

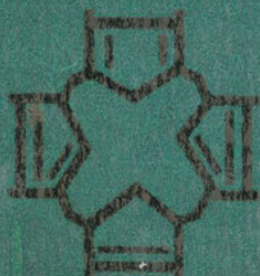
POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

PSYBAH 24 (1)
1-128 (1978)

1978

tom 24 nr 1



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 „Postęпах 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; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

Układ maszynopisu: strona okładkowa nienumerowana zawiera imiona i nazwisko(a) autora(ów), adres(y) Zakładu(ów) w języku polskim i angielskim, w których pracują autorzy adres pocztowy, na który autorzy życzą sobie otrzymywać korespondencję, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim) oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

Strona tytułowa (1) imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwisko(a) autora(ów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, rzeczowy spis treści w języku polskim i angielskim, tytuł naukowy autora(ów) i jego (ich) miejsce(a) pracy, wykaz skrótów stosowanych w pracy.

Strona 2 i następne obejmują tekst pracy do spisu piśmiennictwa włącznie, tabele, spis rycin, wzorów oraz tytuły i objaśnienia do rycin na stronach końcowych.

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I—1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorów, lecz w żądanym miejscu pozostawić wolny wiersz i zaznaczyć: Tabela 1, Ryc. 1, Wzór I itp. Numerację wzoru w tekście należy podawać po nazwie związku np. kwas glutaminowy (I).

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1978 TOM 24 ZESZYT 1

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 24(1)
1—128 (1978)

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

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

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

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

REDAKTOR NACZELNY

Zofia Zielińska

SEKRETARZ REDAKCJI

Małgorzata Balińska

KOMITET REDAKCYJNY

W. Ardelt (Warszawa), B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa),

M. Fikus (Warszawa), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa),

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

I. Szumiel (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

Nakład 2.260 (2.150+110)

Oddano do składania 8.XI.77

Arkt. wyd. 9,25, ark. druk. 8,0

Podpisano do druku w lutym 1978 r.

Pap. druk. sat. kl. III, 70 g, 70×100

Druk ukończono w lutym 1978 r.

Zam. nr 1539/77 S-83

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

MARIAN SZYMONA *)

Polimorfizm białek drobnoustrojów ze szczególnym uwzględnieniem heksokinaz**

Polymorphism of Proteins in Microorganisms with Particular Consideration of Hexokinases

Spis treści

- I. Niektóre enzymy o charakterze polimorficznym**
- II. Heksokinaza drożdżowa (EC 2.7.1.1)**
- III. Fosfotransferaza polifosforan:glukoza (EC 2.7.1.63)**
- IV. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Some enzymes of polymorphic character**
- II. Yeast hexokinase (EC 2.7.1.1)**
- III. Polyphosphate:glucose phosphotransferase (EC 2.7.1.63)**
- IV. Concluding remarks**

Polimorfizm białek drobnoustrojów nie jest tak atrakcyjnym przedmiotem badań jak polimorfizm białek organizmów wyższych. Jedną z przyczyn tego stanu rzeczy są trudności związane z otrzymaniem i dezintegrowaniem dostatecznie dużych ilości biomasy. Dlatego też w piśmiennictwie spotyka się stosunkowo mało prac dotyczących polimorfizmu białek bakteriynego pochodzenia.

Poniżej przedstawione zostaną tylko nowsze i lepiej poznane przykłady polimorfizmu białek drobnoustrojów.

*) Prof. dr, Zakład Biochemii, Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna, ul. Lubartowska 85, 20-123 Lublin.

***) Referat sympozjalny wygłoszony na XIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Lublin 3-5 wrzesień 1976.

I. Niektóre enzymy o charakterze polimorficznym

Spośród bakterii najczęściej badanym gatunkiem jest pałeczka okrężnicy. Do wiadomości podręcznikowych należy już fakt występowania w tym mikroorganizmie trzech aspartokinaz różniących się wrażliwością na hamowanie przez lizynę, treoninę i homoserynę.

W roku 1967 Campbell i wsp. (1) donieśli o wyodrębnieniu z *Escherichia coli* dwóch L-asparaginaz, z których jedna, specyficzna wobec L-asparaginy wykazuje większą wrażliwość na ogrzewanie, podczas gdy druga, bardziej termostabilna, rozkłada również — choć słabiej — L-glutaminę. Ta ostatnia wyróżnia się ponadto zdolnością hamowania wzrostu niektórych nowotworów krwi. Stwierdzenie właściwości onkostatycznych jednego z heteromorfów asparaginazy dało asumpt do podjęcia szeregu dalszych prac nad tym enzymem, dzięki czemu został on poznany dość wszechstronnie. Opracowanie preparatyki czystego enzymu na większą skalę (2) pozwoliło rozwinąć badania również w kierunku klinicznym.

W rok później dwie L-asparaginazy wykryto u *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra (3). Różniły się one optimum pH aktywności, termostabilnością i wrażliwością na inhibitory. Enzym wykazujący wyższe optimum pH (9,6) wywierał wpływ hamujący na wzrost raka Yoshidy (4). W przeciwieństwie do szczepu niejadliwego, szczep patogenny H₃₇Rv posiadał jeden rodzaj asparaginazy, pozbawiony własności onkostatycznych. W 1972 r. grupa badaczy rumuńskich (5) otrzymała z *Mycobacterium bovis* BCG L-asparaginazę w postaci krystalicznej. Około 100-krotnie oczyszczony enzym wykazywał niską aktywność rzędu 5 j/mg białka (pH 8,6; 37°C). W zakładzie autora otrzymano z *Mycobacterium phlei* 170-krotnie oczyszczoną L-asparaginazę o 6-krotnie większej aktywności (6). Mimo to końcowy preparat nie był wolny od zanieczyszczeń, które stanowiły około 50% całkowitego białka preparatu.

W komórkach *E. coli* znaleziono również dwie L-glutaminazy: A i B (7). Glutaminazę A oczyszczono 2800-krotnie i opisano jej właściwości. Enzym o ciężarze cząsteczkowym 110 000 pojawiał się tylko w fazie stacjonarnej wzrostu w przeciwieństwie do glutaminazy B, której poziom był niezależny od warunków hodowli. Niedawno wyizolowano L-glutaminazę B w postaci 6000-krotnie oczyszczonej zużywając do tego celu 5—30 kg biomasy (8). Enzym odznaczał się wrażliwością na zimno i wykazywał złożoną kinetykę reakcji. Uderza bardzo niskie stężenie glutaminazy B wynoszące poniżej 0,01% wszystkich białek ekstraktu.

Interesującą grupę enzymów stanowią tRNA syntetazy. Tak np. u *E. coli* stwierdzono występowanie dwóch form tRNA syntetazy glicyny (9) oraz dwóch form tRNA syntetazy leucyny (10). Enzymy glicynowe różnią się kinetyką: jeden wykazuje sigmoidalną krzywą nasycenia substratem, drugi zaś hyperboliczną. Ustalono, że dwie pary podjednostek o ma-

sach cząsteczkowych 33 000 i 80 000 składają się na strukturę typu alfa₂beta₂.

Podobne odmiany syntetazy tRNA glicyny występują u *Bacillus brevis* (11). Dwa heteromorfy oczyszczono do stanu jednorodności (400 i 720 razy). Odpowiednie ciężary cząsteczkowe wynoszą 226 000 i 66 000. W czasie przechowywania enzym o większej masie ulega dysocjacji na enzym o mniejszej masie i składnik nieaktywny. Struktura czwartorzędowa enzymu pierwszego jak u *E. coli*: alfa₂beta₂. Występowanie dwóch form nie zależało od sposobu dezintegracji ani od obecności inhibitora proteolizy.

W przypadku wspomnianej już tRNA syntetazy leucyny z *E. coli* (10) jeden z heteromorfów okazał się proteolitycznie zmienioną formą drugiego. Konwersja miała charakter odwracalny i polegała na odszczepieniu peptydu o masie 3000 pod wpływem endogennej proteazy o masie 20 000. W warunkach zabezpieczających przed proteolizą znajdowano oba enzymy w ilościach odpowiednio 60 i 40%. Wypływa stąd wniosek, że enzym o masie 33 000 nie jest artefaktem, ale produktem regulowanej inaktywacji *in vivo* enzymu o masie 80 000.

Stosując kolumny z hydroksypatytu udało się rozdzielić aktywność tRNA syntetazy lizynowej na trzy frakcje, które w żelu poliakrylamidowym dzieliły się dodatkowo na więcej niż jeden aktywny rodzaj białka (12). Oczyszczenie przeprowadzono w obecności fenylometanosulfonylofluorku (PMSF) jako inhibitora proteaz. Wszystkie frakcje miały jednakowy ciężar cząsteczkowy 135 000 i jednakową strukturę alfa-beta.

Warto wspomnieć o trzech polimerazach DNA: I, II i III, występujących w *E. coli*. Różnią się one wrażliwością na inhibitory grup SH i na siłę jonową oraz właściwościami immunochemicznymi. DNA polimeraza I spełnia rolę enzymu reperacyjnego, podczas gdy enzym III wydaje się być istotnym dla procesu replikacji DNA. Tę trzecią polimerazę oczyszczono ponad 10 000-krotnie uzyskując preparat w około 20% czysty (13). Rola polimerazy II *in vivo* nie została dotychczas wyjaśniona. Trzy rodzaje DNA polimeraz znaleziono również w zarodnikach i komórkach wegetatywnych *Bacillus subtilis* (14).

Ciekawy przykład polimorfizmu stanowią dwie odmiany dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu występujące w *Pseudomonas fluorescens*. Jedną z nich wyodrębniono z 200 litrów hodowli tego drobnoustroju (15). Homogeny, 950-krotnie oczyszczony enzym o masie 220 000 okazał się być częścią układu Entnera-Doudoroffa, podczas gdy drugi o masie 265 000 należy do cyklu pentozowego. Enzymy te różnią się specyficznością względem koenzymów: pierwszy zużytkowuje zarówno NAD jak NADP, drugi zaś tylko NAD. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że dwie dehydrogenazy nie są produktami tego samego genu ani też nie podlegają wzajemnej interkonwersji.

Ostatnio opisano dwa izoenzymy akonitazy w *Bacillus cereus* (16). Jak-

kolwiek stopień oczyszczenia wynosił tylko 10, autorom udało się rozdzielić jej aktywność drogą chromatografii na kolumnach Sephadex i DEAE-celulozy oraz elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym. Ze względu na kolejność pojawiania się aktywności w czasie hodowli, jeden enzym określono jako wczesny, drugi zaś jako późny, przypisując temu faktowi znaczenie regulacyjne. Wymienione izoenzymy różniły się ponadto powinowactwem do substratów i poziomem energii aktywacji (17).

W płynie pohodowlanym *Clostridium perfringens* znaleziono cztery izoenzymy fosfolipazy C (18). Rozdzieleniu izoenzymów dokonano metodą elektrofokosowania w żelu. Handlowe preparaty fosfolipazy C dawały dwa komponenty. Formę kwaśną (pI 4,5) można było przeprowadzić w alkalicznej (pI 5,2) przy użyciu 6 M mocznika, co przemawia za agregacją podjednostek lub kompleksowaniem z jakąś nieznaną substancją.

Cztery izoenzymy fosfatazy kwaśnej znaleziono u *Aspergillus awamori* (19), hodowanego na podłożu z małą ilością ortofosforanu. W obecności dużych stężeń P_i występował tylko jeden enzym. Mieszaninę oligomerów tej fosfatazy u *A. awamori* stwierdzili również autorzy radzieccy (20) stosując izoelektryczne fokusowanie oraz chromatografię na DEAE-celulozie i sefadesie. Masy cząsteczkowe wahały się w granicach od 30 000 do 140 000. Mnogie formy fosfatazy kwaśnej wykryto także u *Neurospora crassa* (21) i *Aspergillus nidulans* (22).

Niedawno A f a n a s j e w a i wsp. (23) donieśli o heterogenności poli-fosforanowej fosfohydrolazy u *Endomyces magnusii*. Preparat enzymatyczny rozdzielono przy pomocy izoelektrofokosowania na trzy frakcje. Wszystkie miały tę samą masę 48 000, ale różne punkty izoelektryczne i różną stabilność.

Na uwagę zasługują również arylosulfatazy występujące w postaci form wielorakich u *Pseudomonas aeruginosa* (24) i *Proteus rettgeri* (25). W tym ostatnim przypadku metodami chromatografii i elektroforezy udało się wykryć aż dziewięć form; niektóre różniły się specyficznością, optimum pH i aktywacją pod wpływem jonów fosforanowych.

Interesujący polimorfizm typu konformacyjnego wykazuje aldolaza fruktozo-1,6-dwufosforanu z *Lactobacillus casei* (26). Enzym ten rozdzielono metodą immunoelektroforezy na trzy frakcje, każda o strukturze tetramerycznej (masa cząsteczkowa 100 000) i jednakowych właściwościach immunologicznych (przeciwciała otrzymane przeciwko jednej z frakcji reagują również z dwoma innymi), ale różnym ładunku elektrycznym.

Opisane przykłady nie wyczerpują piśmiennictwa na temat polimorfizmu białek drobnoustrojów, niemniej jednak dobrze odzwierciedlają główne kierunki badań w tej dziedzinie. Dominuje tendencja do izolowania poszczególnych form w czystym stanie, co w przypadku bakterii jest problemem dość trudnym. Aby podjąć próbę otrzymania homogennego preparatu trzeba niejednokrotnie dysponować trudno osiągalnymi ilościami bioma-

sy rzędu kilku lub więcej kilogramów. Z tego właśnie powodu tylko niewielkiemu badaczom udało się całkowicie oczyścić i nagromadzić do badań strukturalnoporównawczych dwie lub więcej frakcje izoenzymatyczne.

W wielu publikacjach niepokoi problem artefaktów mogących powstać w drodze proteolitycznej degradacji białek natywnych. W związku z tym warto przytoczyć badania Wengenmayera i wsp. (27) z których wynika, że mnogie formy dehydrogenazy galaktozowej izolowane z *Pseudomonas saccharophila* są w istocie artefaktami, powstałymi w następstwie oksydacji grup SH i częściowej proteolizy. Ze względu na tego rodzaju niebezpieczeństwo, coraz częściej używa się substancji redukujących w postaci 2-merkaptoetanolu lub dwutiotreitolu, a także stosuje inhibitory proteaz, jak np. dwuizopropylofluorofosforan i fenylometanosulfonylofluorek. Niestety, w żadnej z wyżej cytowanych prac nie podano, o ile użycie inhibitora było skuteczne ani nie oznaczono aktywności endogennych proteaz w badanym materiale.

II. Heksokinaza drożdżowa (EC 2.7.1.1)

Szczególne zainteresowanie budzi polimorfizm heksokinazy *Saccharomyces cerevisiae*. Enzym ten został odkryty przez Meyerhofa w 1927 roku i od tego czasu jest on przedmiotem badań. Przeglądu nowszych prac dotyczących heksokinaz dokonał Colowick (28).

Postać krystaliczną heksokinazy drożdżowej otrzymali po raz pierwszy w 1946 roku Kunitz i McDonald (29) stosując frakcjonowanie siarczanem amonowym i etanolem. Nowszymi metodami enzym krystaliczny otrzymali w 1962 r. Darrow i Colowick (30). Czysty według dawnych kryteriów preparat dawał podczas chromatografii na DEAE-celulozie 5—6 aktywnych form, które eluowano bądź gradientem pH bądź gradientem soli. Następnie stwierdzono, że zachowanie się frakcji można zmienić pod wpływem trypsyny lub chymotrypsyny (31). Nie brano wtedy pod uwagę możliwości działania wewnątrzkomórkowych proteaz (mimo że pierwszym etapem oczyszczania była właśnie autoliza komórek), ponieważ surowe ekstrakty dość długo pozostawały aktywne. Dopiero w latach 1964—1969 wyszło na jaw, że formy wielorakie preparatu Darrow-Colowicka są produktami proteolizy. Okazało się bowiem, że obecne w ekstrakcie proteazy ulegały zagęszczeniu podczas oczyszczania zyskując na skuteczności w miarę eliminacji białek balastowych. Znacząca proteoliza mogła zachodzić w zawieszynie siarczanu amonowego nawet przy 4°C (32). W 1966 r. Lazarus i wsp. (33) określili dokładnie aktywność proteolityczną na głównych etapach oczyszczania i opracowali metodę wykluczającą powstawanie artefaktów. W tym celu już na początku preparatyki zastosowano inhibitor proteolizy w postaci dwuizopropylofluorofosforanu

oraz szybką eliminację proteaz na żywicach jonowymiennych i żelu Sephadex.

Historię badań nad heksokinazą można zatem podzielić nieco schematycznie na dwa etapy: przed rokiem 1966 i po tym roku. Obecnie przyjmuje się za fakt obecność w komórkach drożdży dwóch natywnych izoenzymów P-I i P-II, nazwanych tak według kolejności eluowania z kolumny DEAE-celulozowej gradientem pH (28). Wymienione formy są chemicznie i serologicznie różne i nie dają się przeprowadzić jedna w drugą. Aktywności swoiste wynoszą odpowiednio 200 i 800 j./mg białka w pH 8—9 przy 30°C. Izoenzym P-I jest 2,6 razy bardziej aktywny względem fruktozy niż glukozy, podczas gdy dla P-II odpowiedni iloraz aktywności wynosi 1,3 (32). Wymienione stosunki dotyczą również form zmodyfikowanych. Na tej podstawie można określić rodzaj izoenzymu w preparatach handlowych. Tak np. preparat f-my Boehringer zawiera głównie natywny izoenzym P-I, natomiast preparaty innych firm zawierają albo P-II albo jego zmodyfikowane pochodne (28). Należy dodać, że trypsyna w ilości około 10% wagi heksokinazy powoduje całkowitą inaktywację tego enzymu. Glukoza wywiera działanie ochronne, jakkolwiek nie chroni przed modyfikacją, lecz na odwrót wzmacnia ją. W ten sposób mogą powstawać pochodne S-I i S-II (31). Są one tak samo aktywne jak P-I i P-II, ale różnią się szybkością migracji w polu elektrycznym. W porównaniu do form natywnych, formy zmodyfikowane mają bardziej kwaśny charakter i eluują się z DEAE-celulozy przy wyższym stężeniu soli.

Jednocześnie zostały rozstrzygnięte spory dotyczące ciężaru cząsteczkowego heksokinazy drożdżowej: 100 000, 50 000 czy 25 000? Obecnie wiadomo, że enzym natywny jest homodimerem o ciężarze około 100 000, i jako taki w odpowiednich warunkach dysocjuje na dwa monomery (34) łatwo ulegające proteolitycznej modyfikacji. Przemiana formy natywnej w zmodyfikowaną polega na oderwaniu peptydu złożonego z 11 aminokwasów: Val-His-Leu-Gly-Pro-Lys-Lys-Pro-Glu-Ala-Arg, który to peptyd może ewentualnie ulec dalszemu rozbiciu pomiędzy resztami lizyny. Warto zauważyć wybitnie zasadowy charakter tego peptydu. Z badań krystalograficznych wynika (35), że dwie identyczne podjednostki połączone są heterologicznie, tzn. ich miejsca wiązania znajdują się w różnym lokalnie otoczeniu.

Wartość 25 000 daltonów dotyczy produktu dalszego rozkładu monomerów, np. podczas elektroforezy w środowisku zawierającym siarczan dodecylu. Detergent ten powoduje denaturację białka, a przez to ułatwia działanie śladowym ilościom proteaz (36).

Wyodrębnienie dwóch natywnych form heksokinazy w postaci czystej umożliwiło podjęcie badań nad ich strukturą. Stwierdzono m.in., że izoenzymy P-I i P-II różnią się zawartością waliny, leucyny, izoleucyny, fenilalaniny, proliny i histydyny. Natomiast w obu przypadkach C-terminalnym

aminokwasem jest alanina, a NH_2 - terminalnym aminokwasem — walina. Dostatecznie wyraźne różnice w składzie aminokwasowym wskazują, że te dwa izoenzymy powstały skutkiem duplikacji genu i rozbieżnej ewolucji. Istotnie, antysurowice otrzymane pod wpływem P-I lub P-II są wysoko swoiste i nie dają reakcji krzyżowych. Stwierdzono ponadto, że oba izoenzymy występują również w szczepie haploidalnym, a zatem nie pochodzą od alleli pojedynczego locus.

W odróżnieniu od izoenzymu P-I, izoenzym P-II aktywuje się pod wpływem niektórych metabolitów, jak cytrynian i 3-fosfoglicerynian (37). Kinetyka reakcji ujawniła szereg cech szczególnych, które prawdopodobnie mają związek z regulacją glikolizy.

III. Fosfotransferaza polifosforan: glukoza (EC 2.7.1.63)

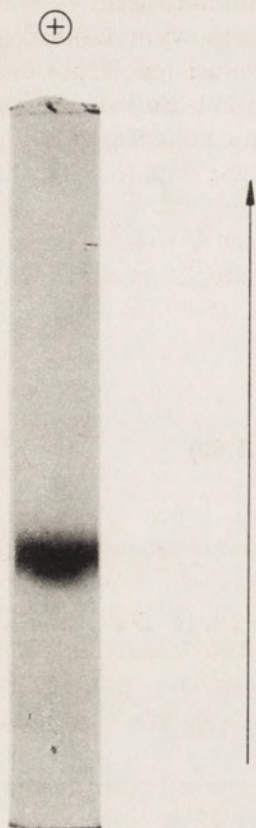
W przeciwieństwie do heksokinazy drożdżowej, która zyskała rangę enzymu modelowego w klasie transferaz i jest bardzo intensywnie badana, nic nie wiemy o polimorfizmie heksokinaz bakteryjnych. Pewien wyjątek mogłyby stanowić niedawno otrzymane wyniki badań nad polifosforanową glukofosfotransferazą. Wymieniony enzym katalizuje fosforylację glukozy i glukozaminy przy użyciu nieorganicznych polifosforanów $(\text{Me}^+ + \text{H})_{n+2}\text{P}_n\text{O}_{3n+1}$, których stopień kondensacji wynosi co najmniej 4 reszty fosforylowe na cząsteczkę.

Polifosforanowa glukofosfotransferaza (glukokinaza) odkryta po raz pierwszy u mykobakterii (38—41), występuje również w komórkach *Corynebacterium* (42—44), *Nocardia* (45), *Mycococcus* i *Micrococcus* (46) i in. (47, 48). Ostatnio otrzymano z *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra elektroforytycznie homogeny preparat tej glukokinazy (49). Około 600-krotnie oczyszczony enzym o masie cząsteczkowej 118 000 dawał jedno pasmo białka i aktywności w żelu poliakryloamidowym (Ryc. 1) oraz jedną linię precipitacyjną w reakcji z antysurowicą króliczą (Ryc. 2).

