie poważniejszy fragment badań nad mechanizmem działania regulacji enzymów niż seria komunikatów wygłoszonych o dehydrogenazie alkoholowej. Wśród prac nad kinazą, wyróżniała się praca Cole i Palmer donosząca o regulatorowych właści-

wościach enzymu mięśniowego oraz prace Berkel i wsp. i Schulz i Sparmann poświęcone allosterycznym transkonformacjom kinazy pirogronianowej pod wpływem temperatury, alaniny, FDP i ATP.

Brak miejsca nie pozwala niestety na omówienie szeregu ciekawych prac w tym Żydowo, Jeżewskiej, Kłopotowskiego, Bryły, Szewczuka, Wojtczak i wielu innych. Reasumując należy podkreślić liczny i bardzo udany udział polskich placówek naukowo badawczych w obradach sekcji plakatoowo dyskusyjnej. Natomiast budzi pewien niepokój skromny udział naszych pracowni w tematach wygłaszanych na sympozjach i komunikatach.

*J. Duszyński, M. Fikus, W. Gałasiński, E. Gąsior,  
E. Grąbczewska, M. Kochman, M. Kopeć, A. Pa-  
szewski, M. Pilarska, A. Potempska, E. Romanow-  
ska, W. Rossowski, H. Strzelecka-Gołaszewska,  
A. Szewczuk, E. Wałajtys, J. Zborowski, Z. Zie-  
lińska*



## KOMUNIKAT

Redakcja kwartalnika „Postępy Biochemii”, na prośbę Prof. Claude Liébecqą, Sekretarza Komisji Redaktorów Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemicznej, zamieszcza treść pisma Prof. E. C. Webba w sprawie aktualizowania nomenklatury enzymów i podaje wzór zgłaszania nowych enzymów do Komisji Nomenklatury Biochemicznej.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Biochemicznego uprzejmie prosi o przesyłanie kopii zgłoszeń do Przewodniczącej Komisji Słownictwa P. T. Bioch., Doc. dr Janiny Kwiatkowskiej (Instytut Biochemii i Biofizyki A. M., ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław).

### Revision of Enzyme Nomenclature

Following the publication of Enzyme Nomenclature Recommendations, 1972 (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Elsevier, Amsterdam 1973), the Commission on Biochemical Nomenclature has decided to maintain a continuing review of the Enzyme List contained in it and to publish supplements and corrections from time to time. It is hoped that such a supplement can be published annually in a biochemical journal, and that about every third year these can be combined into a small separate volume.

The Commission invites all members of the biochemical community to assist in this task, by drawing attention to entries in the existing list which appear to be incorrect, or to new enzymes which should be included. All such information should be sent to

Professor Edwin C. Webb,  
J. D. Story Building,  
University of Queensland,  
St. Lucia, Brisbane, Q. 4067, Australia.

For new enzymes as much of the following information as possible should be included:

Reaction catalysed; a brief note on specificity;  
suggested classification sub-group; suggested name;  
source of enzyme; reference.

In the case of a correction of an existing entry, correspondents should set out clear what is wrong with the material published.

6th June, 1974

*Edwin C. Webb*

## RECENZJE

### Biochimié

F. Chapeville, H. Clauser

Herman, Paryż 1974

Dzięki osiągnięciom ostatnich kilkunastu lat, biochemia przestała być dyscypliną katalogującą reakcje enzymatyczne, podczas których ulegają przemianom liczne związki biologiczne czynne, lecz stała się jedną z najważniejszych dróg poznania i analizy najistotniejszych problemów biologiczno-medycznych. Sposoby wytwarzania i wykorzystywania energii, budowa molekularna składników i elementów strukturalnych komórki i ich rola biologiczna, molekularne podstawy informacji genetycznej oraz mechanizmy, poprzez które metaboliczne procesy są regulowane, to główne zagadnienia, którymi zajmuje się współczesna biochemia i z którymi musi zapoznać się każdy, kto chce rozumieć najważniejsze zjawiska życiowe toczące się zarówno w komórce najprostszego drobnoustroju jak i w organizmie ludzkim. Właśnie książka Chapeville'a i Clausera traktuje zwięźle o tych aspektach biochemii, które mają fundamentalne znaczenie dla współcześnie kształcących się przyszłych biologów, lekarzy, farmaceutów i rolników.