W porównaniu z preparatem końcowym, elektroforeza kilkakrotnie oczyszczonego enzymu ujawniła nie jedno, a cztery pasma aktywności (50). Frakcja najszybciej migrująca reagowała tylko z ATP, natomiast trzy inne wykazywały aktywność względem polifosforanu i — w mniejszym stopniu — względem ATP. Stosując frakcjonowanie na kolumnach Sephadex G-200 i DEAE-celulozy udało się rozdzielić trzy heteromorfy, z których jeden o szczególnie wysokim ciężarze cząsteczkowym ulegał w odpowiednich warunkach degradacji do izoenzymu o ciężarze około 120 000.

Przeprowadzając metodą elektroforezy wstępny *screening* kilkunastu gatunków *Mycobacterium* i *Nocardia* stwierdzono w każdym przypadku wieloraki charakter badanej fosfotransferazy (O. S z y m o n a, dane nie publikowane).

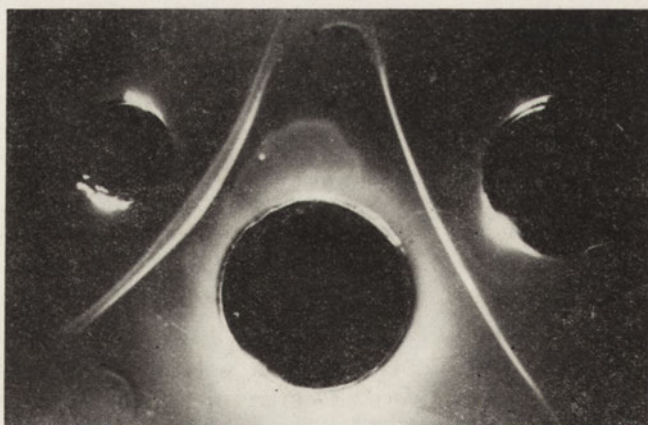
Należy dodać, że aktywność proteolityczna surowego ekstraktu z *M. tu-*



Ryc. 1. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym końcowego preparatu polifosforanowej glukofosfotransferazy z *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra (49).

Białko wybarwione czernią amidową.

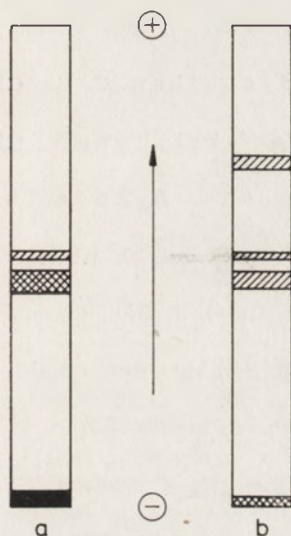
(-)



Ryc. 2. Immunodyfuzja w żelu agarowym preparatów polifosforanowej glukofosfotransferazy z *M. tuberculosis* H₃₇Ra wobec antysurowicy króliczej (49).

Preparat enzymatyczny z ostatniego etapu oczyszczania na fotografii po prawej stronie.

berculosis H₃₇Ra oznaczona przy użyciu kazeiny (Tris-HCl, pH 7,4; 36°C) odpowiadała aktywności około 7 µg trypsyny/mg białka. W toku są badania mające na celu ustalenie ewentualnego wpływu endogennych proteaz na zachowanie się wielorakich form polifosforanowej glukofosfotransferazy.



Ryc. 3. Schemat elektroforezy w żelu poliakrylamidowym 3-krotnie oczyszczonego preparatu polifosforanowej glukofosfotransferazy z *M. tuberculosis* H₃₇Ra (50).

Aktywność oznaczano w mieszaninie zawierającej: Tris-HCl (pH 8), glukozę, MgCl₂, NaCl, donator grup fosforylowych - polifosforan nieorganiczny (a) lub ATP (b), NADP, dehydrogenazę glukozo-6-fosforanu, błękit nitrotetrazoliowy, metosiarczan fenazyliny i agar.

IV. Uwagi końcowe

Omówione wyżej publikacje dowodzą występowania u drobnoustrojów większości wymienionych przez IUPAC-IUB Komisję d/s Nomenklatury Biochemicznej grup mnogich form enzymów (51). Szczególnie często polimorfizm białek przejawia się polimerycznością podjednostek. Należy sądzić, że zdolność komórki do tworzenia większych jednostek z mniejszych stanowi skuteczny a zarazem powszechny mechanizm adaptacyjny. Ważnym zadaniem biochemii dynamicznej będzie wyjaśnienie roli poszczególnych mnogich form *in vivo*. W dotychczasowym piśmiennictwie tylko nieliczne prace dostarczają konkretnych informacji na ten temat. W związku z tym rodzi się pytanie, w jakim stopniu formy wielorakie stanowią u drobnoustrojów produkt selekcyjnego nacisku środowiska, a w jakim genetycznego dryfowania neutralnych mutacji. Z tego punktu widzenia bardzo pożądane byłoby rozszerzenie badań na izoenzymy różniące się aminokwasami o charakterze obojętnym. Badania polimorfizmu białek drobnoustrojów są pożądane również ze względu na możliwość wyjaśnienia spornych problemów taksonomicznych, niejednokrotnie bardzo trudnych w mikrobiologii.

Artykuł nadszedł 26.5.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 29.6.1977

PIŚMIENNICTWO

1. Campbell H. A., Mashburn L. T., Boyse E. A., Old L. J., (1967), *Biochemistry*, **6**, 721—730.
2. Ho P. P. K., Milikan E. B., Bobbitt J. L., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3708—3715.
3. Jayaram H. N., Ramakrishnan T., Vaidyanathan C. S., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 165—174.
4. Reddy V. V. S., Jayaram H. N., Sirsi M., Ramakrishnan T., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 262—267.
5. Soru E., Teodorescu M., Zaharia O., Szabados J., Rudescu K., (1972), *Can J. Biochem.*, **50**, 1149—1159.
6. Pastuszek I., Szymona M., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 37—44.
7. Hartman S. C., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 853—863.
8. Prusiner S., Davis J. N., Stadtman E. R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3447—3456.
9. Francis T. A., Nagel G. M., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **70**, 862—868.
10. Rouget P., Chapeville G., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 459—467.
11. Surgachov A. P., Surgachova I. G., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 175—184.
12. Dittgen R. M., Leberman R., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 543—551.
13. Kornberg T., Gefter M. L., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 5369—5375.
14. Terano H., Fujita Y., Hiroishi S., Kadota H., Komono T., (1975), *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 2057—2063.
15. Lessman D., Schimz K. L., Kurz G., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **59**, 545—559.
16. Agrawal P. K., Garg G. K., Gollakota K. G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 979—986.
17. Agrawal P. K., Garg G. K., Gollakota K. G., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 987—996.
18. Mollby R., Wadstrom T., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **321**, 569—584.
19. Ohta V., Ikeda K., Ueda S., (1968), *Appl. Microbiol.*, **16**, 973.
20. Maksimow W. J., Kałasznikowa N. A., Konowałow S. A., Kalunianc K. A., (1975), *Prikladnaja Biochimia i Mikrobiologia* **11**, 852—856.
21. Hochberg L., Sargent M., (1973), *Anal. Biochem.*, **51**, 516—522.
22. Hofsten B., Porath J., (1962), *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 1—12.
23. Afanasjewa T. P., Uryson S. O., Kulajew I. S., (1976), *Biochimia*, **41**, 1078—1086.
24. Delisle G. J., Milazzo F. H., (1972), *Can. J. Microbiol.*, **18**, 561—568.
25. Fitzgerald J. W., Milazzo F. H., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 769—774.
26. Kaklij G. S., Nadkarni G. B., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 52—57.
27. Wengenmayer F., Blachnitzky E. O., Kurz G., (1973), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **354**, 131—135.
28. Colowick S. P., (1973), *The Enzymes*, red. Boyer P. O., t. 9B, str. 1—48, Academic Press, New York.
29. Kunitz M., McDonald M., (1946), *J. Gen. Physiol.*, **29**, 393.
30. Darrow R. A., Colowick S. P., (1962), w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N. O., t. 5, str. 226—235, Academic Press, New York.
31. Kaji A., Trayser K. A., Colowick S. P., (1961), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94**, 798.

32. Schulze I. T., Colowick S. P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2306—2316.
33. Lazarus N. R., Ramel A. H., Rustum Y. M., Barnard E. A., (1966), *Biochemistry*, **5**, 4003—4016.
34. Derechin M., Ramel A. H., Lazarus N. R., Barnard E. A., (1966), *Biochemistry*, **5**, 4017—4025.
35. Steitz T. A., Fletterick R. J., Hwang K. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **78**, 551—561.
36. Pringle J. R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**, 46.
37. Kosow D. P., Rose J. A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2618—2625.
38. Szymona M., (1961), Proc. Vth Intern. Congr. Biochem. (Moscow 1961), Pergamon Press 1961, str. 110.
39. Szymona M., (1962), *Acta Biochim. Polon.*, **9**, 165—181.
40. Szymona M., Ostrowski W., (1964), *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 283—295.
41. Szymona M., (1964), *Post. Biochemii*, **10**, 295—307.
42. Szymona M., Szymona O., (1961), *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **9**, 371—374.
43. Dirheimer G., Ebel J. P., (1962), *C.R. Acad. Sci.*, **254**, 2850—2852.
44. Dirheimer G., Ebel J. P., (1968), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **50**, 1933—1947.
45. Szymona O., Uryson S. O., Kulajew I. S., (1967), *Biochimia*, **32**, 495—503.
46. Uryson S. O., Kulajew I. S., Jegorowa S. A., Agre N. S., (1973), *Mikrobiologia*, **42**, 1067—1071.
47. Uryson S. O., Kulajew I. S., (1968), *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, **183**, 957—959.
48. Uryson S. O., Kulajew I. S., Bogatyriewa T. T., Asejewa I. W., (1974), *Mikrobiologia*, **42**, 1067—1071.
49. Szymona M., Kowalska H., Pastuszek I., (1977), *Acta Biochim. Polon.*, **24**, 133—142.
50. Kowalska H., Szymona M., Pastuszek I., (praca w druku).
51. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6127—6128.

European Journal of Biochemistry

European Journal of Biochemistry istnieje już 10 lat. Pierwszy numer pisma ukazał się w marcu 1967 r. W tymże roku wpłynęło do Redakcji 385 maszynopisów prac, z czego zakwalifikowano do druku 65%. Liczba nadsyłanych prac wzrastała z roku na rok, by w 1976 r. osiągnąć liczbę 1221. Utrzymał się jednak nadal na tym samym poziomie, a nawet nieznacznie wzrastał, procent maszynopisów odrzucanych (39% w 1976 r.).

European Journal of Biochemistry prenumerowało w 1976 r. 2298 abonentów. W ostatnich latach notuje się stały spadek liczby abonentów (najwyższa w 1970 r. wynosiła 2643).

Większość prac drukowanych w *European Journal of Biochemistry* pochodzi z Europy (w 1976 r. 82%, łącznie z Izraelem), w tym najwięcej z R.F.N. (21%) oraz z Francji i Wielkiej Brytanii (po 14%). Spoza Europy najwięcej opublikowanych prac pochodziło z U.S.A. (9,5% wszystkich prac wydrukowanych w 1976 r.). Udział prac z Belgii, Holandii, Szwecji, Szwajcarii i Japonii utrzymywał się w granicach 3%—5%. Prace z ZSRR stanowiły 2,3%, z Polski i Węgier po 0,9%, z Czechosłowacji 0,4%, z Bułgarii i NRD po 0,3%.

Zespół redakcyjny składa się obecnie (maj 1977 r.) ze 102 osób. Są to: redaktor honorowy — sir Hans Krebs, redaktor naczelny — Claude Liébecq, 20 członków komitetu redakcyjnego i 80 członków tak zwanego komitetu doradczego czyli stałych recenzentów pisma. Wśród tych ostatnich jest trzech biochemików z Polski (profesorowie David Shugar, Maciej Wiewiórowski i Lech Wojtczak).

Dochód ze sprzedaży *European Journal of Biochemistry* zasila fundusz stypendialny FEBS. Korzystają z niego młodzi biochemicy z krajów należących do Federacji, biorący udział w kursach organizowanych przez FEBS.

BARBARA BRONISZEWSKA-ARDELT *)

Heksokinaza mózgu

Brain Hexokinase

Spis treści

- I. Rozmieszczenie subkomórkowe heksokinazy mózgu**
 - I-1. Heksokinaza cytoplazmatyczna i mitochondrialna**
 - I-2. Fizjologiczna rola heksokinazy mitochondrialnej**
 - I-3. Zaburzenia w rozmieszczeniu heksokinazy mózgu w niedotlenieniu.**
- II. Skład izoenzymatyczny**
- III. Właściwości molekularne**
- IV. Mechanizm reakcji katalizowanej przez heksokinazę i regulacja aktywności tego enzymu.**

Contents

- I. Subcellular distribution of brain hexokinase**
 - I-1. Cytoplasmic and mitochondrial hexokinase**
 - I-2. Physiological role of mitochondrial hexokinase**
 - I-3. Disturbances in the distribution of brain hexokinase under hypoxic conditions**
- II. Isoenzyme composition**
- III. Molecular properties**
- IV. The mechanism of action and regulation of activity of brain hexokinase.**

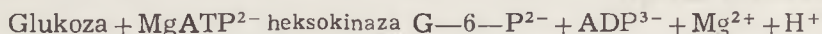
Heksokinaza (ATP: heksozo-6-fosfotransferaza E. C. 2.7.1.1.), fosfofruktokinaza (ATP: D-fruktozo-6-fosforano fosfotransferaza E. C. 2.7.1.11) i kinaza pirogronianowa (ATP: pirogronian fosfotransferaza E. C. 2.7.1.40) katalizują praktycznie jedyne nieodwracalne i zarazem najwolniej przebiegające reakcje ciągu glikolitycznego. Z tego powodu nazwano je „kluczowymi” i „ograniczającymi” enzymami ciągu. Przypisuje się im duże znaczenie

*) Dr, Zespół Neurochemii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00784 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: G-6-P — glukoza-6-fosforan; F 6-P — fruktozo-6-fosforan; MgATP⁻² — jednozasadowa sól magnezowa adenozyotrójfosforanu; ADP — adenozyndwufosforan; AMP — adenozydomonofosforan.

regulacyjne, zwłaszcza, że są to enzymy allosterczne, wrażliwe na działanie niskocząsteczkowych modulatorów (1,2).

Pierwszy z tych enzymów zapoczątkowuje katabolizm glukozy (lub innych heksoz), która przekształca się kolejno w szereg pośrednich związków w ciągu glikolitycznym a następnie ulega całkowitemu utlenieniu w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Reakcja fosforylacji glukozy przez ATP w obecności jonów Mg^{2+} katalizowana przez heksokinazę przebiega w następujący sposób:



Heksokinaza jest szeroko rozpowszechniona w tkankach zwierzęcych, niektóre elementy budowy tego enzymu i jego pewne właściwości wykazują jednak znaczny stopień swoistości tkankowej.

Heksokinazy cechują się na ogół brakiem specyficzności wobec fosforylowanego cukrowca, są natomiast wysoko swoiste w stosunku do drugiego substratu — $MgATP^{2-}$ (3). Wiadomo jednak, że jedynym fizjologicznym substratem heksokinazy mózgu jest glukoza, chociaż *in vitro*, enzym ten podobnie jak heksokinazy innych tkanek, może fosforylować także inne heksozy (3). Przemiana glukozy zatem, jest jedynym źródłem energii wykorzystywanym przez mózg do wytwarzania i utrzymania charakterystycznego dlań potencjału elektrycznego, jak również gradientu stężeń jonów.

Niniejszy artykuł omawia właściwości i mechanizm działania heksokinazy mózgu, niektóre elementy regulacji tego enzymu oraz jego znaczenie w stanach niedotlenienia mózgu.

I. Rozmieszczenie subkomórkowe heksokinazy mózgu

I-1. Heksokinaza cytoplazmatyczna i mitochondrialna

Heksokinaza mózgu występuje głównie we frakcji mitochondrialnej (około 80%) oraz w cytosolu (około 20%) (4—11). Enzym związany z mitochondriami występuje w dwóch formach. Aktywność jednej z nich można oznaczyć bezpośrednio w mitochondriach, jest to według nomenklatury angielskiej *overt form*; aktywność drugiej można oznaczyć dopiero po zniszczeniu struktury mitochondriów (*latent form*). Według Wilsona (12) forma *overt* związana jest z mitochondriami natomiast formę *latent* stanowi heksokinaza mitochondriów synaptosomalnych, którymi zawsze zainicjowane są wolne mitochondria.

Istnieją kontrowersyjne dane co do lokalizacji heksokinazy w mitochondriach. Jedni autorzy twierdzą, że heksokinaza związana jest z zewnętrzną błoną mitochondrialną (13—15) drudzy, że z wewnętrzną (16, 17). Być może, heksokinaza mitochondriów mózgu, podobnie jak to sugeruje

Hackenbrok (17) dla enzymu wątroby, występuje w kanałach łączących zewnętrzną i wewnętrzną błonę mitochondriów. Niezgodności te są, jak się wydaje, przynajmniej po części spowodowane niedoskonałością stosowanych dziś metod otrzymywania błon mitochondrialnych.

Pod wpływem różnych czynników uwalnia się heksokinazę z mitochondriów. Stosowano do tego celu elektrolity o różnej sile jonowej i pH (18, 19) detergenty jonowe i niejonowe (19), szok osmotyczny (15) a także niektóre naturalne metabolity ciągu glikolitycznego: ATP, G-6-P i F-6-P (13, 14). Całkowite przejście heksokinazy mitochondrialnej do supernatantu zaobserwowano na przykład pod wpływem 10 mM buforu fosforanowego o pH 7,0, zawierającego 0,9 M chlorek sodowy, lub 0,4 M chlorku sodowego zbuforowanego przy pH 4,0 (19) albo też pod wpływem 0,154 M buforu węglanowego o pH 5,0 (20). Mniej efektywne okazały się Triton X-100, dezoksychohan sodowy i Tween 80 (19).

Wydaje się więc, że enzym ten jest związany z błonami przede wszystkim wiązaniami o charakterze jonowym ale nie bez znaczenia są także interakcje hydrofobowe. Egger i Rapaport (21) sugerują, że w wiązaniu wielu enzymów z mitochondriami uczestniczą imidazolowe grupy histydyny białka enzymatycznego, jonizacja tych grup prowadzi bowiem do uwolnienia enzymu. Podobnie mogłoby być w przypadku heksokinazy. Uwalniające działanie ATP, G-6-P i F-6-P, w stosunku do których heksokinaza wykazuje powinowactwo, sugeruje, że zmiana konformacji w wyniku związania liganda może być wystarczająca do pokonania sił wiążących enzym z mitochondriami. Potwierdza to niekowalencyjny charakter tych oddziaływań i pozwala przypuszczać, że związki te mogą wywierać działanie regulujące nie tylko bezpośrednio na aktywność heksokinazy, ale także poprzez zmiany rozmieszczenia enzymu w komórce.

I-2. Fizjologiczna rola heksokinazy mitochondrialnej

Nie ma wątpliwości co do roli heksokinazy cytoplazmatycznej, która katalizuje przemiany zachodzące głównie w cytoplazmie, takie jak: glikoliza, cykl pentozowy, glukoneogeneza. Natomiast brak jest jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, jaką rolę pełni heksokinaza związana z mitochondriami. Gots (22) uważa, że heksokinaza mitochondrialna jest regulatorem oksydacyjnej fosforylacji. Według jego hipotezy ATP pochodzący z łańcucha oddechowego bierze udział w fosforylacji glukozy w obecności heksokinazy mitochondrialnej, powstający zaś ADP może być powtórnie wykorzystany przez mitochondria. Aktualny poziom ADP, z kolei będzie regulować szybkość łańcucha oddechowego. Podobne sugestie wysuwa Rose i wsp. (23) co do heksokinazy nowotworów. Broniszewska i wsp. (20) sugerują, że heksokinaza mitochondrialna stanowi zapas enzymu, który w warunkach deficytu energetycznego komórki, może być uwolniony do

cytoplazmy, zwiększając tam stężenie enzymu i powodować wzmożenie aktywności glikolitycznej komórki. Podobną hipotezę wysuwa Wilson (24): heksokinaza mitochondrialna mogłaby być również wykorzystana przez cytoplazmę wtedy, gdy komórka wykazuje większe zapotrzebowanie energetyczne na przykład podczas pobudzenia elektrycznego ośrodkowego układu nerwowego. Inni autorzy (10) uważają jednak, że heksokinaza mitochondrialna nie ma żadnej roli fizjologicznej. Ostatnia sugestia wydaje się być niesłuszna ze względu na obserwowane zmiany w aktywności tego enzymu w zależności od warunków energetycznych w jakich w danej chwili znajduje się ośrodkowy układ nerwowy.

I-3. Zaburzenia w rozmieszczeniu heksokinazy mózgu w niedotlenieniu

Hypoksja azotowa *) wywołuje obniżenie aktywności heksokinazy mózgu występującej we frakcji mitochondrialnej z jednoczesnym wzrostem aktywności enzymu w cytoplazmie (20). Odwrotne zjawisko odnotowano w ischemii, w przypadku heksokinazy mózgu kurczą: aktywność enzymu rosła w mitochondriach natomiast malała w cytoplazmie (29). Autorzy obu doniesień tłumaczą zaobserwowane zjawisko jako wynik przemieszczenia się enzymu z mitochondriów do cytoplazmy lub odwrotnie. Przyczyny i mechanizm redystrybucji enzymu nie zostały dotąd wyjaśnione. Można tu rozpatrywać szereg możliwości. Na uwagę zasługują przede wszystkim zmiany stężenia glukozy w komórkach mózgu w obu rodzajach niedotlenienia. W hypoksji azotowej występuje wzrost stężenia substratu w tkance (dane własne niepublikowane) w ischemii zaś poziom glukozy maleje (29). Wydaje się więc, że stężenie glukozy, która jest substratem heksokinazy może być regulatorem rozmieszczenia enzymu w komórce. Byłoby to zgodne z omówioną już koncepcją fizjologicznej roli heksokinazy mitochondrialnej. Zwiększone stężenie glukozy w hypoksji azotowej uruchomiłoby przemieszczenie się enzymu w „kierunku” substratu, a więc z mitochondriów do cytoplazmy. Odwrotne zjawisko występowałoby w ischemii gdzie poziom glukozy w komórce zmniejsza się. Należy tu wspomnieć, że doświadczalna hyperglykemia wywołuje także uwalnianie się heksokinazy z mitochondriów do cytoplazmy (29). Przedstawiona koncepcja nie wyjaśnia oczywiście mechanizmu redystrybucji. Należy również wziąć pod uwagę występujące w niedotlenieniu obniżenie się pH tkanek jako potencjalny czynnik uwalniania się heksokinazy z mitochondriów. Takı bowiem efekt

*) Niedotlenienie wywołane przez przetrzymywanie zwierząt w atmosferze azotu. Po wystąpieniu pierwszych objawów klinicznych niedotlenienia (około 1,5—2 min) takich jak bezdech, porażenie kończyn, zwierzęta poddawano reanimacji. Po ustąpieniu objawów, zwierzęta umieszczano ponownie w komorze z przepływającym azotem do powtórnego wystąpienia objawów niedotlenienia. Łącznie zabieg ten trwał 30 min.

obserwowano w eksperymentalnej kwasicy oddechowej (20). Ta interpretacja pozostawałaby w zgodzie z obserwacją, że hypoksja azotowa nie pociąga za sobą przemieszczenia się enzymu u żółwi morskich (20), zwierząt filogenetycznie prymitywnych, mających znacznie większą pojemność buforową krwi niż szczury (30). Należy dodać, że niedotlenienie nie zawsze wywołuje zmiany w rozmieszczeniu enzymu. W doświadczalnym zatruciu zwierząt tlenkiem węgla obserwowano obniżenie się aktywności heksokinazy mitochondrialnej bez zmian w aktywności heksokinazy cytoplazmatycznej (31). Natomiast w mózgach zwierząt poddanych hypoksji krążeniowej stwierdzono zwiększenie się aktywności heksokinazy w cytoplazmie bez zmian w mitochondriach (32). W tych dwóch przypadkach można mówić o inhibicji i stymulacji aktywności enzymu. Inhibicję aktywności mogłyby wywoływać na przykład nagromadzające się podczas niedotlenienia wolne kwasy tłuszczowe, które hamują ten enzym *in vitro* (33).

Reasumując można powiedzieć, że w zależności od wieku (nie obserwowano redystrybucji enzymu u pięciodniowych szczurów) (20) i gatunku zwierząt, obserwowano różne zmiany w aktywności enzymu łącznie z jego przemieszczaniem w komórce.

II. Skład izoenzymatyczny

Heksokinaza tkanek szczura występuje w czterech formach molekularnych, które można wykryć dzięki elektroforezie w żelu skrobiowym (25). Oznaczono je kolejnymi cyframi rzymskimi w porządku wzrastającej ruchliwości w żelu. Formy te różnią się niektórymi właściwościami katalitycznymi. Na przykład izoenzym III w przeciwieństwie do pozostałych jest hamowany przez nadmiar substratu, ujawnianie jego aktywności w żelu wymaga więc specjalnego postępowania. Różnice dotyczą także powinowactwa w stosunku do glukozy, co wyraża się odmiennymi wartościami stałej Michaelisa, które dla izoenzymów I—IV wynoszą odpowiednio 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-2} M. Poszczególne izoenzymy są w różnym stopniu wrażliwe na denaturację termiczną. Najbardziej labilne są formy II i III. Jednocześnie są one w największym stopniu chronione przez substrat (glukoza). Natomiast substrat nie wywiera ochronnego działania na izoenzym IV, którego powinowactwo do glukozy jest niewielkie (wysoka stała K_m) i tylko w niewielkim stopniu chroni izoenzym I.

Izoenzymy I, II, III znaleziono prawie we wszystkich badanych tkankach, izoenzym IV zaobserwowano tylko w wątrobie. W mózgu występują głównie izoenzym I oraz śladowe ilości izoenzymu II i III. Badając poszczególne frakcje komórkowe mózgu stwierdzono (26), że taki skład izoenzymatyczny jest charakterystyczny dla heksokinazy cytoplazmatycznej, ponieważ w mitochondriach występuje tylko izoenzym I. Wilson (27) jednak badając właściwości elektroforetyczne i kinetyczne heksokinazy

mitochondrialnej i cytoplazmatycznej nie stwierdził zasadniczych różnic pomiędzy tymi dwiema heksokinazami. Otrzymano także kontrowersyjne wyniki co do występowania różnych form heksokinazy w gleju i neuronach. Według Wilsona (28) nie ma zasadniczych ilościowych różnic w zawartości heksokinazy w gleju i neuronach, podczas gdy Bigli i wsp. (26) sugerują, że forma cytoplazmatyczna występuje w komórkach glejowych, mitochondrialna zaś w neuronach.

Interesujące dane co do wpływu insuliny na tkanki w zależności od występujących w nich form heksokinazy przedstawia Katen (25). Według tego autora istnieje ścisła zależność pomiędzy poziomem insuliny a aktywnością heksokinazy. Szczególnie izoenzym II jest wrażliwy na obecność hormonu. Istnieją hipotezy, że regulacyjne działanie insuliny dotyczy poziomu enzymu w komórce a nie konformacyjnej modyfikacji cząsteczki heksokinazy. Stwierdzono także, że tkanki wrażliwe na działanie insuliny (mięśnie szkieletowe, serce, tkanka tłuszczowa młodych zwierząt) zawierają głównie izoenzym II. Tkanki niewrażliwe na działanie insuliny (mózg, nerki, płuca, śledziona) zawierają w przeważającej ilości izoenzym I i śladowe ilości izoenzymu II i III (25).

III. Właściwości molekularne

Badania Wilsona (27), a także Biegla i wsp. (26) wykazały, że heksokinaza związana z mitochondriami nie różni się pod względem właściwości molekularnych od enzymu występującego w cytoplazmie.

Chou i Wilson (34) uzyskali heksokinazę mózgu szczura w stanie czystym, stosując swoiste uwolnienie enzymu z frakcji mitochondrialnej glukozy-6-fosforanem (który jest produktem reakcji katalizowanej przez enzym i jednocześnie jego inhibitorem) oraz chromatografię na wymienniaczu anionowym. Otrzymany preparat spełniał szereg kryteriów homogenności, między innymi, po energicznej denaturacji różnymi czynnikami, podczas elektroforezy na żelu poliakryloamidowym w obecności SDS, wędrował jako pojedynczy prążek białkowy. Okazało się, że enzym ten jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 97 000—98 000 daltonów (34); podobną wartość wyznaczono również dla heksokinazy mózgu wołu (35). W roztworach o niskiej sile jonowej (34) lub w obecności glukozy-6-fosforanu (35) heksokinaza agreguje najczęściej tworząc dimer. Zjawisko to najprawdopodobniej było przyczyną otrzymania przez Teichgrabera i Bisolda (18) wyższej wartości masy cząsteczkowej (182 000 daltonów).

Heksokinaza z łatwością tworzy kompleksy z fosfolipidami. Powstają w ten sposób agregaty o tak dużej masie cząsteczkowej, że podczas preparatyki enzymu obserwuje się czasem występowanie aktywności również we frakcji nieopóźnianej podczas sączenia molekularnego w żelu

Sephadex G-200 (36). Ekstrakcja etanolem lub trawienie fosfolipazą A uwalniało jednak enzym z kompleksu z fosfolipolipidami, we frakcji etanolewej stwierdzano obecność fosfatydylocholino (36). Postuluje się więc, że *in vivo*, heksokinaza może występować w połączeniu z wieloma cząsteczkami tego związku (36, 37).

Skład aminokwasowy heksokinazy mózgu szczura i wołu przedstawiono w Tabeli 1. Poza zawartością prolina, która była wyraźnie wyższa w przypadku enzymu szczura nie zaobserwowano poważniejszych różnic gatunkowych. Wydaje się jednak, że w obu enzymach można oczekiwać około 90% identyczności sekwencji (34). Najliczniej reprezentowane są kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, leucyna i glicyna, natomiast w niewielkich ilościach występują tyrozyna i metionina. Przewaga aminokwasów dwukarboksylowych nad zasadowymi tłumaczy stosunkowo niską wartość punktu izoelektrycznego heksokinazy (20, 38). Aminokwasem końcowym z wolną grupą aminową jest glicyna.

Tabela 1

Skład aminokwasowy heksokinazy mózgu szczura i wołu

Aminokwas	mole aminokwasu mol histydyny	
	Szczur *)	Wół **)
Kwas asparaginowy	5,40±0,01	5,00
Treanina	2,77±0,01	2,83
Seryna	2,63±0,03	2,83
Kwas glutaminowy	4,93±0,07	5,33
Prolina	1,96±0,07	1,17
Glicyna	4,42±0,17	4,33
Alanina	2,64±0,04	2,66
Walina	3,60±0,07	3,17
Cysteina	1	ślady
Metionina	1,64±0,09	1,67
Izoleucyna	2,74±0,04	2,33
Leucyna	4,62±0,11	4,83
Tyrozyna	1,11±0,03	1,00
Fenylalanina	2,07±0,04	2,17
Lizyna	3,28±0,08	3,17
Histydyna	1,00	1,00
Arginina	3,05±0,06	2,50

*) Wyniki według (34)

**) Wyniki według Schwartz'a i Bosford'a (45)

Heksokinaza mózgu szczura zawiera czternaście (39), a enzym mózgu wołu — dwanaście (40) grup sulfhydrylowych reagujących z 5,5'-dwutio-bis-(2-nitrobenzoesanem) (DTNB). Można je podzielić na trzy klasy róż-

niące się istotnie reaktywnością z tym odczynnikiem. Zależność pomiędzy reaktywnością grup sulfhydrylowych a aktywnością enzymatyczną pozwala wnioskować, że dwie wzmiankowane reaktywne grupy mają zasadnicze znaczenie dla aktywności, podczas gdy trzy grupy szybko reagujące jak również dziewięć grup trudno dostępnych dla DTNB występuje poza obszarem centrum aktywnego. Podobna reaktywność grup — SH heksokinazy mózgu wołu i szczura stanowi kolejną przesłankę daleko idącej homologii obu enzymów.

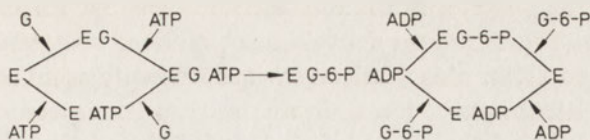
IV. Mechanizm reakcji katalizowanej przez heksokinazę i regulacja aktywności tego enzymu

Heksokinaza katalizuje reakcję z dwoma substratami (glukoza i kompleks $MgATP^{2-}$), powstają też dwa produkty: glukozo-6-fosforan i ADP. Badania mechanizmu tej reakcji, a więc porządku przyłączenia przez enzym substratów i uwalniania produktów były przedmiotem szeregu doniesień (41,2). Początkowo wydawało się, że fosforylacja glukozy katalizowana przez heksokinazę mózgu wołu przebiega zgodnie z mechanizmem *Ping-Pong* *) to znaczy, że jeden z produktów uwalnia się zanim nastąpi przyłączenie kompletu substratów (42, 44a). Późniejsze badania (41, 2) nie potwierdziły jednak tej hipotezy. Ustalono bowiem, że:

- oba substraty nie współzawodniczą ze sobą o enzym (41),
- N-acetyloglukozoamina — inhibitor wiążący się z enzymem, lecz nie ulegający przemianie (*dead end inhibitor*), hamowała kompetycyjnie reakcję z glukozą (41) lub fruktozą (2) a niekompetycyjnie z $MgATP^{2-}$ (41, 2) jako substratem,
- kolejny inhibitor tego typu — AMP wywierał działanie kompetycyjne gdy substratem był $MgATP^{2-}$ i niekompetycyjne w przypadku glukozy (41),
- podobnie, ATP^{4-} i β , γ -5'-adenylo-metyleno-dwufosforan okazały się inhibitorami kompetycyjnymi w stosunku do $MgATP^{2-}$ a mieszanymi w stosunku do fruktozy (2).

Wyniki te pozwoliły określić mechanizm reakcji jako „sekwencyjny” (pierwszy produkt może pojawić się dopiero po przyłączeniu obu substratów) i „nieuporządkowany” (kolejność przyłączenia substratów i uwalniania produktów nie jest określona) z dwoma substratami i dwoma produktami. Jest to więc według nomenklatury Cleland a (15) mechanizm typu *BiBi random* (symbol „BiBi” oznacza dwa substraty i dwa produkty). Reakcję można więc zapisać następująco:

*) Terminologia wg. Cleland a (15).



Na schemacie zaznaczono tylko jeden kierunek reakcji. Reakcja katalizowana przez heksokinazę ssaków jest bowiem praktycznie nieodwracalna w warunkach *in vivo* co odróżnia ją od reakcji katalizowanych przez enzym drożdży (31). Ning i wsp. (2) potrafili jednak *in vitro* skierować reakcję katalizowaną przez heksokinazę mózgu w stronę defosforylacji glukozy-6-fosforanu stosując podwyższone stężenie Mg^{++} .

Jak już wspomniano, heksokinaza jest jednym z kluczowych enzymów przemiany cukrowców. Enzym ten musi więc ulegać w organizmie wielorakim i skomplikowanym procesom regulacyjnym w zależności od rodzaju tkanki i stanu metabolicznego komórki. Procesy te nie są jeszcze dobrze poznane. Uważa się, że (42) regulacja heksokinazy może być realizowana poprzez:

- bezpośrednio modulowanie aktywności,
- zmiany rozmieszczenia enzymu w komórce (równowaga między formą mitochondrialną i cytoplazmatyczną),
- zmiany całkowitej ilości enzymu w komórce.

W mózgu, heksokinaza występuje w znacznie większej ilości niż jest to potrzebne do wytwarzania fizjologicznej ilości G-6-P (20—30 μ moles/1 g tkanki/godz) (43), aktywność jej jest więc w znacznym stopniu zahamowana (1, 42). Może to być wynikiem działania wielu czynników. Wykazano bowiem, że wiele związków drobnocząsteczkowych występujących w komórce może *in vitro* wpływać w większym lub mniejszym stopniu na aktywność enzymu. Wiążą się one bądź z centrum aktywnym bądź z miejscem (lub miejscami) allosterycznymi.

Hamujący wpływ wywierają między innymi: ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, ITP, IDP, IMP, CTP, UTP, β , γ -metyleno-ATP, cykliczny, AMP, 3-fosfoglicerynian, N-acetyloglukozoamina, 2-dezoksyglukoza, dezoksy-ATP i G-6-P, natomiast aktywujące działanie wywierają fosforan nieorganiczny i jon magnezowy (38, 42—45).

Największe znaczenie *in vivo* wydaje się mieć hamujące działanie produktów reakcji — G-6-P i ADP oraz aktywujące działanie fosforanu nieorganicznego (42).

Stwierdzono (44), że G-6-P hamuje w znacznym stopniu aktywność heksokinazy mózgu szczura i że efekt ten jest znoszony przez fosforan nieorganiczny. Ponieważ okazało się, że fosforan nie aktywuje enzymu w nieobecności G-6-P wydaje się, że aktywujące działanie tego związku polegałoby rzeczywiście na usunięciu inhibitora. Wykazano ostatnio (46), że G-6-P i fosforan nieorganiczny w fizjologicznych stężeniach współzawodniczą ze

sobą o enzym. Nie występuje natomiast konkurencja między fosforanem nieorganicznym a substratami heksokinazy: glukozą i $MgATP^{2-}$. Przypuszcza się więc, że fosforan nieorganiczny wiąże się z miejscem allosterycznym, zaś G-6-P w centrum aktywnym lub miejscem allosterycznym, które częściowo pokrywa się z centrum aktywnym (47). Być może, heksokinaza występuje w dwu stanach konformacyjnych pozostających w równowadze. Konformacja jednego typu faworyzuje wiązanie się fosforanu nieorganicznego, natomiast enzym znajdujący się w innym stanie konformacyjnym nie przyłącza tego związku. Parametry kinetyczne obu konformacji enzymu są zbliżone poza jedynym wyjątkiem: stała dysocjacji kompleksu — enzymem związany z fosforanem — G-6-P jest bardzo wysoka w porównaniu ze stałą dysocjacji kompleksu wolnego enzymu z G-6-P (46). ADP, najsilniejszy inhibitor allosteryczny, a także inne efekторы allosteryczne, wiązałyby się w innym miejscu allosterycznym odległym topologicznie od centrum aktywnego.

Jak już wspomniano, stężenie jonów magnezowych może mieć wpływ na przebieg reakcji katalizowanej przez heksokinazę. Od stężenia Mg^{2+} zależy w pewnym stopniu stężenie $MgATP^{2-}$, który jest substratem (a jednocześnie i aktywatorem allosterycznym, (48)). Stężenie jonu magnezowego może także modyfikować odpowiedź enzymu na zmieniające się wartości tak zwanego „energy charge”, a więc stosunku stężeń trzech nukleotydów:

$$\left[(ATP) + \left(\frac{1}{2} ADP \right) \right] / [(ATP) + (ADP) + (AMP)].$$

Postulowano także, że Mg^{2+} może być allosterycznym aktywatorem heksokinazy (44). Należy zaznaczyć, że sam transport glukozy do komórki jest jednym z istotnych czynników regulujących aktywność enzymu.

Zmiany w rozmieszczeniu enzymu w komórce tzn. przechodzenie enzymu związanego z mitochondriami do cytoplazmy podczas niedotlenienia zwierząt zostały omówione w rozdziałach poprzednich. Istnieją hipotezy (42), że powyższe zjawisko może odgrywać regulacyjną rolę również w warunkach fizjologicznych. Mechanizm redystrybucji nie jest w chwili obecnej wyjaśniony, podkreśla się jednak, że największą efektywność ze związków fizjologicznych w warunkach *in vivo* wykazywały ATP i G-6-P.

Stężenie heksokinazy w komórce znajduje się pod kontrolą czynników hormonalnych i dietetycznych. Wpływ insuliny na stężenie izoenzymu II w tkankach został omówiony w rozdziale II. Wydaje się jednak, że ten typ regulacji może dotyczyć tylko w niewielkim stopniu heksokinazy mózgowej, ponieważ w mózgu występują tylko niewielkie ilości izoenzymu II. Brak jest danych co do regulacji stężenia izoenzymu I głównej formy heksokinazy mózgowej.

Artykuł nadszedł 1.8.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 15.9.1977.

PIŚMIENICTWO

1. Gumińska M., (1971), *Monografie Biochemiczne*, **24**, 47—69.
2. Ning J., Purich D. L., Fromm H. J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3840—3846.
3. Balazs R., (1970), w *Handbook of Neurochemistry*, red. Lajtha A., t. 3 str. 2—29. Plenum Press New York.
4. Beattie D. S., Sloan H. R., Basford R. E., (1963), *J. Cell Biol.*, **19**, 309—315.
5. Rendon A., Waksman A., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 324—328.
6. Biesold D., Teichgräber P., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 13C—14C.
7. Crane R. K., Sols A., (1953), *J. Biol. Chem.*, **203**, 273—292.
8. Craven P. A., Basford R. E., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3520—3524.
9. Johnson M. K., (1960), *Biochem. J.*, **77**, 610—618.
10. Kropp E. S., Wilson J. E., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 74—79.
11. Vallejo G. C., Marco R., Sebastian J., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 478—485.
12. Wilson J. E., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 96—104.
13. Craven P. A., Goldblatt P. J., Basford R. E., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3525—3532.
14. Domańska-Janik K., Biesold D., (1972), *Neuropat. Pol.*, **10**, 485—497.
15. Mayer R. J., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2127—2138.
16. Cleland W. W., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104—137.
17. Haekenbrock C. R., (1966), *J. Cell Biol.*, **30**, 269—297.
18. Broniszewska-Ardelt B., Miller A. T. Jr., (1975), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **23**, 581—584.
19. Teichgräber P., Biesold D., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 979—989.
20. Broniszewska-Ardelt B., Miller A. T. Jr., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 151—156.
21. Egger E., Rapaport S. M., (1963), *Nature*, **200**, 240—242.
22. Gots R. E., Goml F. A., Besman S. P., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1249—1258.
23. Rose J. A., Warms V. B., (1967), *J. Biol. Chem.*, **182**, 1635—1645.
24. Wilson J. E., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3640—3647.
25. Katzen H. M., (1967), *Advances in Enzyme Regulation*, **5**, 335—356.
26. Bigl V., Müller L., Biesold D., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 721—727.
27. Wilson J. E., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **276**, 568—571.
28. Wilson J. E., Wilkin G. P., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 802.
29. Knull M. R., Taylor W. F., Wells W. W., (1973), *J. Biol. Chem.*, **218**, 5414—5417.
30. Clark V., Miller A. T. Jr., (1973), *Comp. Biochem. Physiol.*, **44B**, 55—62.
31. Sikorska M., Broniszewska-Ardelt B., (1976), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **24**, 429—435.
32. Broniszewska-Ardelt B., Sikorska M., (1976), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **24**, 303—307.
33. Weber H. J., Hird-Convery A. J., Stamm N. B., (1966), *Science*, **154**, 1357—1360.
34. Chou A. C., Wilson J. E., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **151**, 48—55.
35. Chakrabarti U., Kenkar U. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5984—5988.
36. Kimura H. K., Gourley R. H., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 157—161.

37. Craven P. A., Basford R. E., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 620—630.
38. Newsholme E. A., Rolleston F. S., Taylor K. L., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 47p.
39. Chou A. C., Wilson J. E., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 191—199.
40. Redkar V. D., Kenkar U. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7576—7584.
41. Bachelard A. G., Clark V., Thompson M. F., (1971), *Biochem. J.*, **123**, 707—715.
42. Purich D. L., Fromm H. J., Rudolph F. B., (1973), *Advances in Enzymology*, t. 39, str. 249—326. John Wiley and Sons, New York.
43. McIlvain H., (1966), w *Biochemistry and the Central Nervous System*, 3 wyd. red. Little, str. 43—77, Boston.
44. Purich D. L., Fromm H. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 3456—3464.
- 44a. Fromm H. J., Zewe V., (1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 1661—1667.
45. Schwartz G. P., Basford R. E., (1967), *Biochemistry*, **6**, 1070—1078.
46. Ellison W. R., Lueck J. D., Fromm H. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1864—1871.
47. Rose J. A., Warms V. B., Kosow D. P., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 729—735.
48. Bachelard A. G., (1971), *Biochem. J.*, **125**, 249—254.