Podręcznik podzielony jest na 11 rozdziałów, każdy napisany przez innego specjalistę. Pierwsze dwa rozdziały o przemianie energii i mechanizmach najważniejszych reakcji chemicznych wprowadzają w niektóre zagadnienia chemii fizycznej i stereochemii, niezbędne dla rozumienia procesów chemicznych toczących się w żywym organizmie. Dalsze rozdziały poświęcone są strukturze białek, omówieniu zjawiska katalizy i kinetyki reakcji enzymatycznych, budowie i metabolizmowi węglowodanów, lipidów, nukleotydów i kwasów nukleinowych, procesom utleniania i fosforylacji, mechanizmowi fotosyntezy, biosyntezie najważniejszych metabolitów oraz biochemii dziedziczności. Charakterystyczną cechą podręcznika Chapeville'a-Clausera jest ściśle powiązanie elementów chemii i biologii i wtopienie w tekst tych zagadnień fizykochemicznych, które są niezbędne dla poznania procesów biochemicznych. Taki układ podręcznika jest szczególnie korzystny w przypadku niezbyt dobrego przygotowania chemicznego przez podejmujących studia z zakresu biochemii.

Na treść poszczególnych rozdziałów składają się tylko wybrane zagadnienia, najistotniejsze, a omawiane procesy są ilustrowane doskonałymi schematami i rysunkami, w licznych przypadkach kolorowymi. Szczególnie przejrzysto i wyczerpująco opracowane są rozdziały o białkach, o mechanizmie katalizy enzymatycznej, o metabolizmie węglowodanów oraz o biochemii dziedziczności. Omówiono w nich z dużym znawstwem trudne a równocześnie ważne zagadnienia dla współczesnej biochemii, jak niestabilność konformacji białek, mechanizm niektórych reakcji enzymatycznych, sposoby wytwarzania i akumulacji energii w komórce oraz współczesne poglądy na mechanizm ekspresji genów. Po każdym rozdziale podany jest zestaw pytań ułatwiający zwrócenie uwagi na najważniejsze zjawiska, a dobrane piśmiennictwo umożliwia uzupełnienie wiadomości omawianych w danym rozdziale. Taki układ podręcznika inspirowa do aktywnego studiowania przedmiotu.



Niektóre działy biochemii w książce Chapeville'a-Clausera potraktowane są moim zdaniem zbyt skrótowo. Tak np. brak szerszego omówienia struktury i roli membram komórkowych (poza mitochondrialnymi), indywidualnych przemian niektórych tkanek (mięśnie, tkanka nerwowa, biochemia widzenia) oraz roli składników mineralnych w procesach biochemicznych. Pominięcie powyższych zagadnień będą odczuwać przede wszystkim studenci medycyny. Jeśli jednak przyjmie się intencje autorów, tj. przedstawienie w sposób zwięzły podstaw biochemii ogólnej bez profilowania materiału pod kątem potrzeb medycyny czy rolnictwa, to książka Chapeville'a i Clausera jest doskonałym i nowoczesnym podręcznikiem, przy pomocy którego studujący mogą się zapoznać z najbardziej fascynującą dziedziną współczesnej biologii — biologią molekularną.

*Włodzimierz Ostrowski*

### **Clinical Biochemistry Principles and Methods**

**red. H. C. Curtis, N. Roth,**

**Walter de Gruyter, Berlin-New York 1974**

Napływ informacji z zakresu nauk laboratoryjnych od dawna już przekracza możliwość śledzenia ich przez jednego człowieka. To też każdy, kogo interesuje ten kierunek wiedzy oczekuje z wielką uwagą na pojawienie się podręcznika z tego zakresu. Zgodnie bowiem z charakterem tego typu dzieła znajdzie w nim nowości niejako przefiltrowane i sprawdzone w praktycznym stosowaniu. Można więc przypuszczać, że wydana przez dra Curtiusa i dra Rotha „Biochemia kliniczna” przyjęta zostanie przez postępowe laboratoria kliniczne z dużym zainteresowaniem. Ta prostym i łatwo zrozumiałym językiem napisana oraz starannie wydana książka zawiera 18 rozdziałów obejmujących praktycznie całość zagadnień wchodzących w zakres chemii i biochemii klinicznej. Każdy z tych rozdziałów traktuje omawiany przedmiot zarówno od strony metabolicznej, jak i od strony metodycznej.