IRENA PIETRZYKOWSKA *)

Mechanizmy mutagenезy indukowanej a procesy reperacji DNA

Mechanisms of Induced Mutagenesis and DNA Repair

Spis treści

- I. Mechanizmy reperacji uszkodzeń w DNA**
- II. Reperacja uszkodzeń fotochemicznych**
 - II-1. Fotoreaktywacja**
 - II-2. Reperacje ciemne**
 - II-2.a. Reperacje przez wycinanie**
 - II-2.b. Reperacja postreplikacyjna**
- III. Hipoteza reperacji SOS**
- IV. Zahamowanie syntezy DNA jako wynik działania promieni UV**
 - V. Fotoprodukty odpowiedzialne za efekt biologiczny promieniowania UV**
 - V-1. Fotoprodukty odpowiedzialne za mutacje**
- VI. Procesy reperacji DNA a zjawisko obniżenia frekwencji mutacji**
- VII. Mutagenезa chemiczna a procesy reperacji DNA**
- VIII. Rola błędnej reperacji w mutagenезie chemicznej**
 - IX. Produkty reakcji mutagenów z DNA a uszkodzenia przedmutacyjne**
 - IX-1. Czynniki alkilujące**
 - IX-2. Analogi zasad**

Contents

- I. Repair mechanisms of damaged DNA**
- II. Repair of photochemical lesions**
 - II-1. Photoreactivation**
 - II-2. Dark repair**
 - II-2.a. Excision repair**
 - II-2.b. Postreplication repair**
- III. SOS repair hypothesis**
- IV. Inhibition of DNA synthesis after UV-irradiation**

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

V. Photoproducts responsible for biological effects of UV-irradiation**V-1. Photoproducts in DNA responsible for mutation****VI. DNA repair processes and mutation frequency decline (MFD)****VII. Chemical mutagenesis and DNA repair processes****VIII. The role of misrepair in chemical mutagenesis****IX. Reaction products of chemical mutagens with DNA and premutational lesions****IX-1. Alkylating agents****IX-2. Base analogues**

W badaniach nad indukowaną mutagenezą wiele uwagi poświęcono produktom powstającym w DNA pod wpływem mutagenów. Dzięki temu znacznie więcej wiadomo obecnie o produktach reakcji w DNA, a w wielu przypadkach o mechanizmie ich powstawania niż o sposobie, w jaki mutacje zachodzą w komórce. Jeśli chodzi o mechanizm mutagenezy chemicznej, hipoteza błędu parowania (*mispairing*) przetrwała do niedawna w niezmienionej formie. Zakłada ona, że mutacja powstaje jako bezpośredni wynik błędnego parowania zasady zmodyfikowanej przez mutagen (1). Ostatnie lata przyniosły badania, które wskazują, że najprawdopodobniej mutageneza chemiczna, podobnie jak indukowana przez promieniowanie, zachodzi z udziałem szeregu procesów komórkowych. Wśród nich istotną rolę wydają się odgrywać procesy reperacji DNA, a modyfikacja zasady stanowi jedynie uszkodzenie przedmutacyjne. Udział procesów reperacji uszkodzeń DNA najwcześniej został poznany w mutagenezie indukowanej przez promieniowanie (2). Obecnie jest coraz więcej danych, wskazujących na istotną rolę tych procesów także w mutagenezie indukowanej przez czynniki chemiczne.

I. Mechanizmy reperacji uszkodzeń w DNA.

Jak wiadomo DNA jest nośnikiem informacji genetycznej, w którym zakodowany jest cały zapis informacji determinującej funkcje żywej komórki. Jakikolwiek zmiany w DNA, uszkadzające ten zapis, prowadzą do zaburzeń procesów komórkowych. Jeśli dotyczą one procesów istotnych dla żywotności komórki czy organizmu, kończy się to śmiercią, a w przypadku mniej istotnych funkcji, zmianą właściwości komórki czyli mutacją. Ponieważ organizmy żywe zawsze były i nadal są narażone na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych, uszkadzających ich substancję genetyczną, wykształciły szereg mechanizmów obronnych, które pozwalają im reperować uszkodzenia w DNA. Mechanizmy reperacji DNA zostały najwcześniej poznane w przypadku uszkodzeń fotochemicznych, a dopiero badania ostatnich lat wykazały, że proces ten jest bardziej ogólny i odnosi się także do innych uszkodzeń DNA. Wiele zasad zmodyfikowanych fotochemicznie lub pod wpływem czynników mutagennych i carcinogennych może być usuwanych z DNA dzięki mechanizmom reperacyjnym.

II. Reperacja uszkodzeń fotochemicznych.

Z badań nad fotochemią kwasów nukleinowych wiadomo, że głównym fotoproduktem w DNA są dimery pirymidyn, którym przypisuje się główną rolę w uszkodzeniach fotochemicznych (3—7). Jednakże udział w tych uszkodzeniach innych fotoproduktów, jak fotohydraty cytozyny lub fotoprodukt tyminy (8, 9) wydaje się być również istotny. Świadczy o tym istnienie endonukleaz aktywnych wobec DNA zawierającego fotoprodukty inne niż dimery pirymidyn (10—11) oraz DNA zawierającego uracyl (12), a także istnienie N-glikozydazy uracylowej, która usuwa uracyl z DNA (13—15). Źródłem uracylu w DNA może być spontaniczna lub enzymatyczna dezaminacja cytozyny lub jej fotoproduktów. DNA uszkodzony pod wpływem promieni UV może być reperowany w obecności światła na drodze fotoreaktywacji, lub przez mechanizm reperacji ciemnej.

II-1. Fotoreaktywacja.

Zjawisko fotoreaktywacji jest bardzo szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Fotoreaktywacja jest procesem enzymatycznym, w którym enzym obecnie zwany fotolazą, reaguje swoiście z DNA zawierającym dimery pirymidyn. Pod wpływem światła widzialnego o długości 310—480 nm rozszczepia on dimery do monomerów. Proces ten w odróżnieniu od reperacji ciemnej nie pozostawia żadnych zmian w zapisie informacji genetycznej (2). Fotolaza została wyizolowana i jej właściwości szeroko przebadane (16—19). Enzym ten jest specyficzny wobec dimerów pirymidyn, a nie działa na inne fotoprodukty bądź uszkodzenia w DNA.

II-2. Reperacje ciemne.

Proces reperacji ciemnej w odróżnieniu od fotoreaktywacji nie jest swoisty dla jednego typu uszkodzeń, ale obejmuje różnego typu uszkodzenia, zarówno fotochemiczne jak też wywołane czynnikami chemicznymi, mutagenami i karcinogenami. W reperacji ciemnej rozróżniamy dwa zasadnicze mechanizmy; reperację przez wycinanie oraz reperację postreplikacyjną (rekombinacyjną). Obecnie uważa się, że istnieje kilka odgałęzień tych dwóch podstawowych procesów reperacji ciemnej (20).

II-2-a. Reperacje przez wycinanie.

Reperacji przez wycinanie podlegają uszkodzenia DNA, które nie powodują bezpośrednio pęknięcia łańcucha. Mimo obecności uszkodzeń DNA

zachowuje ciągłość. Zapoczątkowanie procesu reperacji wymaga nacięcia łańcucha w pobliżu miejsca uszkodzenia przez endonukleazę reperacyjną. Reperacja przez wycinanie jest procesem wieloetapowym wymagającym udziału kilku enzymów. Badania nad identyfikacją kolejnych etapów enzymatycznych prowadzono *in vivo* przy użyciu mutantów, pozbawionych aktywności poszczególnych enzymów (21—24), a także *in vitro* na DNA z faga Φ X 174 (25) oraz na bakteryjnym DNA transformującym (26, 27), przy użyciu izolowanych enzymów. Szczegółowe omówienie procesu reperacji przez wycinanie zawierają przeglądy Grossmana i wsp. (21) oraz Pietrzykowskiej i Shugara (28).

Endonukleazy i N-glikozydazy. Grossman i wsp. (21) proponują nazwanie endonukleaz reperacyjnych ogólnym terminem correndonukleazy. Correndonukleazy I obejmowałyby endonukleazę rozpoznającą uszkodzenia typu monoadduktów (produkty alkilacji czynnikami monofunkcyjnymi, 5,6-dwuhydroxy-5,6-dwuhydro-tyminę (29); miejsca apurynowe i apirymidynowe (30)) oraz endonukleazę II (31, 32). Correndonukleazy II rozpoznawałyby dwuaddukty, powodujące większe zaburzenia w strukturze DNA jak np. fotodimery pirymidyn, oraz wiązania poprzeczne w DNA. Correndonukleaza II jest to UV-endonukleaza kodowana przez geny *uvrA* i *uvrB* u *E. coli* (33), V-gen faga T4 (34), oraz jest to endonukleaza, która jest uszkodzona w fibroblastach pochodzących od ludzi cierpiących na *Xeroderma pigmentosum* (35).

Dotąd uważano, że pierwszym etapem procesu reperacji przez wycinanie jest nacięcie przez endonukleazę rozpoznającą uszkodzenie w DNA (21). Obecnie uważa się, że odnosi się to tylko do correndonukleazy II, natomiast w przypadku correndonukleazy I działanie endonukleazy jest poprzedzone działaniem N-glikozydaz a mianowicie, N-glikozydazy uracylowej (14) i N-glikozydazy 3-metyloadeninowej (14, 36).

N-glikozydazy prawdopodobnie rozpoznają uszkodzenia wprowadzające małe zaburzenia w strukturze DNA. Usuwają one uszkodzoną zasadę katalizując hydrolizę wiązania glikozydowego i pozostawiają miejsce apirymidynowe lub apurynowe. Miejsca apurynowe i apirymidynowe są rozpoznawane i nacinane przez endonukleazę (30). Początkowo uważano, że jest to endonukleaza II, opisana przez Friedberga i Goldtwaitha (31) jako enzym działający na alkilowany DNA. Ostatnio donoszono jednak, że enzym działający na alkilowany DNA i enzym aktywny wobec miejsc apurynowych są różnymi białkami (32). Wyodrębniono ostatnio szereg nowych endonukleaz działających na uszkodzony DNA (10, 11, 37—44). Endonukleazy te nie wykazują swoistości wobec określonego typu uszkodzeń w DNA i być może rozpoznają one miejsca apurynowe i apirymidynowe, a nie zmodyfikowane zasady. Miejsca apurynowe i apirymidynowe mogą powstawać w DNA pod wpływem działania promieniowania, a także czynników chemicznych. Alkilowany DNA może ulegać depurynacji spon-

tanicznej (45) lub enzymatycznej pod wpływem N-glikozydazy adeninowej (14, 36). Deaminacja cytozyny (spontaniczna (46), pod wpływem ogrzewania (47, 48), działania kwasem azotawym (49), działania dwusiarczkiem (50), lub modyfikacji fotochemicznej (50a)), prowadzić może, przy udziale N-glikozydazy uracylowej, do powstania miejsc apirymidynowych. N-glikozydaza wydaje się być enzymem występującym powszechnie (14, 51, 52). Miejsca apirymidynowe powstają także pod wpływem promieniowania jonizującego (29). Opisana endonukleaza aktywna wobec DNA traktowanego promieniami jonizującymi (γ -endonukleaza) (41) może być również endonukleazą rozpoznającą miejsca apirymidynowe. Endonukleaza aktywna wobec miejsc apurynowych działa także na miejsca apirymidynowe (30). Wskazuje to, że enzym rozpoznaje miejsce pozbawione zasady, bez względu na to czy usunięta była pirymidyna czy puryna.

Endonukleazy nacinające są swoiste dla uszkodzonego dwupasmowego DNA, UV-endonukleaza działa w pobliżu pojedynczych dimerów, ale może także działać na odcinki zawierające szereg dimerów (trakty dimerów), a nawet na nienaświetlony DNA z jednoniciowymi pętami powstałymi wskutek obszernych delecji (21). Wcześniejsze doniesienia o udziale UV-endonukleazy w reperacji DNA uszkodzonego przez czynniki arylalkilujące jak 7-bromometylo-12-metylobenzo(α)antracenylo-7-metylo-adenina (53) zostały podważone przez Kirtikari i wsp. (54), którzy wykazali, że produkty arylalkilacji adeniny i guaniny są usuwane z DNA w postaci zasad, a nie nukleotydów. Powstałe miejsca apurynowe są więc nacinane przez endonukleazę II, a zatem UV-endonukleaza nie uczestniczy w reperacji tego typu uszkodzeń.

UV-endonukleazy hydrolizują wiązania fosfodwuestrowe w pobliżu dimeru dając wolne końce 5'P i 3'OH (21). Endonukleazy aktywne wobec miejsc apurynowych posiadają ponadto aktywność egzonukleazy III, której nie udawało się rozdzielić, ani w wysoko oczyszczonych preparatach (55), ani na drodze mutacji (56). Ostatnio donoszono jednak o wyodrębnieniu exonukleazy III jako oddzielnego enzymu (32). Jej rola prawdopodobnie polega na przygotowaniu wolnego końca 3'OH potrzebnego dla przyłączenia polimerazy DNA (57).

Wycinanie uszkodzonych zasad i reperacyjna synteza DNA — egzonukleazy i polimeraza DNA. Wycinanie fotodimerów pirymidyn i przyległych nukleotydów w uszkodzonym DNA odbywa się z udziałem 5' → 3'egzonukleazy związanej z polimerazą I (21, 58), lub polimerazą III (59). Polimeraza I jest główną polimerazą reperacyjną, ale w mutancie polA⁻ pozbawionym jej aktywności może być zastąpiona przez polimerazę III (60, 61), przynajmniej jeśli chodzi o usuwanie dimerów. W reperacji uszkodzeń po promieniowaniu jonizującym i po czynnikach alkilujących polimeraza I wydaje się być jedyną polimerazą reperacyjną (43, 62, 63).

5'→3'-egzonukleaza związana z polimerazą I jest swoista wobec na-

ciętego przez endonukleazę uszkodzonego dwupasmowego DNA zawierającego krótkie jednoniciowe fragmenty z wolnym końcem 5'P. Dimery są wycinane w postaci oligonukleotydów o długości 7—8 nukleotydów (64). W przypadku innych uszkodzeń typu monoadduktów liczbę wyciętych nukleotydów określa się na około 2—3 (65). 5'→3'-egzonukleaza działa na odcinki jednopasmowe i ulega zahamowaniu po napotkaniu nienaruszonych wiązań wodorowych. 5'→3'-egzonukleaza działa jednocześnie z polimerazą na zasadzie „*nick translation*”, t.zn. usuwaniu uszkodzonych fragmentów towarzyszy jednoczesne włączanie nowych nukleotydów. Wykazano to w badaniach *in vivo* z mutantami *polA*⁻ pozbawionymi aktywności polimerazy I lub 5'→3'-egzonukleazy (66) oraz *in vitro* z enzymami izolowanymi z tych mutantów (25, 27).

5'→3'-egzonukleaza związana z polimerazą III również można brać udział w usuwaniu dimerów z DNA, ale w tym przypadku procesowi temu towarzyszy znaczna degradacja DNA (59). Fakt ten tłumaczy wcześniejsze wyniki Coopera i Hanawalta (60), którzy obserwowali, że w mutantach *polA*⁻, gdzie synteza reperacyjna zachodziła z udziałem polimerazy III, włączane fragmenty były znacznie dłuższe (1000—3000 nukleotydów) niż w przypadku *polA*⁺ (10).

Ponadto w wycinaniu dimerów z DNA mogą brać udział także egzonukleazy niezwiązane z polimerazami DNA, jak np. UV-egzonukleaza z *M. lysodeikticus* (67) oraz egzonukleaza VII z *E. coli* (68, 69). Enzymy te posiadają aktywność wobec DNA naświetlonego UV i naciętego przez UV-endonukleazę. Działają one w kierunku 5'→3', a ich produktem są także oligonukleotydy (21).

RecBrecC-nukleaza (egzonukleaza V) może również wycinać dimery z dwupasmowego linearnego DNA naświetlonego UV DNA, natomiast nie potrafi wycinać dimerów z kołowego DNA (70). Jej udział w procesie reperacji przez wycinanie nie został ustalony.

3'→5'-egzonukleazy związane z polimerazami DNA. Wszystkie polimerazy DNA z *E. coli*, polimeraza I, II i III, posiadają aktywność 3'→5'-egzonukleaz (71). 3'→5'-egzonukleazy nie biorą udziału w wycinaniu dimerów, rola ich polega natomiast na usuwaniu błędnie włączonych zasad podczas normalnej replikacji DNA. Działają one w kierunku przeciwnym do kierunku replikacji, kontrolując wierność procesu syntezy DNA („*proof reading*”) (57, 72). Mutacje w polimerazie DNA u faga T4, obniżające aktywność 3'→5'-egzonukleazy, powodują zwiększenie częstotliwości spontanicznych mutacji faga (73, 74).

Ligazy. Kończym etapem w reperacji przez wycinanie jest połączenie sąsiadujących grup 5'P i 3'OH przez ligazę polinukleotydową, co zapewnia ciągłość łańcucha DNA (75). Dlatego też mutacje w genie ligazy zwiększają wrażliwość na promieniowanie a także zwiększają częstotliwość mutacji spontanicznych (76, 77, 146).

II-2-b. Reperacja postreplikacyjna (rekombinacyjna).

Reperacja rekombinacyjna dotyczy naprawy uszkodzeń występujących w obu pasmach DNA *vis-a-vis* lub w bliskim sąsiedztwie. Przykładem takiego uszkodzenia jest DNA nowo zreplikowany po naświetleniu komórek promieniami UV, gdzie naprzeciwko dimeru znajduje się luka, lub DNA zawierający dwupasmowe pęknięcia bądź wiązanie poprzeczne (24, 78). W przypadku wiązań poprzecznych proces reperacji rekombinacyjnej wymaga uprzedniego nacięcia przez UV-endonukleazę kodowaną przez geny *uvrA* i *uvrB* (79, 80). Reperację rekombinacyjną postulowali Rupp i Howard-Flanders (81) na podstawie obserwacji, że DNA zreplikowany wkrótce po naświetleniu UV jest nieciągły i zawiera jednopasmowe krótkie fragmenty. Taki DNA może być przekształcony podczas dalszej inkubacji w DNA o normalnym ciężarze cząsteczkowym tylko w komórkach zdolnych do rekombinacji *recA*⁺ (81, 82). Obserwacje te sugerowały, że replikacja DNA zawierającego uszkodzenia zostaje zatrzymana w miejscu uszkodzenia i może być rozpoczęta ponownie w miejscu inicjacji nowego fragmentu Okazaki. Przerwy w nowozreplikowanym DNA odpowiadały odcinkom długości 500—1000 nukleotydów (83, 84).

Następujące obserwacje wskazują na udział rekombinacji w reperacji luk postreplikacyjnych w DNA. Proces reperacji wymaga produktu genu *recA* (81, 82), który jest niezbędny także w procesie rekombinacji, oraz produktów genów *recB* i *recC*, względnie *recF* (85). Świadczyłyby to, że przynajmniej jedna z dwóch alternatywnych dróg rekombinacji u *E. coli* (86) musi być czynna, aby zaszła reperacja postreplikacyjna. Produkt genu *recA* kontroluje obie drogi rekombinacji. Jednakże, Ganesan i Swella well (87), badając udział produktów genów *recF* i *lex* w mutantach *uvrA*, niezdolnych do reperacji przez wycinanie, u których jedyną możliwą drogą reperacji jest reperacja postreplikacyjna, wykazały, że przekształcenie niskocząsteczkowego DNA syntetyzowanego po napromienowaniu UV, w DNA o normalnej wielkości wymaga albo funkcji genu *recF*⁺ albo genu *lex*⁺. Świadczy to, że tylko jedna droga rekombinacji *recF* jest istotna w procesie reperacji postreplikacyjnej i nie może być zastąpiona przez drogę *recBC*. Co więcej, wskazuje to, że produkty genów *recF* i *lex* mogą się wzajemnie zastępować. Niezgodność wyników Rothmana i wsp. (85) oraz Ganesan i Swella well (87) może być spowodowana tym, że Rothman i wsp. używali szczepu *uvr*⁺ zdolnego do reperacji przez wycinanie. Przyjmując, że dimer (uszkodzenie) stanowi dla normalnej polimerazy DNA trwały blok w replikacji (sekcja IV) można przypuszczać, że w przypadku szczepu *uvrA*⁺*recF*⁻, po usunięciu dimerów na drodze reperacji przez wycinanie, replikacja DNA została odblokowana. W mutancie *recF*⁻ mogła zatem zachodzić normalna synteza wysokocząsteczkowego DNA, którą Rothman i wsp. przypisywali reperacji na drodze *recBC* rekombinacji. Brak wpływu mutacji w genach *recB* i *recC* na reperację po-

streplikacyjną po UV obserwowali Smith i Meun (82). Produkty genów *recB* *recC* (ATP-zależna egzonukleaza V) (88) są natomiast potrzebne w reoperacji rekombinacyjnej po promieniowaniu X, gdzie mogą być zastąpione przez egzonukleazę rekombinacyjną faga lambda (89).

Na udział rekombinacji w procesie reoperacji postreplikacyjnej wskazują także badania, w których wykazano wymiany między siostrzanymi pasmami DNA, to jest pasmem wyjściowym, zawierającym dimery i pasmem zsyntetyzowanym po naświetleniu UV. Towarzyszy temu przenoszenie dimerów z pasma wyjściowego na pasmo potomne (84, 87, 90). Ponadto znane są inne przykłady gdzie proces rekombinacji genetycznej uczestniczy w reoperacji fotochemicznych uszkodzeń DNA, jak np. reaktywacja mnoga faga T4 (91), reaktywacja profagowa (92, 93) czy reaktywacja na drodze „*marker rescue*” (94). Obserwowano również, że napromieniowanie UV, podobnie jak potraktowanie czynnikami chemicznymi o działaniu mutagennym, zwiększa częstotliwość rekombinacji u wielu mikroorganizmów (95—100) oraz wymiany genetyczne w somatycznych komórkach ssaków (101—106). Rekombinacje wydają się być stymulowane przez luki w DNA (przejściowe jednopasmowe odcinki DNA), np. luki postreplikacyjne w uszkodzonym DNA (80, 107) lub powstające po nacięciu przez endonukleazę w przypadku reoperacji wiązań poprzecznych w DNA (79, 108). W obu przypadkach struktura luki jest zbliżona, ponieważ pasmo komplementarne zawiera naprzeciw luki uszkodzenie przeszkadzające w replikacji DNA. Takie luki w DNA mogą stymulować wymiany genetyczne.

Bridges i Sedgwick (109, 110) sugerują możliwość wypełniania luk postreplikacyjnych na drodze syntezy *de novo* z udziałem polimerazy DNA I lub III w obecności produktu genu *lex*⁺. Ganesan i Swewell (87) zaobserwowały, że przekształceniu krótkich segmentów DNA, syntetyzowanego wkrótce po naświetleniu UV w DNA o dużym ciężarze cząsteczkowym, zawsze towarzyszą wymiany genetyczne między pasmami naświetlonymi i potomnymi. Na tej podstawie wykluczają możliwość reoperacji luk postreplikacyjnych zarówno na drodze syntezy *de novo*, jak również z udziałem indukcyjnego systemu „reoperacji SOS”, który replikowałby uszkodzony DNA w sposób ciągły (sekcja III).

Wydaje się jednak, że te pozornie sprzeczne fakty można pogodzić wprowadzając pewne modyfikacje do modelu reoperacji postreplikacyjnej (28). Zgodnie z hipotezą reoperacji SOS (111—114) uszkodzenia w DNA hamują replikację przy udziale polimeraz uczestniczących w normalnej replikacji DNA (polimerazy konstytutywne). Zahamowanie to indukuje nową polimerazę, lub czynnik modyfikujący normalną polimerazę DNA, w sposób umożliwiający jej replikację uszkodzonego DNA („SOS polimeraza DNA”). Replikacja DNA z udziałem polimerazy SOS jest mniej dokładna i może popełniać błędy przede wszystkim w miejscach odpowiadających uszkodzonym zasadom w matrycy, a także w innych miejscach. W przypadku gdy w matrycy DNA uszkodzone zasady znajdują się obok siebie, w t.zw.

traktach, replikacja DNA z udziałem SOS polimerazy może prowadzić do utworzenia odcinków niesparowanych lub źle sparowanych, wymagających reperacji. Reperacja mogłaby zachodzić na drodze rekombinacji. Odcinki niesparowane stymulowałyby wymiany genetyczne, zaś w miejscach gdzie zmodyfikowane zasady występują pojedynczo, błędnie włączony nukleotyd może powodować mutację.

Następujące fakty podtrzymują taką hipotezę. Brak produktu genu *lex* w mutancie *lex*⁻ oraz w komórkach *lex*⁺ w obecności inhibitora syntezy białka, co uniemożliwia indukcję systemu reperacji SOS, powoduje trwale zahamowanie syntezy DNA po napromieniowaniu (87, 115, 116). Produkt genu *lex*⁺ jest równie niezbędny do indukcji systemu reperacji SOS (hipotetycznej „SOS polimerazy DNA”) (111) jak i w procesie reperacji postreplikacyjnej (87). W komórkach *lex*⁺ przejściowe zahamowanie syntezy DNA po napromieniowaniu UV trwa 30—45 min (87, 116), co odpowiada okresowi potrzebnemu do indukcji systemu reperacji SOS (117, 118). Po tym okresie synteza przebiega podobnie jak w komórkach kontrolnych (87, 115, 116). Świadczy to, że podczas przejściowego zahamowania nastąpiły zmiany pozwalające na replikację uszkodzonego DNA. Uszkodzenia te nie zostały usunięte, ponieważ szczep był niezdolny do reperacji przez wycinanie (*uvrA*⁻) (87). Tak więc, ponowna synteza DNA odbywała się najprawdopodobniej przy udziale zindukowanej polimerazy SOS. Inkorporacja radioaktywnej tymidyny w ciągu pierwszych 10 min po napromieniowaniu UV, przebiegała w tych doświadczeniach podobnie w komórkach *lex*⁻ i *lex*⁺, po czym w przypadku *lex*⁻ następowało trwale zahamowanie, a w przypadku *lex*⁺ przejściowe. Sugeruje to, że replikacja DNA po UV zaczyna się normalnie i zostaje zahamowana dopiero w momencie, kiedy punkt replikacyjny napotka uszkodzenie, a wznowienie jej wymaga indukcji produktu genu *lex*⁺. Potwierdzają to obserwacje, że w komórkach *uvrA*⁻ po przejściowym zahamowaniu replikacji po napromieniowaniu UV wznowienie jej następuje z istniejącego punktu replikacji, a nie od stałego miejsca inicjacji na chromosomie (119, 120). Wcześniejsze doniesienia, że w komórkach *uvrA*⁺ replikacja ulega zahamowaniu natychmiast po napromieniowaniu UV, a po usunięciu dimerów rozpoczyna się w stałym miejscu inicjacji (119, 120, 121), nie znalazły potwierdzenia w badaniach D o u d n e y a (116). Wykazał on bowiem dla szczepu *uvrA*⁺ liniową zależność między dawką UV, a ilością DNA zreplikowanego po napromieniowaniu przed przejściowym zahamowaniem. We wcześniejszych badaniach nad szczepem *uvrA*⁺ stosowano zbyt wysokie dawki UV (600 ergów/mm²), ponieważ szczep ten wykazuje resztkową replikację DNA po napromieniowaniu UV dawkami nie przekraczającymi 60 ergów/mm² (116).

Replikacja DNA po napromieniowaniu UV jest wrażliwa na chloramfenikol tylko przez 30—40 min, to jest okres potrzebny do indukcji polimerazy SOS, po czym replikacja może zachodzić w obecności inhibitora przez kilka cykli replikacyjnych (122). Fakt, że dimery mogą pozostawać

w DNA przez kilka pokoleń (90, 123) wskazuje, że w odróżnieniu od normalnej (konstytutywnej) polimerazy DNA, indukowana po napromieniowaniu UV, polimeraza SOS nie jest przez nie hamowana (124).

W proponowanym powyżej modelu reperacji postreplikacyjnej zakłada się, że replikacja DNA po naświetleniu powinna dawać DNA ciągły, natomiast, zgodnie z hipotezą Rupp i Howard-Flandersa (81) nowo syntetyzowane pasmo DNA jest nieciągłe i zawiera luki w miejscach odpowiadających dimerom w paśmie komplementarnym. Dotychczasowe badania nie wydają się jednak w pełni przekonujące. Pulsowe znakowanie stosowane do śledzenia losu DNA nowo zsyntetyzowanego po napromieniowaniu UV, na ogół ogranicza się do pierwszych 10 min, w którym to okresie synteza nie jest jeszcze zahamowana (87, 116), a obserwowany niskocząsteczkowy DNA może pochodzić z reszkowej replikacji przed jej zahamowaniem. Dotychczasowe badania nie pozwalają na rozróżnienie, czy synteza DNA po napromieniowaniu odbywa się istotnie na całym chromosomie, z przerwami w miejscach uszkodzonych, czy też tylko między punktem inicjacji, a pierwszym napotkanym uszkodzeniem. W komórkach organizmów wyższych, w których czas syntezy DNA (faza S) wynosi 8 godz. niskocząsteczkowy DNA wykrywano tylko w ciągu 1—2 godz replikacji DNA po napromieniowaniu UV (125—127).

Należy zwrócić uwagę, że proponowany udział SOS polimerazy DNA nie wyklucza możliwości, że replikacja DNA po UV odbywa się w sposób nieciągły, z lukami w miejscach odpowiadających uszkodzeniom. Zasadniczą cechą takiej polimerazy, odróżniającą ją od normalnej polimerazy DNA, byłaby jej zdolność replikacji DNA zawierającego uszkodzenia.

III. Hipoteza reperacji SOS.

Hipoteza reperacji SOS powstała w związku z próbami wyjaśnienia mechanizmu mutagenyzy indukowanej przez promienie UV. Od czasu powiązania powstawania mutacji z procesami reperacji DNA postulowano, że przynajmniej jeden z procesów reperacji jest niedokładny i odpowiada za mutacje. Badania wykazały, że fotoreaktywacja i reperacja przez wycinanie z udziałem DNA polimerazy I są bezbłędne, natomiast reperacja postreplikacyjna z udziałem produktów genów *recA* i *lex* często prowadzi do mutacji (2). Następnie stwierdzono, że mutanty *lexA*⁻ niezdolne do mutacji pod wpływem promieni UV jonizujących oraz głodu tyminowego (128—130) wykazują reperację postreplikacyjną (131), która nie daje mutacji, a zatem jest wolna od błędów. Świadczy to, że mutagenyza wiąże się z reperacją postreplikacyjną tylko wtedy, gdy zachodzi z udziałem produktu genu *lexA*.

Radman (111) zaproponował hipotezę, w myśl której system reperacji skłonny do błędów („*error prone*”) byłby indukowany natomiast pozostaje

stałe byłyby konstytutywne. System indukowanej reperacji stanowiłby odpowiedź komórki na trwałe uszkodzenie DNA, zagrażające jej życiu. Stąd nazwa reperacji SOS. Takim zagrożeniem może być zahamowanie normalnej replikacji DNA np. kwasem naliksydowym lub mitomycyną C lub w skutek uszkodzenia DNA spowodowanego przez promieniowanie bądź mutageny chemiczne. Radman uważa, że w komórce istnieją dwa niezależne systemy replikacji DNA: jeden konstytutywny, replikujący DNA w normalnych warunkach w sposób semikonserwatywny, dokładny i zachowujący pełną informację genetyczną; drugi, indukowany w przypadku, gdy uszkodzenia w DNA uniemożliwiają normalną replikację. Indukowany system replikacji jest niedokładny, gdyż powiela DNA zawierający zmodyfikowane zasady, co prowadzi do zmian w zapisie informacji genetycznej. Zdaniem Radmana czynnikiem indukowanym może być odrębna polimeraza DNA, („polimeraza SOS”) bądź też czynnik modyfikujący normalną polimerazę w sposób umożliwiający jej replikację uszkodzonego DNA. Hipoteza reperacji SOS opiera się na następujących obserwacjach. Przeżycie i mutageneza fagów lambda inaktywowanych promieniami UV zwiększa się znacznie, jeśli komórki gospodarza przed infekcją zostaną naświetlone UV (132, 133, 135). Jest to t.zw. UV-reaktywacja lub, jak proponuje Radman (111), W-reaktywacja. Proces ten wymaga aktywności genów *recA*⁺ i *lex*⁺ oraz syntezy białka (118, 133).

Ponadto mutageneza faga lambda (132, 133) i faga Φ X 174 (135) indukowana promieniami UV nie zachodzi, jeśli komórki gospodarza nie były napromieniowane przed infekcją, natomiast zachodzi w komórkach napromieniowanych nawet wtedy, gdy fag nie był napromieniowany. W związku z tym uważano, że sama obecność uszkodzeń w DNA nie wystarcza do indukcji mutacji faga, i że w naświetlonej komórce gospodarza musi być indukowany jakiś czynnik, który jest istotny w mutagenezie faga. Radman, biorąc pod uwagę fakt, że synteza DNA po napromieniowaniu UV jest hamowana (115, 136), uważał, że czynnikiem indukowanym w komórce gospodarza po napromieniowaniu mogłaby być polimeraza DNA zdolna do replikacji uszkodzonego DNA. Znamienny wydaje się fakt, że W-reaktywację wykazują tylko fagi łagodne, korzystające z polimerazy DNA gospodarza. Badania *in vivo* i *in vitro* nad replikacją DNA faga Φ X 174 napromieniowanego UV wskazują, że normalne konstytutywne polimerazy DNA nie replikują DNA uszkodzonego fotochemicznie, czynić to może natomiast polimeraza DNA typu *error prone* (124). Na istnienie indukcyjnego systemu reperacji SOS wskazują ponadto badania nad zjawiskiem pośredniej W-reaktywacji i mutagenezy faga lambda oraz pośredniej indukcji profaga (93, 134, 137). W procesie W-reaktywacji pośredniej, podobnie jak w pozostałych, indukcję funkcji komórki gospodarza, która warunkuje zwiększenie przeżycia i frekwencji mutacji faga, uzyskuje się przez wprowadzenie do komórki, przed infekcją, naświetlonego UV fragmentu DNA (chromozomu lub epizomu) drogą koniugacji. Uważa się, że wprowadzenie UV-

-uszkodzonego DNA indukuje system reperacji SOS w komórce biorecy (134). Jednakże wydaje się, że w rozważaniach nad mechanizmem W-reaktywacji pośredniej nie można pominąć możliwości, że wraz z przekazywanym chromozomem z komórki F^+ do F^- przeniesiona zostaje polimeraza DNA. Polimeraza ta różni się pod kilkoma względami od normalnej polimerazy DNA i ma cechy polimerazy SOS (111). Nie jest ona hamowana przez uszkodzenia w DNA i jest typu „rolling circle” (138—140). Ewentualne przekazywanie takiej polimerazy DNA razem z chromosomem wyjaśniałoby różnice dotyczące wymagań produktu genu lex^+ w UV-mutageniezie pośredniej i bezpośredniej faga lambda (137). Obserwowano bowiem, że w UV-mutageniezie pośredniej, w odróżnieniu od bezpośredniej, produkt genu lex^+ nie jest potrzebny (137).

Związek między indukcją systemu reperacji SOS, a mutagenizacją wykazano także w UV-mutageniezie u bakterii (114, 117, 141—144). System SOS indukuje wiele czynników, jak np. promieniowanie UV, i jonizujące (129), niektóre czynniki chemiczne (97, 145—149) oraz warunki inkubacji bakterii powodujące zaburzenia metabolizmu DNA, np. temperatura 42°C dla mutantów termowrażliwych, *dnaBts* (113), *lig ts* (mutacja w genie liganzy) (150, 151) oraz w obecności inhibitorów replikacji DNA.

Na ogół indukcja systemu reperacji SOS jest związana z zahamowaniem replikacji DNA, albo z obecnością uszkodzeń, którym towarzyszą pęknięcia jednego z pasm DNA. Ciekawy w związku z powyższym jest mutant *tif*. Mutant ten w temperaturze 30°C zachowuje się normalnie natomiast po przeniesieniu do 42°C zaczyna zachowywać się tak, jak komórka naświetlona UV, t.j. wykazuje indukcję profaga, W-reaktywację faga lambda, filamentację (152) oraz zwiększoną mutagenizację spontaniczną i indukowaną UV (141, 153). Zjawiska te w mutancie *tif*, podobnie jak w normalnych komórkach *E. coli* po UV, związane są z aktywną syntezą białka i aktywnością genów *recA* i *lex*. W związku z tym uważa się, że w mutancie *tif* zachodzi termiczna indukcja lub derepresja systemu reperacji SOS (154). Interesujący wydaje się fakt, że w mutancie *tif* w temperaturze 42°C nie stwierdzono zahamowania replikacji, ani żadnych zmian w DNA, które zwykle towarzyszą indukcji systemu reperacji SOS (155).

IV. Zahamowanie syntezy DNA jako wynik działania promieni UV.

Pierwsze doniesienia wskazujące, że obecność fotoproduktów w DNA powoduje zahamowanie replikacji, pochodzą z wczesnych badań Setlowa i jego grupy (115). Obserwowano, że w szczepie *E. coli* Bs-1 wrażliwym na UV replikacja DNA jest nieodwracalnie zahamowana po naświetleniu komórek promieniami UV, natomiast w szczepie opornym, *E. coli* B/r, zahamowanie to jest przejściowe. Interpretowano to w ten sposób, że fotoprodukt, jeśli nie został usunięty z DNA na drodze reperacji, nieodwracal-

nie hamuje replikację. Następnie badania Rupp i Howard-Flandersa oraz innych badaczy (81, 136) nad reperacją postreplikacyjną DNA przyczyniły się do ugruntowania poglądu, że obecność fotoproduktu w DNA nie hamuje replikacji, a tylko obniża jej szybkość. Wykazano bowiem, że wrażliwy mutant *E. coli uvrA⁻*, niezdolny do reperacji przez wycinanie, replikuje DNA po napromieniowaniu chociaż z dużym opóźnieniem. W związku z hipotezą reperacji SOS, sprawa ta wymaga ponownego rozpatrzenia. Jak wspomniano wyżej hipoteza ta zakłada, że obecność fotoproduktu w DNA stanowi blok w replikacji, przynajmniej z udziałem normalnej polimerazy DNA, a ponowne rozpoczęcie replikacji jest możliwe dopiero po indukcji polimerazy DNA SOS zdolnej do replikacji uszkodzonego DNA. Następujące fakty zdają się potwierdzać, że replikacja DNA naświetlonego UV nie przebiega wolniej a raczej jest przejściowo zahamowana w miejscu występowania uszkodzenia, a po indukcji polimerazy SOS zachodzi z szybkością podobną do normalnej. Reperacja postreplikacyjna wymaga produktów genów *recA* i *lex*, ale tylko produkt genu *lex* wydaje się być bezpośrednio związany z indukcją polimerazy SOS. Trwałe zahamowanie replikacji DNA po napromieniowaniu UV obserwuje się bowiem w podwójnych mutantach *uvrA⁻lex⁻* (87, 115), lub w komórkach *lex⁺* w obecności chloramfenikolu t.j. wówczas, gdy indukcja produktu genu *lex* nie jest możliwa (118, 141, 143). Jest więc bardzo prawdopodobne, że obserwowane przez Rupp i Howard-Flandersa (87) zmniejszenie szybkości replikacji DNA po UV jest związane z opóźnieniem niezbędnym dla indukcji polimerazy SOS. Doudney (116) badając kinetykę syntezy DNA po napromieniowaniu UV obserwował 30—40 min zahamowanie replikacji, co odpowiadało dokładnie okresowi wymaganemu do indukcji systemu reperacji SOS (117, 118). Wznowiona replikacja przebiegała z szybkością podobną do szybkości replikacji w komórkach nie naświetlonych.

V. Fotoprodukty odpowiedzialne za efekt biologiczny promieniowania UV.

Ponownego przedyskutowania wymaga problem, który z fotoproduktów w DNA powoduje takie efekty biologiczne, jak zahamowanie replikacji DNA, mutageneza lub śmierć komórki. Obecnie rozpowszechniony jest pogląd, że fotoproduktami tymi są w głównej mierze dimery pirymidyn. Przekonanie to opiera się przede wszystkim na fakcie, że znaczna część uszkodzeń wywołujących takie efekty biologiczne jest odwracana przez fotoreaktywację, oraz, że w napromieniowanym UV DNA wykrywano obecność dimerów (156). Ponadto powstawanie innych fotoproduktów jak np. fotohydratów cytozyny jest utrudnione w dwupasmowym DNA i powstają one ze znacznie niższą wydajnością niż dimery (5, 157). Należy zwrócić uwagę, że w badaniach nad identyfikacją fotoproduktów w DNA *in vitro* i *in vivo* używano dawek UV znacznie przewyższających dawki biologiczne, przy

których dimery mogą stanowić główny fotoprodukt. Nie musi to oznaczać, że są one istotnie odpowiedzialne za efekty biologiczne. Wiadomo obecnie, że tak niskie dawki UV jak 5 ergów/mm² dla mutantów wrażliwych na UV i 20—40 ergów/mm² dla szczepów opornych, powodują zahamowanie replikacji DNA (115, 116) i efekty mutagenne (112, 113) oraz letalny. W badaniach fotochemicznych nad syntetycznymi polinukleotydami obserwowano, że po niskich dawkach UV główny fotoprodukt stanowią fotohydraty (158).

Ponadto, istotną rolę w zjawiskach fotobiologicznych mogą odgrywać wiązania poprzeczne między DNA i białkami, które powstają przy niskich dawkach UV w DNA *E. coli* ze znacznie wyższą wydajnością niż dimery (159). Co więcej, naświetlanie UV komórek w temperaturze -79°C zwiększa liczbę wiązań DNA-białko i obniża dimeryzację pirymidyn (159), czemu towarzyszy większy efekt letalny i mutageny (160, 161).

Mechanizm powstawania wiązań DNA-białko nie jest bliżej poznany. Być może powstają one wtórnie w wyniku reakcji fotohydratów cytozyny z otaczającymi białkami. Fotohydraty powstają wprawdzie z małą wydajnością w dwupasmowym DNA, ale mogą się tworzyć w jednopasmowych odcinkach powstających podczas replikacji lub transkrypcji DNA. Być może jest to jedna z przyczyn większej wrażliwości wobec UV bakterii naświetlanych w logarytmicznej fazie wzrostu.

Przyjęte powszechnie wnioskowanie, o roli dimerów na podstawie odwracalności efektów biologicznych napromieniowania przez fotoreaktywację, wydaje się nie w pełni słuszne, ze względu na fakt istnienia zjawiska fotoreaktywacji pośredniej. Fotoreaktywacja pośrednia nie jest swoista wobec dimerów i może dotyczyć także innych fotoproduktów. W typowych warunkach doświadczalnych trudno jest odróżnić fotoreaktywację enzymatyczną swoistą dla dimerów od fotoreaktywacji pośredniej. Potwierdza to obserwacja, że fotoreaktywacja obniża UV-indukowaną rewersję mutacji *try*⁻ do *try*⁺ w mutancie *phr*⁻, niezdolnym do fotoreaktywacji enzymatycznej (161). Mimo dokonania tej obserwacji w roku 1963, do dziś stosuje się fotoreaktywację jako sposób określania rodzaju fotoproduktu odpowiedzialnego za badany efekt, nawet w przypadku badań nad mutagenizacją indukowaną UV w genie *try* (163, 164).

Udział dimerów w zahamowaniu replikacji DNA też wydaje się wątpliwy. Świadczy o tym fakt, że fotoreaktywacja nie skraca okresu przejściowego zahamowania replikacji DNA po napromieniowaniu UV, a jedynie podwyższa ilość i szybkość syntezy po jej wznowieniu (116, 165).

V-1. Fotoprodukty odpowiedzialne za mutacje.

Dimery. Dotychczasowe opinie na temat udziału dimerów w mutagenie opierają się głównie na badaniach efektu fotoreaktywacji na muta-

genezę indukowaną promieniami UV. Jak wykazano powyżej, badania te nie dają pewności, czy efekt ten jest istotnie związany z fotoreaktywacją enzymatyczną, czy też wiąże się z fotoreaktywacją pośrednią, lub zjawiskiem MFD (sekcja VI). Przeciwno dimerom jako głównym uszkodzeniom przedmutacyjnym przemawiają także inne fakty. Dimery mogą pozostawać w DNA przez kilka pokoleń (87, 90), a mutacje powstają tylko w pierwszym pokoleniu po napromieniowaniu UV lub najdalej w drugim (163). Ponadto promienie UV indukują głównie mutacje punktowe, powodujące zamianę w DNA pary zasad G—C na AT, a rzadko AT na G—C (1, 166). Gdyby dimery były przyczyną tych mutacji, należałoby się spodziewać głównie zamiany A—T na G—C. Dimery tyminy powstają bowiem z największą wydajnością. Podobnie w fagu S13 zawierającym jednopasmowy DNA, wszystkie mutacje indukowane przez UV dotyczą zamiany C na T, a nie odwrotnie (167). Fag T4 naświetlony w warunkach, w których poza niezidentyfikowanymi fotoproduktami jako jedyne dimery mogły powstawać dimery tyminy, wykazywał również zmianę pary G—C na A—T (166). Fakty te sugerują, że fotoprodukty cytozyny są przyczyną mutacji indukowanych UV. Poza tym UV indukuje głównie mutacje punktowe, co wskazuje, że błąd w replikacji DNA z uszkodzeniami przedmutacyjnymi dotyczy jednej zasady. W przypadku dimeru należałoby bowiem spodziewać się błędnego włączenia dwóch zasad. Ilustruje to przykład mutacji supresorowych, gdzie przejściu mutacji *ochre* w *opal* towarzyszy zamiana jednej środkowej litery kodu (UAA → UGA).