W książce operuje się wbrew oczekiwaniom jeszcze starymi to znaczy tradycyjnymi jednostkami dla wyrażenia wyników. Na początku każdego tomu, a więc dwukrotnie, umieszczona jest krótka informacja o zasadach stosowania nowych jednostek oraz wyrażona zapowiedź wprowadzenia ich w niedalekiej przyszłości do laboratoriów i biochemii klinicznej. Wynika z tego, że sprawa upowszechnienia nowych jednostek nie dojrzała jeszcze należycie.

Pierwszy rozdział książki poświęcono zbieraniu i przygotowywaniu próbek do analizy, a więc temu, co wstępnie warunkuje rzetelność wykonania analizy, i ogranicza nieprawidłowy wynik tylko do odpowiadających mu zaburzeń chorobowych. W następnym rozdziale, gdzie mowa jest o sposobach rozdzielania materiału, najwięcej uwagi poświęcono chromatografii cienkowsarstwowej, jako że w większości laboratoriów klinicznych stała się ona metodą rutynową. Osobno potraktowana została chromatografia kolumnowa, metoda dla laboratoriów tego typu mniej przydatna. I wreszcie — chromatografia gazowa, coraz mocniejszą zajmująca pozycję w chemii klinicznej. Odnośnie elektroforezy — podano jedynie znane ogólnie fakty. Odpowiada to poniekąd panującej obecnie stagnacji na tym odcinku. Z zakresu dializy, wirowania i ultrafiltracji — wiele z podanych metod rozdziału nie zostało przyjętych jeszcze do programu rutynowo wykonywanych analiz w laboratoriach klinicznych.

Trzeci z kolei rozdział poświęcono różnym metodom analizowania: fotometrii, technice izotopowej, spektrofotometrii masowej pomiarom elektrochemicznym. W tym ostatnim zakresie z uwagą potraktowane zostały elektrody jonowe, specjalnie membranowe, które znalazły ostatnio zastosowanie między innymi w doskonałych aparatach do automatycznego oznaczania glukozy i mocznika (Beckman-Analyzer). Dalsze opracowania dotyczą metod kolorymetrycznych i analizy enzymatycznej. W rozdziale zatytułowanym „Automatyzacja i opracowanie wyników” wiele uwagi poświęcono tak zwanym szybkim analizatorom klinicznym (Fast Clinical Analyzer) o systemie wirówkowym opracowanym w Stanach Zjednoczonych pod patronatem General Medicine Science and the US Atomic Energy Commission (GeMSAEC). Głównym twórcą tego systemu i zarazem autorem rozdziału na ten temat w książce jest N. G. Anderson z Oak Ridge Torrytown USA. Analizatory oparte na systemie wirówkowym swymi walorami, prostotą konstrukcji, łatwością wykonania analizy, wydajnością — wydają się przewyższać wszystkie dotychczas znane w chemii klinicznej systemy analizy automatycznej.

Dalsze części książki poświęcono metodom oznaczania poszczególnych składników. Najpierw mowa jest o oznaczaniu hormonów, następnie — kwasów żółciowych, węglowodanów, witamin, lipidów, kwasów aminowych, substancji azotowych niebiałkowych, enzymów, wreszcie — hemoglobiny i jej pochodnych oraz kwasów organicznych. Dalsze rozdziały obejmują badania toksykologiczne wynikające z zagrożenia człowieka ze strony środowiska, ze strony materiału biologicznego, chemikalii i leków. Obszerny rozdział poświęcono różnym sposobom badania białek. Omówione zostały także testy dla oceny czynności nerek i metody badania składników nieorganicznych. Ostatni rozdział obejmuje badania gazometryczne i oznaczanie pH — oparte głównie na pomiarach wykonanych za pomocą aparatu mikroastrupa.