Fotohydraty cytozyny. Mutageneza indukowana przez promieniowanie UV w mutantach wrażliwych (*uvrA*⁻; *polA*⁻; *dnaB ts*) zachodzi po napromieniowaniu bardzo niskimi dawkami UV (112, 113), przy których głównym fotoproduktem mogą być fotohydraty cytozyny lub wiązania między DNA i białkiem. Powstawanie fotohydratów cytozyny wyjaśniałoby indukowane zamiany zasad G—C na A—T, jak również indukcję mutacji punktowych przez promieniowanie UV. Fotohydraty powstają łatwiej w jednopasmowych odcinkach DNA występujących w komórkach szybko dzielących się. W mutantach *polA*⁻ i *dnaB ts* odcinków jednopasmowych może być więcej (168), co usprawiedliwiałoby ich dużą wrażliwość na mutagenne działanie UV (113, 181). Fotohydraty cytozyny jako uszkodzenie przedmutacyjne odpowiadają zarówno klasycznemu założeniu, zgodnie z którym zmodyfikowana zasada paruje błędnie, jak i przypuszczeniu, że mutacja powstaje w miejscu pozbawionym zdolności do tworzenia wiązań wodorowych (sekcja IX) np. w miejscu apirymidynowym wskutek deaminacji fotohydratu cytozyny i usunięcia powstałego uracylu przez N-glikozydazę.

Wiązania DNA-białko. Istnieją dane sugerujące, że wiązania DNA-białko mogą także stanowić przyczynę mutacji. Naświetlanie komórek *E. coli* promieniami UV w temperaturze -79°, t.j. w warunkach faworyzujących powstawanie wiązań DNA-białko (159), podwyższa 7-krotnie częstotliwość

mutacji (161). Przy użyciu szczepów wrażliwych na UV udało się wykazać, że do indukcji mutacji wystarczają bardzo niskie dawki promieniowania, przy których główny fotoprodukt stanowią wiązania DNA-białko (159).

Niewiele wiadomo na temat mechanizmu powstawania takich wiązań. Na podstawie obserwacji *J a n i o n* i *S h u g a r a* (169), że dwuhydrocytozyna w reakcji z glicyną wymienia grupę aminową w pozycji C4 na grupę aminową glicyny (transaminacja), *S m i t h* (170) zakłada podobny mechanizm fotochemicznego powstawania wiązań DNA-białko.

Wiązania DNA-białko mogą powstawać także pod wpływem mutagenów chemicznych (171—174) i promieniowania jonizującego (175). Ostatnio donoszono, że wiązania DNA-białko mogą być usuwane prawdopodobnie na drodze reoperacji przez wycinanie (176).

VI. Procesy reoperacji DNA a zjawisko obniżenia frekwencji mutacji (*mutation frequency decline, MFD*).

Wydajność mutagenezy indukowanej UV zależy od warunków inkubacji bakterii po naświetleniu UV. Inkubacja w warunkach ograniczających syntezę białek (inhibitory syntezy białka lub brak wymaganego aminokwasu) powoduje bardzo szybki i znaczny spadek liczby mutantów. Zjawisko to nazwano MFD (*mutation frequency decline*). Wiąże się je z reoperacją przez wycinanie, ponieważ w mutancie *uvrA*⁻, ani w obecności inhibitorów reoperacji przez wycinanie, nie obserwowano efektu MFD (2). Badania kinetyki MFD i wycinania dimerów wykazały, że utrata potencjalnych mutantów w warunkach sprzyjających MFD jest znacznie szybsza niż wycinanie dimerów. Budziło to wątpliwości, czy MFD jest istotnie związane z procesem reoperacji przez wycinanie (177, 178, 179). Jednakże obserwowano, że potraktowanie przed transfekcją napromieniowanego UV DNA z faga λ UV-endonukleazą znacznie obniża jego W-reaktywację i eliminuje większość *c* (*clear*) mutacji faga (180). Wskazuje to, że MFD wiąże się prawdopodobnie z pierwszym etapem procesu reoperacji przez wycinanie, t.j. nacinaniem przez UV-endonukleazę. Nacięcie przez endonukleazę prawdopodobnie wyklucza możliwość reoperacji uszkodzenia z udziałem systemu SOS i kieruje na bezbłądną drogę reoperacji przez wycinanie.

Można także przypuszczać, że przyczyną MFD jest zahamowanie syntezy białka, uniemożliwiająca indukcję systemu reoperacji SOS. Jednakże fakt, że maksymalny efekt MFD występuje już po 5—10 min (181), a indukcja systemu SOS wymaga 30—40 min (117, 118) sugeruje, że nacięcie przez endonukleazę jest momentem decydującym. Istotna rola endonukleazy znajduje potwierdzenie w fakcie, że mutacja w genie *polA* nie wpływa na MFD (181).

Zjawisko MFD występuje także w mutagenezie indukowanej przez mutageny chemiczne (182—185).

VII. Mutageneza chemiczna a procesy reperacji DNA.

Zgodnie z klasyczną hipotezą błędu parowania (*mispairing*) mechanizm mutagenezy spontanicznej i indukowanej przez mutageny chemiczne wyjaśniano w następujący sposób. Zakładano, że naturalne zasady kwasów nukleinowych, ich analogi oraz zasady zmodyfikowane pod wpływem mutagenów chemicznych mogą występować w formach tautomerycznych i zjonizowanych, co może wpływać na ich zdolność tworzenia wiązań wodorowych. Prowadziłoby to do błędnego włączania zasad podczas replikacji DNA i powodowało mutację (1). Fizykochemiczne badania zmodyfikowanych zasad pozwoliły przewidzieć, w jaki sposób modyfikacja zasady zmienia ich zdolność tworzenia wiązań wodorowych i parowania z komplementarną zasadą. Początkowo postulowano możliwość błędnego parowania tylko między purynami i pirymidynami, co ograniczało możliwość powstawania błędnych par i nie pozwalało na wyjaśnienie powstawania mutacji typu transwersji (1). Ostatnio postulowano możliwość błędnego parowania także między dwiema purynami. W tym przypadku oprócz zmiany formy tautomerycznej wymagana byłaby także zmiana konfiguracji wiązania glikozydowego z *anty* na *syn* (186). Ten klasyczny mechanizm mutagenezy proponowano dla wyjaśnienia sposobu indukcji przez takie mutageny jak analogi zasad, czynniki alkilujące, hydroksyloamina czy kwas azotawy.

Do przyjęcia się hipotezy błędnego parowania przyczyniły się między innymi badania nad transkrypcją i replikacją DNA w układach *in vitro* przy użyciu zmodyfikowanych matryc. W badaniach tych wykazano nieprawidłowe włączanie nukleotydów. Jednakże występowanie zmienionych form zasad w DNA wydaje się mało prawdopodobne. Struktura podwójnego heliksu nie sprzyja formom zjonizowanym, a polimeraza DNA prawdopodobnie nie akceptowałaby zjonizowanej zasady w matrycy. Badania nad fagiem S13 nie dostarczyły dowodów, że formy tautomeryczne w matrycy stanowią przyczynę mutagenezy indukowanej przez hydroksylaminę i kwas azotawy (187). Badania nad fagami wskazują, że również jonizacja nie wydaje się być istotnym czynnikiem w mutagenezie (187, 188). Badania nad kompleksowaniem homopolinukleotydów z chemicznie zmodyfikowanymi zasadami wskazują, że zmodyfikowane zasady mogą być w ogóle pozbawione zdolności tworzenia wiązań wodorowych (189—191). Wskazują na to także badania nad konformacją cytozyny zmodyfikowanej pod wpływem hydroksyloaminy (192). Obserwacje te w znacznym stopniu podważają hipotezę błędnego parowania jako mechanizmu powstawania mutacji. Sugerują natomiast, że włączanie zasady w miejscu odpowiadającym zmodyfikowanej zasadzie odbywa się przypadkowo, ponieważ matryca w tym

miejscu nie zawiera informacji dla włączenia odpowiedniej zasady. Wykazanie, że większość uszkodzeń w DNA indukowanych przez czynniki chemiczne jest usuwana przez mechanizmy reperacji, zwróciło uwagę na możliwość ich udziału także w mutagenezie chemicznej.

VIII. Rola błędnej reperacji DNA w mutagenezie chemicznej.

W przypadku mutagenezy indukowanej przez promienie UV uważa się, że mutacja powstaje w wyniku błędnej reperacji uszkodzeń fotochemicznych, z udziałem systemu reperacji SOS, zależnego od funkcji genów *recA* i *lex*. W związku z tym powszechnie przyjętym kryterium dla ustalenia, czy mutageneza indukowana przez badany czynnik zachodzi na drodze błędnej reperacji, czy też bezpośrednio, w wyniku włączenia błędnej zasady, jest badanie mutagenezy w mutantach *lex*⁻ lub *recA*⁻. Na tej podstawie uważa się, że mutageneza indukowana przez niektóre czynniki chemiczne zachodzi na drodze błędnej reperacji, a przez inne wyłącznie na drodze błędnej inkorporacji (188). Jednakże dotychczasowe wyniki badań nad udziałem mechanizmu reperacji SOS w mutagenezie chemicznej są nie wystarczające z kilku powodów. Po pierwsze, brak jest systematycznych badań nad efektem mutacji w genach *recA* i *lex* dla mutagenów chemicznych w ujednoliconych warunkach doświadczalnych. Nabiera to znaczenia szczególnie w świetle obserwacji, że zapotrzebowanie na produkt genu *lex* w mutagenezie indukowanej przez N-metylo-N-nitrozo-mocznik zależy od fazy wzrostu (149). Ponadto badanie roli genów *lex* i *recA* w mutagenezie chemicznej nie może stanowić właściwego kryterium mechanizmu mutagenezy, bowiem rola produktów tych genów jest słabo poznana. Niektóre dane wskazują, że gen *lex* może być bezpośrednio związany z indukcją systemu reperacji SOS i mutagenezą (143, 193) natomiast inne sugerują, że jego rola może być pośrednia podobnie jak rola genu *recA* i może dotyczyć ochrony DNA przed degradacją (194—196). Jeśli dotyczyłaby ochrony przed degradacją, w przypadku mutagenów nie powodujących znacznej degradacji DNA, ich produkty nie byłyby konieczne do mutagenezy. Na słuszność takiego przypuszczenia może wskazywać fakt, że indukcja białka X związanego systemem reperacji SOS, wymaga zahamowania replikacji DNA i jego degradacji (197).

Można także przypuszczać, że produkt genu *lexA* kontroluje jeden z pierwszych etapów złożonego procesu reperacji SOS, a mianowicie etapu, w którym rozpoznawany jest określony typ uszkodzenia. Być może uszkodzenia przedmutacyjne spowodowane przez niektóre czynniki chemiczne, wymagają produktu innego genu kontrolującego reperację SOS niż *lexA* i dopiero dalsze etapy mogą być wspólne. Analogicznie przedstawia się sytuacja w procesie reperacji przez wycinanie, gdzie endonukleazy rozpoznające uszkodzenia są różne dla różnych uszkodzeń, a dalsze etapy re-

peracji są wspólne. Na przykład u drożdży, posiadających wiele genów związanych z reperacją DNA i mutagenezą, tylko niektóre są istotne zarówno w mutagenezie indukowanej przez promieniowanie i przez czynniki chemiczne, a inne wyłącznie w mutagenezie indukowanej przez promieniowanie (198). Ostatnio izolowano kilka mutantów *E. coli* z różnymi mutacjami w genie *lex* (199, 200), ale brak jest badań dotyczących ich roli w mutagenezie chemicznej.

Ponadto obserwacje, że mutageny chemiczne wywołują szereg zjawisk wiążących się z indukcją systemu reperacji SOS, sugerują jego udział w mutagenezie chemicznej. Mutageny chemiczne indukują bowiem takie zjawiska jak: aktywacja profaga (111, 201—203), tworzenie form długich (filamentacja) oraz mutageneza pośrednia (204).

Badania nad W-reaktywacją faga (205, 206) wskazują, że system reperacji SOS nie jest swoisty wobec jednego typu uszkodzenia DNA. Obserwowano bowiem, że zindukowany przez promienie UV może brać udział w reperacji uszkodzeń chemicznych i odwrotnie. Inne wyjaśnienie tej obserwacji stanowić może przypuszczenie, że różne czynniki powodują ten sam typ uszkodzeń DNA (patrz niżej).

IX. Produkty reakcji mutagenów z DNA a uszkodzenia przedmutacyjne.

Dzięki licznym badaniom nad reakcjami mutagenów z kwasami nukleinowymi lub ich składnikami znanych jest wiele produktów tych reakcji. Jednakże nadal nie jest wiadomo, które z nich powstają w DNA *in vivo* i są odpowiedzialne za efekty biologiczne. Wynika z faktu, że powstawanie ich *in vivo* jest uwarunkowane skomplikowaną strukturą chromozomów i DNA, a identyfikacja jest utrudniona ze względu na ewentualną nietrwałość produktów, oraz szybkie usuwanie. Bardziej szczegółowe omówienie badań nad klasycznymi mutagenami chemicznymi przedstawiają nowsze artykuły przeglądowe (172, 207—210).

Wydaje się, że mimo różnych produktów działania mutagenów, rodzaj przedmutacyjnego uszkodzenia w DNA może być identyczny. Tłumaczyłoby to fakt, że większość mutagenów daje ten sam typ mutacji, t.j. mutacje punktowe, a najczęściej tranzycje pary G—C na parę A—T (188). Takim wspólnym uszkodzeniem przedmutacyjnym mogłyby być miejsca pozbawione zdolności parowania na skutek modyfikacji zasad oraz depurynacji lub depirymidynacji. Miejsca pozbawione zasad mogą powstawać wtórnie w wyniku alkilacji DNA, na skutek usuwania alkilopochodnych puryn i prawdopodobnie pirymidyn. Z kolei działanie czynnikami, które powodują deaminację cytozyny, jak promieniowanie UV, kwas azotawy, dwusiarczek czy ogrzewanie prowadzić może do depirymidynacji (Sekcja II-2a). DNA ulega depirymidynacji także pod wpływem działania hydrazyny (30) i promieniowania jonizującego. W obu przypadkach usuwane są produkty ty-

miny. Cytosyna zmodyfikowana pod wpływem hydroksylaminy traci zdolność tworzenia wiązań wodorowych (189—192) i parowania.

Innym wspólnym uszkodzeniem przedmutacyjnym mogłyby być wiązania poprzeczne między DNA i białkiem. Temu typowi uszkodzeń indukowanych zarówno przez promieniowanie jak i czynniki chemiczne (170, 176) poświęcono dotychczas mało uwagi.

Zarówno wiązania poprzeczne DNA-białko jak i brak informacji do włączania komplementarnej zasady, szczególnie występujących w traktach, mogą być przyczyną zahamowania replikacji DNA, a w konsekwencji indukcji systemu reperacji SOS.

IX-1. Czynniki alkilujące.

W przypadku czynników alkilujących stwierdzono powstawanie szeregu produktów alkilacji DNA (207, 211), co ogromnie utrudnia identyfikację produktu odpowiedzialnego za efekt mutageny bądź letalny. Zgodnie z klasyczną hipotezą mechanizmu mutageny mutageny efekt alkilacji wiązano z błędnym parowaniem zmodyfikowanych zasad. Ponieważ tylko O⁶-alkiloguanina, N³-alkilo-cytosyna i przypuszczalnie O⁴-alkilo-tymina (207) wykazują błędne parowanie, im właśnie przypisuje się udział w mutageny, a depurynację i depirymidynację uznawano za przyczynę efektu letalnego (188). Ostatnie doniesienie, że poli-O⁶-alkilo-G nie tworzy kompleksu z poli-C, poli-A, poli-G i poli-T (191) stawia pod znakiem zapytania jej udział w mutageny, przynajmniej w klasycznym jej rozumieniu. Wyniki te, łącznie z wcześniejszymi wynikami nad kompleksowaniem poli-N³-metylo-C (190) i poli-N⁴-hydroksy-C (189), wskazują na zawodność badań nad błędną inkorporacją podczas replikacji lub transkrypcji zmodyfikowanej matrycy jako metody poznawania mechanizmu mutageny.

Wydaje się, że w rozważaniach nad mechanizmem mutageny indukowanej przez czynniki alkilujące należy zwrócić uwagę nad dwa istotne momenty. Pierwszy, to wykrycie enzymów N-glikozydaz, uracylowej i 3-metylo-adeninowej, które usuwają zmienione zasady z DNA, pozostawiając miejsca apirymidynowe i apurynowe. O⁶-alkilo-guanina, podobnie jak inne alkilowane puryny, jest usuwana z DNA również w postaci zasady (36), a zatem jej efekt mutageny może być związany z depurynacją. Drugi, to fakt, że zarówno miejsca apurynowe i apirymidynowe jak i alkilowane zasady są wydajnie i szybko usuwane na drodze reperacji przez wycinanie. W związku z tym podział na uszkodzenia przedmutacyjne i letalne wydaje się niesłuszny. Jest bowiem bardzo prawdopodobne, że każde uszkodzenie DNA, jeśli nie jest zreperowane na drodze reperacji bezbłędnej, może być reperowane z udziałem niedokładnego systemu reperacji SOS i stać się przyczyną mutacji lub śmierci komórki (mutacja letalna). Wydaje się, że o tym, czy uszkodzenie DNA stanie się przyczyną mutacji, decyduje droga

reperacji, która z kolei zależy od liczby uszkodzeń i aktualnych możliwości reperacji bezbłędnej w komórce. Dość powszechne jest zjawisko, że mutanty niezdolne do reperacji przez wycinanie, szczególnie defektywne w endonukleazę nacinającą, wykazują zwiększoną częstotliwość mutacji. Ponadto, w wielu przypadkach mutageny indukowanej chemicznie obserwowano zjawisko MFD (sekcja VI), co sugeruje, że uszkodzenia potencjalnie mutagenne są usuwane na drodze bezbłędnej reperacji (182—185).

IX-2. Analogi zasad.

5-Bromouracyl (BU). 5-Bromouracyl jest analogiem tyminy łatwo inkorporowanym do DNA fagów, bakterii i komórek organizmów wyższych. Jego działanie mutagenne zgodnie z klasyczną hipotezą mutageny również wiązano z błędnym parowaniem (1). Jednakże badania nad kompleksowaniem polinukleotydów syntetyzowanych z halogenopochodnych pirymidyn oraz badania fizykochemiczne nad strukturą kryształów BU i jego kompleksów z komplementarną zasadą wykazują, że obecność halogenu w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego nie zmienia zdolności parowania. Potwierdzają to badania *in vitro* oraz *in vivo*, w których stwierdzono, że obecność BU w matrycy nie zwiększa w sposób wyraźny liczby błędnie włączonych nukleotydów (212). Istnienie szczepów bakteryjnych (213, 214) i linii komórek ssaków, które nie tylko tolerują ale wymagają BU do wzrostu, oraz fakt, że komórki melanomy chomika syryjskiego po 300 pasażach w obecności BU (100% włączenia) zachowują żywotność, nie wykazując zmian genetycznych (215), potwierdzają, że BU w DNA ma niezmienną własność parowania.

Nowsze badania wskazują na udział procesów reperacji w mutagenie indukowanej przez BU. Obserwowano, że wydajna mutageny faga λ wymaga funkcji genów *red* faga lub *recA* i *lex* gospodarza (97), a także, że letalne i mutagenne uszkodzenia DNA powstałe na skutek inkorporacji BU do DNA, są usuwane na drodze reperacji przez wycinanie (183, 184, 216). W badaniach nad mutageną indukowaną *E. coli* B nie obserwowano efektu mutacji w genach *lexA* ani *recA* (217). Różnice między wynikami uzyskanymi w badaniach nad fagiem i *E. coli* B mogą być spowodowane odmiennymi warunkami doświadczalnymi jak i tym, że dotyczyły one różnych obiektów. W badaniach nad *E. coli* B (217) stosowano głodzenie tyminowe komórek przed podaniem BU w celu zwiększenia włączenia analogu do DNA. Mogło to spowodować indukcję mutacji nie w wyniku działania BU, ale pod wpływem głodu tyminowego lub nakładanie się dwóch efektów, głodu tyminowego i włączenia BU. Na możliwość tę wskazuje fakt, że maksymalny przyrost mutantów następował w obecności BU po 30 min inkubacji, podczas gdy czas jednego podziału komórek wynosił około

90 min. Do indukcji mutacji przez BU wymagane są dwa cykle replikacji (218).

W naszych badaniach nad efektem mutacji w genach *recA* i *lex* na mutagenезę indukowaną przez BU w szczepie *E. coli* K12 nie wymagającym tyminy obserwowaliśmy, że mutant *recA*⁻ wykazuje nie zmieniony w porównaniu z *recA*⁺ poziom mutagenезy indukowanej przez BU. Mutant *lex*⁻ natomiast nie ulegał mutacji nawet w obecności fluorodezoksyurydyny, dodanej w celu zwiększenia włączania BU do DNA (dane nie publikowane).

Jest dość prawdopodobne, że uszkodzenia spowodowane włączaniem BU do DNA mogą indukować system reperacji SOS. Pośrednim dowodem może być fakt, że BU powoduje szereg zjawisk indukowanych również przez napromieniowanie UV, które wiąże się z indukcją systemu reperacji SOS. BU podobnie jak UV powoduje indukcję profaga (201) i utajonych wirusów zwierzęcych (219), powstawanie form długich komórek bakterii (filamentacja), a ponadto podwyższa częstotliwość rekombinacji (96, 97, 220). Obserwowano, że dłuższa inkubacja w obecności BU powoduje indukcję białka X (221). Charakter uszkodzeń w DNA indukowanych przez BU nie jest znany. Obserwowano wprowadzenie pęknięcia jednego pasma w DNA *E. coli* zawierającym BU (216), jednakże mogą one stanowić efekt wtórny wirowania w alkalicznym gradiencie sacharozy, bądź mogły powstać w wyniku działania endonukleazy reperacyjnej. Uszkodzenia pierwotne, stanowić mogą obecnie jedynie domenę spekulacji. Dość prawdopodobne wydaje się przypuszczenie, że BU w DNA może ulegać dehalogenacji enzymatycznej lub spontanicznej, która może być stymulowana przez grupy SH. Dehalogenacja 5-bromodezoksyurydyny (222) i 5-jododezoksyurydyny (223) zachodzi z łatwością w obecności cysteaminy, z utworzeniem uracylu i produktu addycji w pozycji 5 pierścienia uracylu.

Jeszcze jedną z możliwych przyczyn uszkodzenia DNA przez BU mogą być zaburzenia w drugorzędowej strukturze, na skutek różnicy w zdolności oddziaływania BU z sąsiednimi zasadami w spirali DNA (*stacking*) (224).

5-etylouracyl. Innym analogiem tyminy jest 5-etylouracyl, który może być inkorporowany do DNA bakterii (225) i fagów z dużą wydajnością (226, 227). Analog ten jest interesujący z kilku powodów. Jego obecność w DNA obniża stabilność struktury drugorzędowej DNA (227), ale nie wywołuje efektu mutagennego ani letalnego. Obserwowano, że 5-etylouracyl nie indukuje mutacji w fagu T5 (wyniki nie publikowane), ani nie wpływa na jego infekcyjność. Świadczy to, że rodzaj podstawnika w pozycji 5 tyminy chociaż ma decydujące znaczenie dla stabilności struktury drugorzędowej DNA, nie jest tak istotny w procesach wiodących do mutagenезy. Potwierdza to w pewnym stopniu przypuszczenie, że w przypadku 5-bromouracylu efekt mutageny tłumaczony jest nie tylko jako wynik obecności bromu w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego (patrz wyżej). Brak właściwości mutagennych 5-etylouracylu nabiera szczególnego znaczenia wobec faktu,

że jest on inhibitorem niektórych wirusów zwierzęcych, może zatem znaleźć zastosowanie jako bezpieczny środek leczniczy w infekcjach wirusowych.