Książka swoim układem i treścią jest z jednej strony typowym podręcznikiem laboratoryjnym, z drugiej strony może być pomocna w nauczaniu chemii klinicznej. Nie jest to podręcznik diagnostyki laboratoryjnej, nie jest więc w zasadzie przydatna dla lekarza klinicznego. Wiele podanych w niej metod może nie być zaakceptowanych przez doświadczonego w biochemii klinicznej czytelnika. Autorzy mieli jednak prawo wyboru według własnego uznania tych metod, które ich zdaniem godne są polecenia.

Książka stanowi potwierdzenie panującego ogólnie przekonania, że chemia kliniczna będąca najmłodszą liczącą niespełna 20 lat generacją nauk chemicznych — rozwija się i rozrasta niezwykle dynamicznie. Rozwój ten wynika zarówno z postępu w zakresie metod i sposobów analizowania, jak i z wysuwanych ciągle nowych potrzeb klinicznych. Czytelnik studiujący omawiane dzieło odczuwa pewien niepokój, że poprostu już nie jest w stanie tej pozornie wąskiej specjalności objąć. Tego rodzaju odczucie w odniesieniu do przyszłości chemii klinicznej w miarę upływu czasu będzie się pogłębiać. Ale takie są prawa szybkiego postępu.

Omawiana książka posiada zasadniczy walor — jest w swej treści nowoczesna. Obejmuje aktualny stan wiedzy do końca 1972 roku — sądząc z cytowanego piśmiennictwa. Ukazała się w sprzedaży w końcu maja 1974 roku, czyli „wyprodukowana” została w szybkim tempie.

Warto może zwrócić uwagę, że z pośród 66 współautorów — lekarzy było 25, chemików 30, fizyków 3, biologów 8, reszta — to matematycy, farmaceuci, doktorzy nauk technicznych. W podziale tekstowym udział chemików zdecydowanie przeważa. Współautorzy rekretują się z różnych ośrodków i różnych pracowni specjalistycznych. Nie ma wśród nich profesorów, czy wielkich nazwisk. Są natomiast ludzie stosunkowo młodzi, stanowiący (naruszając) jakby drugi garnitur uczonych. Rzuca to także pewne światło na społeczno-zawodowy charakter pracujących w tej dyscyplinie ludzi. Książkę zredagowało dwóch chemików: dr Curtius z laboratorium Uniwersyteckiej Kliniki Dziecięcej w Zurychu i dr Roth z Centralnego Laboratorium



Szpitala Kantonalnego w Genewie. Spośród zespołu współautorów — 23 zamieszkuje aktualnie w Szwajcarii, 15 rekrutuje się z Anglii i USA, reszta pochodzi z innych krajów europejskich. Układ ten potwierdza prawdę, że duże dzieła wydaje się dzisiaj przy współudziale międzynarodowego zespołu.

Książka wydrukowana została przez wydawnictwo zachodniemieckie, ale w wersji oryginalnej — po angielsku. Jest to jeszcze jedno potwierdzenie, że język angielski staje się międzynarodowym językiem wiedzy.

Pośpiech w wydaniu książki spowodował, że opisy wielu metod przedstawione zostały dość niedokładnie. Na przykład na stronie 1128 postępowanie dotyczące oznaczania mocznika zostało błędnie podane. Podobnie na następnej stronie dla innej metody błędnie podany został skład odczynnika. W wielu miejscach przekręcone zostały nazwiska cytowanych autorów. Dla wielu błędów w końcu niektórych rozdziałów podane zostały wprawdzie poprawki lub dodatkowe wyjaśnienia, ale — jak z tego wynika — nie objęły one wszystkich błędów.

W sumie wydanie podręcznika p.t. „Biochemia kliniczna” Curtiusa i Rotha należy uznać dla chemii klinicznej za wydarzenie roku 1974. Książka ta będzie miała zapewne korzystny wpływ na pracę wielu laboratoriów. Sądzę, że mimo bardzo wygórowanej ceny (ca 160 Dol.) winna się ona znaleźć również w niektórych naszych większych laboratoriach klinicznych — w angielskiej wersji, bez potrzeby tłumaczenia jej.

*Jan Hankiewicz*





## SPIS TREŚCI

W. Jachymczyk — Rola kompleksów białkowych mRNA w regulacji procesu translacji . . . . .	119
A. Dobek, K. Jędrzejczak, A. Patkowski i K. Szyfter — Zastosowanie technik spektralnych do badania kwasów nukleinowych . . .	149
Z. Gasyna — Struktura i funkcje katalazy . . . . .	175
C. Cierniewski, T. Krajewski — Budowa i własności fibrynogenu . . .	193
B. Grodecka — Hormon wzrostu . . . . .	213
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego	
Sprawozdanie z XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa . . . . .	231
Sprawozdanie z VIII Walnego Zebrania w dniu 5.9.1974, Warszawa (R. Dąbrowska) . . . . .	234
Sprawozdanie z działalności VII kadencji Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (T. Borkowski) . . . . .	235
Nowy Zarząd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego VIII kadencji . . . .	241
Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	242
Sprawozdanie — IX Zjazd FEBS, Budapeszt 25—30.8.1974 . . . . .	243
Komunikat Sekretarza Redaktorów Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemicznej . . . . .	265
Recenzje . . . . .	266

## POSTĘPY BIOCHEMII

June 1975

### ARTICLES IN POLISH

**Volume 21**

**Number 2**

W. Jachymczyk — The Role of Ribonucleoprotein Complexes of mRNA in Translation (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa) . . .	119
A. Dobek, K. Jędrzejczak, A. Patkowski, K. Szyfter — Application of the Spectral Techniques of Research of the Nucleic Acids (University of Poznań, Dept. Human Genetics Pol. Acad. Sci., Poznań) . . .	149
Z. Gasyna — Structure and Functions of Catalase (Inst. of Applied Radiat. Chem. Techn. Univ. of Łódź) . . . . .	175
C. Cierniewski, T. Krajewski — Structure and Properties of Fibrinogen (Dept. Biochem., Inst. Biochem. Biophys. Univ. of Łódź) . . .	193
B. Grodecka — Growth Hormone (Serum and Vaccine Research Lab., Warszawa) . . . . .	213
Chronicle . . . . .	231
Meeting Report . . . . .	243
Communication . . . . .	265
Book reviews . . . . .	266



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

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

Pispa J. P., Buchanan F. M., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, 247, 181—184.

Cytując wydawnictwa książkowe podawać należy kolejno: nazwisko(a) inicjały autor(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydawania, np.

Dixon M., Webb E. C., (1964), *Enzymes*, 2 wyd., str. 565, Longmans Green and Co, London;

Grant J. K., (1969) w *Essays in Biochemistry*, red. Campbell P. N., Greville G. D., t. 5, str. 1—58, Academic Press, London

**Załączniki:** Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egzemplarzach 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 winny 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 wzory 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:  $\triangle$   $\square$   $\circ$   $\blacktriangle$   $\blacksquare$   $\bullet$  Ryciny należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „góra” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny w druku 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.

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

SPIS TREŚCI

W. Jachymczyk — Rola kompleksów białkowych mRNA w regulacji procesu translacji . . . . .	119
A. Dobek, K. Jędrzejczak, A. Patkowski i K. Szyfter — Zastosowanie technik spektralnych do badania kwasów nukleinowych . . . . .	149
Z. Gasyna — Struktura i funkcje katalazy . . . . .	176
C. Cierniewski, T. Krajewski — Budowa i własności fibrynogenu . . . . .	193
B. Grodecka — Hormon wzrostu . . . . .	213
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	
Sprawozdanie z XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Warszawa . . . . .	231
Sprawozdanie z VIII Walnego Zebrania w dniu 5.9.1974, Warszawa R. Dąbrowska . . . . .	234
Sprawozdanie z działalności VII kadencji Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (T. Borkowski) . . . . .	235
Nowy Zarząd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego VIII kadencji . . . . .	241
Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego . . . . .	242
Sprawozdanie — IX Zjazd FEBS, Budapeszt 25—30.8.1974 . . . . .	243
Komunikat Sekretarza Redaktorów Czasopism Biochemicznych Międzynarodowej Unii Biochemicznej . . . . .	265
Recenzje . . . . .	266