Aminopuryny 2-Aminopuryny i 2,6-dwuaminopuryna są analogami adeniny, a ich inkorporacja do DNA fagów, bakterii i drożdży powoduje mutacje typu tranzycji (228, 229). Aminopuryny są uważane za bardzo silne mutageny, ponieważ mimo niskiej wydajności inkorporacji do DNA, wykazują znaczny efekt mutagenny (230). Mechanizm mutagenezy indukowanej przez aminopuryny, podobnie jak indukowanej przez 5-bromouracyl, wyjaśniano zgodnie z hipotezą błędu parowania. Uważano, że aminopuryny występują w dwóch formach, aminowej i iminowej, dzięki czemu mogą tworzyć pary z tyminą lub cytozyną (1). Późniejsze badania wykazały jednak, że 2-aminopuryna tworzy komplementarne pary tak samo jak adenina. Obserwowano bowiem, że w układzie polimerazy DNA lub polimerazy RNA, trójfosforany nukleozydów 2-aminopuryny zastępują trójfosforany nukleozydów adeniny, nie zastępują natomiast trójfosforanów nukleozydów guaniny (231). Ponadto wykazano, że kwas poli-2-aminopurynowy tworzy kompleks tylko z poli-U (189).

W badaniach nad mechanizmem mutagenezy indukowanej przez aminopuryny wiele uwagi poświęcono roli 3'→5'-egzonukleazy w tym procesie (72, 74, 232). Zaobserwowano bowiem, że mutacje w genie polimerazy DNA faga T4, nadające jej cechy antymutatorowe (zmniejszające frekwencję mutacji spontanicznych), znacznie obniżają mutagenezę indukowaną przez analogi zasad (73). Następnie wykazano, że właściwości mutatorowe lub antymutatorowe zależą od stosunku aktywności egzonukleazy w polimerazie DNA do jej aktywności polimeryzującej (72, 74, 232). Uznano więc, że o wydajności mutagenezy indukowanej przez analogi zasad decyduje aktywność 3'→5'-egzonukleazy polimerazy DNA, która kontroluje wierność włączania nukleotydu podczas replikacji DNA. Nowsze badania wskazują na nieco inny mechanizm antymutatorowego działania. Okazało się bowiem, że mutant faga T4 tsCB120, dający bardzo niską frekwencję mutacji indukowanych przez 2-aminopurynę (73), ma normalny poziom 3'→5'-egzonukleazy, wykazuje natomiast zwolnione tempo replikacji (233). Obserwowany efekt antymutatorowy jest zatem prawdopodobnie związany z reperacją przez wycinanie, ponieważ obniżenie tempa replikacji DNA może sprzyjać wycinaniu uszkodzeń DNA spowodowanych obecnością 2-aminopuryny. Potwierdza to obserwacja, że przeniesienie do ubogiego podłoża komórek *E. coli* CR-34 uprzednio inkubowanych przez 60 min w obecności 2-aminopuryny powoduje bardzo szybki spadek frekwencji mutacji. Inkubacja w ubogim podłożu sprzyja reperacji przez wycinanie, a włączenie 2-aminopuryny do DNA powoduje prawdopodobnie uszkodzenia rozpoznawane przez mechanizmy reperacji. Świadczy o tym obserwacja, że komórki *E. coli* hodowane w obecności analogu wykazują przejściowe, trwające 30–60 min, zahamowanie wzrostu. Wielkość tego zahamo-

wania zależy od zdolności szczepu do reparacji uszkodzeń DNA (wyniki nie publikowane). Mechanizm mutagenyzy indukowanej przez 2-aminopurynę wymaga dalszych badań.

X. Uwagi końcowe.

Mimo intensywnych badań prowadzonych w ostatnich latach mechanizm indukowanej mutagenyzy nie jest w pełni wyjaśniony. Dotyczy to zarówno znajomości uszkodzeń przedmutacyjnych jak i samego procesu powstawania mutacji w komórce. W chwili obecnej nie ulega wątpliwości, że mutagenyza indukowana, a prawdopodobnie także spontaniczna wiąże się ściśle zarówno z procesem replikacji jak i reparacji DNA. W przypadku mutagenów, inkorporowanych do DNA jak np. analogi zasad, pewną rolę odgrywać może 3'→5'-egzonukleaza występująca razem z polimerazami DNA, kontrolująca wierność włączania nukleotydów podczas replikacji. Może ona wpływać na stopień inkorporacji analogów lub niewłaściwych zasad, jednakże w samym procesie powstawania mutacji istotny jest prawdopodobnie także udział procesów reparacji. Proces reparacji przez wycinanie ogranicza liczbę uszkodzeń przedmutacyjnych, usuwając znaczną ich część na drodze bezbłędnej reparacji. Pozostałe są reperowane przez system reparacji SOS, skłonny do błędów (*error prone*), stając się przyczyną mutacji. Udział procesów reparacyjnych w mutagenyzie dotyczy zarówno mutagenyzy indukowanej przez promieniowanie jak i przez wiele mutagenów chemicznych. Klasyczna hipoteza błędnego parowania jako wyłącznej i bezpośredniej przyczyny mutacji nie znajduje zatem pełnego potwierdzenia. W chwili obecnej utrzymuje się jeszcze przekonanie, że mutacje mogą powstawać na drodze pośredniej z udziałem procesów reparacyjnych, oraz bezpośrednio jako wynik błędu parowania. Bezpośrednia droga mutacji dotyczy mutagenyzy indukowanej przez analogi zasad i niektóre czynniki chemiczne, dla których nie wykazano zależności mutagenyzy od funkcji genów *recA* i *lex*. Jednakże wobec wykazania, że inkorporacja 5-bromouracylu do DNA bakterii powoduje uszkodzenia letalne i przedmutacyjne, usuwane na drodze reparacji przez wycinanie, wydaje się, że mutagenyza indukowana przez analogi zachodzi również z udziałem procesów reparacji.

Spośród procesów reparacji DNA najlepiej poznana jest reparacja przez wycinanie. Znanych jest wiele enzymów biorących udział w poszczególnych etapach tej reparacji. Ostatnio wykazano istnienie nowych enzymów rozpoznających uszkodzenia w DNA, a mianowicie N-glikozydazy uracylowej i adeninowej oraz wyodrębniono szereg endonukleaz nacinających. Odkrycie N-glikozydaz usuwających zmodyfikowane zasady z DNA pozwala na przypuszczenie, że mimo iż różne czynniki prowadzą do różnych pierwotnych zmian zasad, wynikające z nich uszkodzenia DNA przedmutacyjne

lub letalne mogą być podobne. To tłumaczyłoby fakt, że różne czynniki powodują ten sam rodzaj mutacji.

Jeśli chodzi o reperację postreplikacyjną, atrakcyjna wydaje się hipoteza reperacji SOS. Zakłada ona, że replikacja uszkodzonego DNA jest zatrzymana w miejscu uszkodzenia, a wznowienie jej wymaga indukcji nowej polimerazy DNA, lub czynnika modyfikującego normalną (konstytutywną) polimerazę w sposób umożliwiający jej replikację uszkodzonego DNA. Taka polimeraza replikowałaby DNA z mniejszą dokładnością, powodując mutację.

Podstawę przedstawionych tu poglądów i hipotez stanowią wyniki badań nad fagami, bakteriami oraz ich mutantami o różnej zdolności do reperacji DNA. Odnośnie organizmów wyższych, prowadzone są obecnie intensywne badania nad reperacją u drożdży, a także w komórkach ssaków. Mimo pewnych różnic w stosunku do prokariotów ogólne zasady procesów reperacji są bardzo podobne. W szeregu komórek ssaków stwierdzono reperację przez wycinanie oraz reperację postreplikacyjną. Reperowane są uszkodzenia indukowane zarówno fotochemicznie jak i przez mutageny i czynniki rakotwórcze. Wirusy zwierzęce wykazują reperację podobną do reperacji fagów łagodnych (jak np. fag lambda) to jest z udziałem enzymów komórki gospodarza. Fibroblasty ludzkie pochodzące z osobników chorych na *Xeroderma pigmentosum* (dziedziczna choroba związana z nadwrażliwością na promieniowanie i zwiększoną zapadalnością na raka skóry) są niezdolne do reperacji przez wycinanie i uważa się je za odpowiedniki mutantów bakteryjnych *uvr⁻*. Inna odmiana schorzenia *Xeroderma pigmentosum* charakteryzuje się brakiem reperacji postreplikacyjnej.

Badania nad procesami reperacji budzą ogromne zainteresowanie ze względu na duże prawdopodobieństwo ich udziału w powstawaniu nowotworów i w indukcji wirusów utajonych. Istnieje sporo danych wskazujących na związek między mutagenezą a karcinogenezą. Obecnie zwraca się także uwagę na możliwy związek między procesem starzenia się organizmów, a ich wydajnością reperacji DNA.

Artykuł nadszedł 25.4.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 25.6.1977

PIŚMIENNICTWO

1. Drake J. W. (1970), *The molecular basis of mutation*, Holden-Day, San Francisco.
2. Witkin E. M., (1969), *Ann. Rev. Microbiol.* 23, 487—517.
3. McLaren A. D., Shugar D., (1964), *Photochemistry of Proteins and Nucleic Acids*, Macmillan Co. New York.
4. Setlow J. K., (1967) *Comprehensive Biochemistry*, red. Florin M., Stotz E. M., t. 27, str. 157—209, Elsevier, Amsterdam.
5. Varghese A. J., (1972), *Photophysiology*, red. Giese A. C., t. 7, str. 207—274, Academic Press, New York.

6. Patrick M. H., Rahn R. O., (1976) Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids red. Wang S. Y., Patrick M. H. t. 2, str. 35—95. Academic Press, New York.
7. Wierzchowski K. L., (1967), *Post. Biochem.*, **13**, 127—170.
8. Varghese A. J., Patrick M. H., (1969), *Nature*, **223**, 229—300.
9. Donnellan J. E. Jr., Setlow R. B., (1965), *Science*, **149**, 308—310.
10. Bacchetti S., Bene R., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **390**, 285—297.
11. Brent Th. P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 172—183.
12. Carrier W. L., Setlow R. B., (1974), *Rad. Res.*, **59**, 97.
13. Lindahl T., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3649—3653.
14. Lindahl T., (1976), *Nature*, **259**, 64—66.
15. Sekiguchi M., Hayakawa H., Makino F., Tanaka K., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 293—299.
16. Rupert C. S., (1964), *Photophysiology*, **2**, 283—327.
17. Setlow J. K., (1966), *Curr. Top. Radiat. Res.*, **2**, 195—248.
18. Cooock J. S., (1970), *Photophysiology*, **5**, 191—233.
19. Rupert C. S., (1975), Molecular Mechanism for Repair of DNA red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 73—87, Plenum Press, New York, London.
20. Smith K. C., Youngs D. A., Van der Schueren E., (1975), Molecular Mechanism for Repair of DNA red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., 5a, str. 443—452. Plenum Press, New York London.
21. Grossman L., Braun A., Feldberg R., Mahler I., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 19—43.
22. Howard-Flanders P., (1968), *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 175—200.
23. Masker W. E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **442**, 162—173.
24. Howard-Flanders P., (1973), *British Med. Bull.*, **29**, 226—235.
25. Heijneker H. L., (1975), *Nucleic Acid Res.*, **2**, 2147—2161.
26. Heijneker H. L., Pannekoek H., Oosterbaan R. A., Pouvels P. H., Bron S., Arwert F., Venema G., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2967—2971.
27. Hamilton L., Mahler I., Grossman L., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1886—1896.
28. Pietrzykowska I., Shugar D., (1977) The repair of damaged DNA, *Comprehensive Biochemistry*, red. Florkin M., Stotz E. M. t. 24, str. 55—103.
29. Dunlap B., Cerutti P., (1975), *FEBS Letters*, **51**, 188—190.
30. Verly W. G., (1975), *Biomedicine*, **22**, 342—347.
31. Friedberg E. C., Goldthwait D. A., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 934—940.
32. Kirtikar D. M., Catheart G. R., Goldthwait D. A., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 4324—4328.
33. Braun A., Grossman L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1838—1842.
34. Friedberg E. C., (1975), *Photochem. Photobiol.*, **21**, 177—289.
35. Tanaka K., Bekguchi M., Okada J., (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4071—4075.
36. Kirtikar D. M., Goldthwait D. A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2022—2026.
37. Verly W. G., Paquette J., Thibodeau L., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 67—69.
38. Friedberg E. C., Hadi S. M., Goldthwait D. A., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5879—5889.
39. Paquette G., Crine P., Verly W. G., (1972), *Can. J. Biochem.*, **50**, 1199—1209.
40. Ljungquist S., Lindahl T., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1530—1540.

41. Hariharan P. V., Cerutti P. A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3532—3536.
42. Setlow R. B., Carrier W. L., (1973), *Nature, New Biology*, **241**, 170—172.
43. Hariharan P. V., Remsen J. F., Cerrutti P. A., *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 51—59.
44. Duker N. J., Teebor G. W., (1975), *Nature*, **255**, 82—84.
45. Lindahl T., Nyberg B., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3610—3618.
46. Lindahl T., Karlstrom O., (1973), *Biochemistry*, **12**, 5151—5154.
47. Lindahl T., Nyberg B., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3405—3409.
48. Baltz R. H., Bingham P. M., Drake J. W., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1269—1273.
49. Schuster H., Schramm G., (1958), *Z. Naturforsch.*, **13b**, 697—704.
50. Shapiro R., Braverman B., Louis J. B., Servir E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4060—4065.
- 50a. Johns H. E., LaBlanc J. C., Freeman K. B., (1965), *J. Mol. Biol.*, **13**, 849—861.
51. Friedberg E. C., Ganesan A. K., Minton K., (1975), *J. Virol.* **16**, 315—321.
52. Tomita F., Takahashi I., (1975), *J. Virol.* **15**, 1073—1087.
53. Van Lancer J. L., Tomuta T., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **353**, 99—114.
54. Kirtikar D. M., Dipple A., Goldthwait D. A., (1975), *Biochemistry*, **14**, 5548—5553.
55. Weiss B., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 1896—1901.
56. Yajko D. M., Weiss B., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 688—692.
57. Burtlag A. G., Kornberg A., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 241—248.
58. Kelly R. B., Atkinson M., Huberman J., Kornberg A., (1969), *Nature*, **244**, 495—501.
59. Livingstone D. M., Richardson C. C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 470—478.
60. Hanawalt P. C., (1974) *Genetics*, **79**, 179—197.
61. Smith D. W., Tait R. C., Harris A. L., (1975), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5b, str. 473—481, Plenum Press, New York, London.
62. Monk M., Kirnos J., (1972), *J. Bacteriol.* **109**, 971—978.
63. Youngs D. A., Smith K. C., (1973), *J. Bacteriol.* **114**, 121—127.
64. Pawl G., Slor H., Friedberg E. C., (1975), *J. Bacteriol.* **122**, 341—344.
65. Regan J. D., Setlow R. B., (1973), *Chemical Mutagens*, red. Hollaender A., t. 3, str. 151—170, Plenum Press, New York, London.
66. Glickman B. W., (1975), *Molecular Mechanism for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 213—218, Plenum Press, New York, London.
67. Kaplan J. C., Kushner S. R., Grossman L., (1971), *Biochemistry*, **10**, 3315—3324.
68. Chase J., Richardson C. C., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 4553—4561.
69. Chase J. W., Richardson C. C., (1975), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 225—234, Plenum Press, New York, London.
70. Tanaka J-I., Sekiguchi M., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 178—187.
71. Wickner R. B., Ginsberg B., Berkover I., Hurtwitz J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 489—497.

72. Muzyczka N., Polland R. L., Bessman M. J., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7116—7122.
73. Drake J. W., Greening E. A., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 823—829.
74. Bessman M. J., Muzyczka N., Goodman M., Schnaar R. L., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 409—421.
75. Modrich P., Lehman I. R., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 3626—3631.
76. Campbell D., Rowe L. B., (1972), *Mutat. Res.*, **15**, 361—369.
77. Pauling C., Beck L. A., Wilczyński Sh. P., (1976), *J. Gen. Microbiol.*, **94**, 297—304.
78. Howard-Flanders P., (1975), *Molecular Mechanism for repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B. t. 5a, str. 265—274, Plenum Press, New York, London.
79. Cole R. S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1064—1068.
80. Howard-Flanders P., Lin P. F., (1973), *Genetics*, **73**, suppl. 85—90.
81. Rupp W. D., Howard-Flanders P., (1968), *J. Mol. Biol.*, **31**, 291—304.
82. Smith K. C., Meun D. H. C., (1971), *J. Mol. Biol.*, **51**, 459—472, Plenum Press, New York, London.
83. Iyer V. N., Rupp W. D., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 117—126.
84. Rupp W. D., Wilde C. E., Reno D. L., Howard-Flanders P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 25—44.
85. Rothman R. H., Kato T., Clark A. J., (1975), *Molecular Mechanism for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 283—291, Plenum Press New York, London.
86. Horii Z. I., Clark A. J., (1973), *J. Mol. Biol.*, **80**, 327—344.
87. Ganesan A. K., Seawell P. C., (1975), *Mol. Gen. Genet.*, **141**, 189—205.
88. Goldmark P. J., Linn S., (1972), *J. Biol. Chem.* **247**, 1849—1860.
89. Rupp W. D., Levine A. D., Trgovcevic Z., (1975), *Molecular Mechanisms for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 307—312, Plenum Press, New York, London.
90. Ganesan A. K., (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 103—119.
91. Luria S., (1947), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **33**, 253—264.
92. Jacob F., Wollman E. L., (1953), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **18**, 195—205.
93. George J., Devoret R., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 103—119.
94. Doermann A. H., (1961), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **58**, suppl. 1, 79—93.
95. Jacob F., Wollman E. L., (1955), *Ann. Inst. Pasteur*, **88**, 724—749.
96. Folsome E., (1960), *Genetics*, **45**, 1111—1112.
97. Pietrzykowska I., (1973), *Mutat. Res.*, **19**, 1—9.
98. Putrament A., Baranowska H., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 89—93.
99. Snow R., Korch C. T., (1970), *Mol. Gen. Genet.*, **107**, 201—208.
100. Davies P. J., Evans W. E., Parry J. M., (1976), *Mutat. Res.*, **29**, 301—314.
101. Kato T., (1973), *Exp. Cell. Res.*, **82**, 383—390.
102. Wolff S., Bodycate J., Painter R. B., (1974), *Mutat. Res.*, **25**, 73—81.
103. Yamamoto N., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 263—269.
104. Kato H., Shimada H., (1975), *Mutat. Res.*, **28**, 459—464.
105. Lambert B., Hanson K., Lindsten J., Sten M., (1976), *Hereditas*, **83**, 163—164.
106. Allen J. W., Latt S. A., (1976), *Chromosoma*, **58**, 325—340.
107. Howard Flanders P., Lin P. F., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **146**, 107—115.
108. Cole E. S., Levitan D., Sinden R. R., (1976), *J. Mol. Biol.*, **103**, 39—59.

109. Ley R. D., (1973), *Photochem. Photobiol.*, **18**, 87—95.
110. Bridges B. A., Sedgwick S. G., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 1077—1081.
111. Radman M., (1975), *Molecular Mechanism for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 355—367, Plenum Press, New York, London.
112. Witkin E. M., (1975), *Genetics*, **79**, 199—213.
113. Witkin E. M., (1975), *Molecular Mechanism for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 369—378, Plenum Press, New York, London.
114. Witkin E. M., (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 869—907.
115. Setlow R. B., Swenson P. A., Carrier W. L., (1963), *Science*, **142**, 1464—1466.
116. Doudney C. O., (1973), *Mutat. Res.*, **17**, 1—12.
117. Witkin E. M., (1975), *Mol. Gen. Genet.*, **142**, 87—103.
118. Defais M. P., Caillet-Fajquet P., Fox M. S., Radman M., (1976) *Mol. Gen. Genet.*, **148**, 125—130.
119. Hewitt R., Gaskins P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **62**, 215—221.
120. Bridges B. A., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 52—53.
121. Billen D., (1969), *J. Bacteriol.*, **97**, 1169—1175.
122. Doudney C. O., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 389—396.
123. Meyn R. E., Hewitt R. R., Thomson L. F., Humphrey R. M., (1976), *Biophys. J.*, **16**, 517—525.
124. Radman M., Caillet-Fauquet P., Defais M., Villani G., (1975), *Screening test in chemical carcinogenesis*, red. Montesano R., Bartsch H., Tomatis L., IARC Scientific Publications, No. 12, Lyon, 1976.
125. Fujiwara Y., (1972), *Exp. Cell. Res.*, **75**, 483—489.
126. Meyn R. E., Humphrey R. M., (1971), *Biophys. J.*, **11**, 295—301.
127. Lehmann A. R., Kirk-Bell S., (1972) *Europ. J. Biochem.*, **31**, 438—445.
128. Witkin E. M., (1967), *Brookhaven Symp. Biol.*, **20**, 17—55.
129. Bridges B. A., Law J., Munson R. J., (1968), *Mol. Gen. Genet.*, **103**, 266—273.
130. Mount D. W., Low K. B., Edmiston S. J., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 886—893.
131. Youngs D. A., Smith K. C., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 173—182.
132. Weigle J. J., (1953), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **39**, 628—636.
133. Defais M., Fauquet P., Radman M., Errera M., (1971), *Virology*, **43**, 495—503, Plenum Press, New York, London.
134. Devoret R., Blanco M., George J., Radman M., (1975), *Molecular Mechanism for Repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 155—171, Plenum Press, New York, London.
135. Bleichrodt J. F., Verheij W. S. D., (1974), *Mol. Gen. Genet.* **135**, 19—27.
136. Benbov R., Zccarelli A., Sinsheimer R. L., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 629—651.
137. Ichikawa-Ryo H., Kondo S., (1975), *J. Mol. Biol.*, **97**, 77—92.
138. Sesnowitz-Horn S., Adelberg E. A., (1968), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 394—402.
139. Greenberg J., Green M. H. L., Bar-Nun N., (1970), *Mol. Gen. Genet.*, **107**, 209—214.
140. George J., Devoret R., Radman M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 144—147.
141. Witkin E. M., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1930—1934.
142. Bridges B. A., Mottershead R. P., Sedgwick S. G., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **144**, 53—58.
143. Sedgwick S. G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2753—2757.

144. Sedgwick S. G., (1976), *Mutat. Res.*, **41**, 185—200.
145. Igali S., Bridges B. A., Ashweed-Smith M. J., Scott B. R., (1970), *Mutat. Res.*, **9**, 21—30.
146. Tarmy E. M., Venitt S., Brookes P., (1973), *Mutat. Res.*, **19**, 153—166.
147. Ishii Y., Kondo S., (1975), *Mutat. Res.*, **27**, 27—44.
148. Goze A., Sarasin A., Moule Y., Devoret R., (1975), *Mutat. Res.*, **28**, 1—7.
149. Hince T. A., Neale S., (1977), *Mutat. Res.*, **46**, 1—10.
150. Morse L., Pauling C. C., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4645—4649.
151. Morse L. S., Beck L. A., Pauling C., (1976), *Mol. Gen. Genet.*, **147**, 79—82.
152. Castellazzi M., George J., Buttin G., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 139—152.
153. George J., Castellazzi M., Buttin G., (1975), *Mol. Gen. Genet.*, **140**, 309—332.
154. Castellazzi M., George J., Buttin G., (1972), *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 153—174.
155. Kirby E. P., Jacob F., Goldthwait D. A., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 1903—1910.
156. Beukers R., Berends W., (1960), *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 550—551.
157. Rahn R. O., (1973), *Photophysiology*, **8**, 231—255.
158. Wierzchowski K. L., Shugar D., (1962), *Photochem. Photobiol.*, **1**, 21—36.
159. Smith K. C., O'Leary M. E., (1967), *Science*, **155**, 1024—1026.
160. Ashwood-Smith M. J., Bridges B. A., Munson R. J., (1965), *Science*, **149**, 1103—1105.
161. Ashwood-Smith M. J., Bridges B. A., (1966), *Mutat. Res.*, **3**, 135—144.
162. Witkin E. M., Sicurella N. A., Bennett O. M., (1963), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **50**, 1055—1062.
163. Doubleday O. P., Bridges B. A., Green M. H. L., (1975), *Mol. Gen. Genet.*, **140**, 221—230.
164. Nishioka H., Doudney C. O., (1973), *Mutat. Res.*, **9**, 349—358.
165. Doudney C. O., (1974), *J. Bacteriol.*, **120**, 394—398.
166. Neistrich M. L., Drake J. W., (1972), *J. Mol. Biol.*, **66**, 107—114.
167. Howard B. D., Tessman I., (1964), *J. Mol. Biol.*, **9**, 372—375.
168. Okazaki R., Arisuwu M., Sugino A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2954—2957.
169. Janion C., Shugar D., (1967), *Acta Biochim. Polon.*, **14**, 273—302.
170. Smith K. C., Patrick M., Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids, red. Wang S. Y., t. 2., Academic Press, New York, London.
171. Wilkins R. J., Macleod D. H., (1976), *Mutat. Res.*, **36**, 11—16.
172. Budowsky E. I., (1976), The mechanism of mutagenic action of hydroxylamine. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* t. 16, 125—188.
173. Turchinsky M. F., Kusowa K. S., Budowsky E. I., (1974), *FEBS Letters*, **38**, 304—308.
174. Kubiński H., (1974), *Radiat. Res.*, **59**, 77—78.
175. Hawkins R. B., (1976), *Radiat. Res.*, **68**, 300—307.
176. Fornace A. J. Jr., Kohn W., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **435**, 95—103.
177. Haak R. A., Bockrath R. C., (1975), *Radiat. Res.*, **61**, 164—171.
178. Sideropoulos A. S., Greenberg J., (1975), *J. Bacteriol.* **123**, 1068—1075.
179. George D. L., Witkin E. M., (1975), *Mutat. Res.*, **28**, 347—354.
180. Tomilin N. V., Mosevitskaya T. V., (1975), *Mutat. Res.*, **27**, 147—156.

181. Witkin E. M., George D. L., (1973), *Genetics*, 73 suppl. 91—108.
182. Williams P. H., Clarke C. H., (1974), *Mutat. Res.*, 22, 255—264.
183. Pietrzykowska I., (1974), *Radiat. Res.*, 59, 261.
184. Pietrzykowska I., Krych M., (1976), *Studia Biophys.*, 61, 17—22.
185. Kimball R. F., Hirsch B. F., (1976), *Mutat. Res.*, 36, 39—48.
186. Topal M. D., Fresco J. R., (1976), *Nature*, 263, 285—289.
187. Tesman I., (1974), w *Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis*, red. Prakash L., Sherman F., Miller M. W., Lawrence C. W., Taber H. W., str. 92—101.
188. Drake J. W., Baltz R. H., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 11—37.
189. Janion C., Shugar D., (1973), *Acta Biochim. Polon.*, 20, 271—284.
190. Brimacombe R. L. C., (1966), *J. Mol. Biol.*, 18, 529—540.
191. Mehta J. R., Ludlum D. B., (1976), *Biochemistry*, 15, 4329—4333.
192. Shugar D., Huber C. P., Birnbaum G. I., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, (w druku).
193. Volkert M. R., George D. L., Witkin E. M., (1976), *Mutat. Res.*, 36, 17—28.
194. Marsden H. S., Pollard E. C., Ginoza W., Randal E. P., (1974), *J. Bacteriol.*, 118, 465—470.
195. Pollard E. C., Achey P. M., (1975), *Biophys. J.*, 15, 199a.
196. Smith K. C., Martignoni K. D., (1976), *Photochem. Photobiol.*, 24, 515—523.
197. Gudas L. J., Pardee A. B., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 2330—2334.
198. Prakash L., (1976), *Mutat. Res.*, 41, 241—248.
199. Greenberg J., Berends L., Donch J., Green M. H. R., (1974), *Genet. Res.*, 23, 175—184.
200. Blanco M., Levine A., Devoret R., (1975), w *Molecular Mechanism for repair of DNA*, red. Hanawalt P. C., Setlow R. B., t. 5a, str. 379—382, Plenum Press, New York, London.
201. Price K. E., Buck R. E., Lein J., (1964), *Antimicrob. Ag. Chemoterap.*, 4, 505—517.
202. Heineman B., (1971), *Appl. Microbiol.*, 21, 726—731.
203. Fogel M., (1972), *Virology*, 49, 12—18.
204. Ichikawa-Ryo H., Kondo S., (1973), *Genetics*, 74 suppl. 122.
205. Kerr T. L., Hart M. G. R., (1972), *Mutat. Res.*, 15, 247—258.
206. Sarasin A., Goze A. D., Devoret R., Moule G., (1977), *Mutat. Res.*, 42, 205—214.
207. Singer B., (1975), w *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, t. 15, str. 219—332, ded. Davidson J. N., Cohn W. E., Acad. Press, New York, London.
208. Kimball R. F., (1977), *Mutat. Res.*, 39, 111—126.
209. Zimmermann F. K., (1977), *Mutat. Res.*, 39, 127—148.
210. Shapiro R., (1977), *Mutat. Res.*, 39, 149—176.
211. Singer B., (1976), *Nature*, 264, 333—339.
212. Shugar D., Pietrzykowska I., Kulikowski T., (1977), w 6th Oxford International Symposium on "Genetic Expression", Oxford, Sept. 1976 (w druku).
213. Hutchinson F., (1973), *Quarterly Rev. Biophys.*, 6, 201—246.
214. Bishop R. J., Sueoka N., (1972), *J. Bacteriol.*, 112, 870—876.
215. Cullen R. R., Bick M. D., (1976), *Nucleic Acids Res.*, 3, 49—55.
216. Pietrzykowska I., Lewandowska K., Shugar D., (1975), *Mutat. Res.*, 30, 21—32.

217. Witkin E. M., Parisi E. C., (1974), *Mutat. Res.*, **25**, 407—409.
218. Rudner R., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **3**, 275—280.
219. Rowe W. P., Lowy D. R., Teich N., Hartley J. W., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1033—1039.
220. Allen J. W., Latt S. A., (1976), *Chromosoma*, **58**, 325—340.
221. Little J. W., Hanawalt P. C., (1977), *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 237—248.
222. Watay Y., Negishi K., Hayatsu H., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3992—3998.
223. Gilbert E., (1973), *Z. Naturforsch.*, **28b**, 805—809.
224. Sternglanz H., Bugg C. E., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 1—11.
225. Piechowska M., Shugar D., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 768—774.
226. Pietrzykowska I., Shugar D., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 567—572.
227. Pietrzykowska U., Shugar D., (1967), *Acta Biochim. Polon.*, **14**, 169—181.
228. Koch R. E., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 773—76.
229. Sora S., Panzeri L., Magni G. E., (1973), *Mutat. Res.*, **20**, 207—213.
230. Gottschiling H., Freese E., (1961), *Z. Naturforsch.*, **16**, 515—519.
231. Rogan E. G., Bessman, M. J., (1970), *J. Bacteriol.*, **103**, 622—649.
232. Lo, K - J., Bessman M. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2475—2486.
233. Gillin F. D., Nossal N. G., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5219—5224.

ALICJA K. DRABIKOWSKA *)

Oddychanie niewrażliwe na cyjanek

Cyanide-Insensitive Respiration

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Inhibitory oksydazy niewrażliwej na cyjanek i mechanizm ich działania
- III. Indukcja i regulacja oksydazy niewrażliwej na cyjanek
- IV. Układ oksydazy niewrażliwej na cyjanek
- V. Kontrola oddychania niewrażliwego na cyjanek
- VI. Utlenianie niewrażliwe na cyjanek a oksydacyjna fosforylacja
- VII. Rozgałęzienie łańcucha oddechowego
- VIII. Fizjologiczne znaczenie oddychania niewrażliwego na cyjanek

Contents

- I. Introduction
- II. Inhibitors of the cyanide-insensitive respiration and mechanism of their action
- III. Induction and regulation of the cyanide-insensitive oxidase
- IV. Cyanide-insensitive oxidase system
- V. Control of the cyanide-insensitive respiration
- VI. Cyanide-insensitive respiration, and oxidative phosphorylation
- VII. Bifurcation of the respiratory chain
- VIII. Physiological significance of the cyanide-insensitive respiration

I. Wstęp

Od dawna wiadomo, że niektóre tkanki roślin wyższych oddychają mimo obecności cyjanku (1, 2). Stopień wrażliwości na cyjanek jest zmienny i często zależy od stadium rozwojowego organizmu. Niewrażliwość na cyjanek jest cechą charakterystyczną niektórych roślin (3), podczas gdy u mi-

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

Wykaz stosowanych skrótów: DBMIB — dwubromotymochinon (2,5-dwubromo-3-metylo-6-izopropyllo-p-benzochinon); karboksyna — 5,6-dwuwdoro-2-metylo-1,4-oksatyno-3-karboksyanilid.

króroorganizmów może się ona pojawiać w wyniku mutacji lub zahamowania biosyntezy białek mitochondrialnych.

W świecie zwierzęcym oddychanie niewrażliwe na cyjanek spotyka się bardzo rzadko (4). W wielu przypadkach tolerancja w stosunku do cyjanku pojawia się tylko w ściśle określonych cyklach rozwojowych danego osobnika. W patogennych pierwotniakach, takich jak *Trypanosoma brucei* (5—7), *Trypanosoma mega* (8), *Trypanosoma rhodesiense* (5, 9) i innych oddychanie niewrażliwe na cyjanek pojawia się tylko w jednym określonym cyklu życiowym. Formy żyjące w krwioobiegu są niewrażliwe na cyjanek. Wynika to z braku wykształconych mitochondriów, enzymów cyklu Krebsa i cytochromów. Wówczas jedynym enzymem biorącym udział w oddychaniu jest pozamitochondrialna oksydaza L-glicero-3-fosforanu, której rola polega na utlenianiu NADH powstającego w procesie glikolizy (10, 10a). Przy przeniesieniu form żyjących w krwioobiegu na pożywki syntetyczne następują zmiany morfologiczne komórki, a wraz z nimi pojawiają się w komórce mitochondria, cytochromy i enzymy cyklu Krebsa.

Tolerancja w stosunku do cyjanku może wynikać ze zdolności włączania go w niskocząsteczkowe metabolity i nie ma związku z niewrażliwością oddychania na cyjanek. W większości przytoczonych przykładów niewrażliwe na cyjanek oddychanie stanowi zmienną część oddychania całkowitego. Oddychanie niewrażliwe na cyjanek nie jest hamowane ani przez azydek i tlenek węgla, inhibitory oksydazy cytochromowej, ani też przez antymycynę A i tlenek 2-heptylo-4-hydroksychinoliny, inhibitory działające w łańcuchu oddechowym pomiędzy cytochromem b i cytochromem c (11).

Dotychczas zaobserwowano jedynie dwa przypadki kiedy stopień hamowania oddychania przez cyjanek i antymycynę A jest różny. W mitochondriach wyizolowanych z *Candida utilis* antymycyna A hamuje oddychanie z egzogennym NADH tylko w 70% a cyjanek w 910% (12). W mitochondriach *Torulopsis utilis* antymycyna A powoduje nieznaczną stymulację oddychania z bursztynianem jako substratem. Oksydaza NADH i oksydaza bursztynianowa są hamowane prawie całkowicie przez cyjanek (13).

Obok badań nad mechanizmem oddychania niewrażliwego na cyjanek roślin wyższych rozpoczęto intensywne badania tego procesu u *Neurospora crassa*. Łatwość prowadzenia hodowli, stosunkowo prosty i szybki sposób izolowania mitochondriów oraz możliwość i łatwość otrzymywania różnych mutantów oddechowych zdecydowały o wyborze tego organizmu. Wśród licznych mutantów *Neurospora crassa* największe zainteresowanie wzbudził mutant mi-1, zwany poky, w mitochondriach którego wykazano brak pasm absorpcyjnych odpowiadających cytochromowi a i cytochromowi b (14). *Neurospora* może żyć tylko w warunkach aerobowych. Głównym źródłem energii w tych komórkach jest oksydacyjna fosforylacja. W przypadku mutantów z uszkodzonym łańcuchem oddechowym przeżywalność ich była intrygująca. Wiadomo było, że komórki mutantu mi-1 oddychają mimo braku

oksydazy cytochromowej i że oddychanie to jest niewrażliwe na cyjanek i azydek (15). Już wówczas przypuszczano, że w komórkach mutantu *Neurospora crassa* mi-1 występuje oksydaza niewrażliwa na cyjanek, której funkcja kompensuje niezwykle niską aktywność oksydazy cytochromowej.

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że u mutantu *Neurospora crassa* mi-1 żaden ze składników cytochromowych nie bierze udziału w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek (16—18). Nie udało się jednak wyizolować ani zidentyfikować oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Wiadomo natomiast, że indukuje się ona w komórce wtedy, kiedy synteza białek mitochondrialnych jest zahamowana przez chloramfenikol (16, 19—21).

W komórkach roślinnych i zwierzęcych oksydaza niewrażliwa na cyjanek występuje jedynie w mitochondriach (16, 22—28).

II. Inhibitory oksydazy niewrażliwej na cyjanek i mechanizm ich działania.

Nie wiadomo nic konkretnego na temat budowy cząsteczki oksydazy niewrażliwej na cyjanek i niewiele wiadomo o składnikach biorących udział w oddychaniu katalizowanym przez tę oksydazę. Znane są natomiast inhibitory tego oddychania. Są nimi związki kompleksujące żelazo, takie jak tiocyjanian i 8-hydroksychinolina. W nieco wyższym stężeniu, niż stężenie potrzebne do zahamowania oksydazy niewrażliwej na cyjanek, hamują one także oddychanie, w którym bierze udział oksydaza cytochromowa (29).

Specyficznymi inhibitorami oddychania niewrażliwego na cyjanek są aromatyczne kwasy hydroksamowe (30). Efektywność ich działania zależy w znacznym stopniu od rodzaju podstawnika w pierścieniu aromatycznym. Najsilniejszymi inhibitorami są kwasy hydroksamowe posiadające pierścień benzenowy podstawiony chlorowcem w pozycji meta. W niektórych mikroorganizmach pochodne kwasów hydroksamowych są naturalnymi kofaktorami biorącymi udział w transporcie żelaza z medium do komórki (31, 32). Działanie hamujące tych związków polega przypuszczalnie na wiązaniu żelaza niehemowego (33). Dotychczas nie udało się wykazać zależności pomiędzy ilością użytego kwasu hydroksamowego, potrzebną do zahamowania oddychania, a zawartością żelaza w preparatach mitochondrialnych. Wiadomo jednak, że u roślin i zwierząt poszczególnych gatunków różne stężenia inhibitora są potrzebne do całkowitego zahamowania oddychania, w którym bierze udział oksydaza niewrażliwa na cyjanek.

Mechanizm działania kwasów hydroksamowych z oksydazą niewrażliwą na cyjanek nie jest wyjaśniony. Grupa —CONHOH jest grupą funkcyjną, której obecność jest konieczna do wywołania efektu hamującego. W teoretycznych rozważaniach można brać pod uwagę możliwość działania produktu utlenienia grupy funkcyjnej inhibitora z oksydazą niewrażliwą

liwą na cyjanek. Takí mechanizm działania wydaje się jednak nieprawdopodobny, ponieważ w doświadczeniach prowadzonych z tym inhibitorem nie stwierdzono ani jego redukcji ani utlenienia. Pomíędzy kwasem hydroksamowym a oksydazą niewrażliwą na cyjanek nie wykryto żadnego trwałego połączenia. Zauważono natomiast, że kwas hydroksamowy można łatwo odmyć z preparatów mitochondrialnych i odzyskać w ten sposób pierwotną aktywność oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Najbardziej prawdopodobny wydaje się mechanizm hamowania polegający na wiązaniu się kwasu hydroksamowego z metalem wchodzącym w skład cząsteczki enzymu. Wśród takich kompleksów stosunkowo dobrze poznanymi są kompleksy z żelazem niehemowym (32). Przywrócenie całkowitej aktywności oksydazy niewrażliwej na cyjanek u *Candida lipolitica* (31) przez dodanie jonu żelaza trójwartościowego do medium sugeruje wiązanie się inhibitora z żelazem niehemowym. Można także przypuszczać, że wielofunkcyjne wiązania wodorowe grupy $-\text{CONHQH}$ biorą udział w łączeniu się inhibitora z enzymem. Wówczas można by także założyć, że wiązania te stabilizują jedną określoną geometrię kompleksu kwasu hydroksamowego z żelazem w aktywnym centrum oksydazy i uniemożliwiają zmiany konformacyjne oksydazy niewrażliwej na cyjanek konieczne do przeniesienia elektronów na tlen.

Innym inhibitorem oksydazy niewrażliwej na cyjanek, działającym podobnie jak 8-hydroksychinolina lub kwas hydroksamowy, jest karboksyna stosowana w rolnictwie jako środek przeciwgrzybiczy (34). Mechanizm jej działania był przedmiotem badań prowadzonych przez L y r a i wsp. (35—37). Według opinii tych autorów wiąże się ona z żelazosulfoproteidem, który jest integralną częścią dehydrogenazy bursztynianowej i w ten sposób hamuje transport elektronów z bursztynianu na tlen. W przypadku, kiedy żelazosulfoproteid pełni funkcję oksydazy, karboksyna hamuje także oddychanie niewrażliwe na cyjanek. Autorzy sugerują, że żelazosulfoproteid jest oksydazą niewrażliwą na cyjanek i że w tym miejscu następuje rozgałęzienie łańcucha oddechowego (37).

III. Indukcja i regulacja oksydazy niewrażliwej na cyjanek.

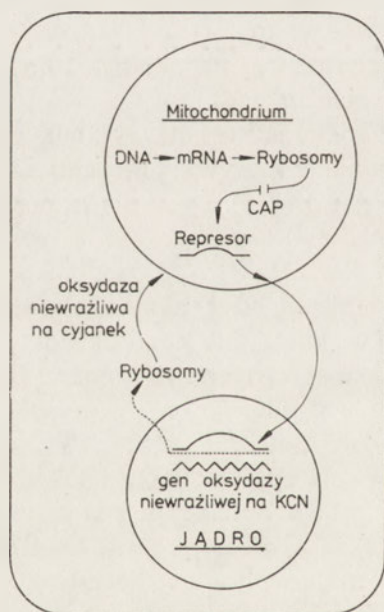
W młodych liściach *Daucus carota* oddychanie niewrażliwe na cyjanek stanowi około 25% całkowitego oddychania i wzrasta do około 55% w liściach dojrzałych roślin (38). Wzrostowi oddychania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek towarzyszy obniżenie aktywności oddychania z udziałem oksydazy cytochromowej. Podobne zjawiska wzrastającej niewrażliwości oddychania na cyjanek wraz ze starzeniem się komórek występują u drożdży z rodzaju *Rhodotorula* (39, 40). U *Candida lipolytica* wzrost oddychania niewrażliwego na cyjanek następuje przy przejściu hodowli z logarytmicznej do stacjonarnej fazy wzrostu (41). Niewrażliwość

oddychania na cyjanek w komórkach z gatunku *Saprolegnia* zwiększa się aż do 90% po 45 godzinach hodowli (42). W komórkach cytoplazmatycznego mutantu *Neurospora crassa* mi-1 niewrażliwość oddychania na cyjanek jest największa w młodych hodowlach i zmniejsza się dość znacznie w hodowlach starych (14, 15, 18). Na podstawie tych kilku przykładów można sądzić, że indukcja oksydazy niewrażliwej na cyjanek może być wywołana przez różne czynniki. Dokładniejszych danych dotyczących indukcji oksydazy niewrażliwej na cyjanek dostarczają nam badania procesów oddechowych w organizmach, które dość łatwo adaptują się do zmiennych warunków wzrostu. Do takich organizmów należy *Neurospora crassa*. Mitochondria dzikiego szczepu *Neurospora crassa* są bardzo podobne do mitochondriów roślin wyższych i nieznacznie różnią się tylko zawartością cytochromów od mitochondriów zwierzęcych (27). Hodowanie dzikiego szczepu w pożywkach zawierających antymycynę (43), chloramfenikol (21, 44, 45) lub nie zawierających miedzi (46) prowadzi do obniżenia zawartości cytochromu b, szczególnie cytochromu b_T i oksydazy cytochromowej, przy równoczesnym wzroście cytochromu c i ubichinonu (21) oraz indukcji oksydazy niewrażliwej na cyjanek. W miarę zwiększania stężenia chloramfenikolu w pożywce, w komórkach *Neurospora* wzrasta oddychanie z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek i zmniejsza się oddychanie z udziałem oksydazy cytochromowej.

Indukcja oksydazy niewrażliwej na cyjanek rozpoczyna się już po 30 min od momentu dodania do pożywki chloramfenikolu i wzrasta liniowo w ciągu następnych 2,5 godzin (19). Dodanie do pożywki 0,5 µg/ml cykloheksimidu powoduje całkowite zahamowanie biosyntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek w komórkach *Neurospora* hodowanych w obecności chloramfenikolu. Pojawienie się oddychania niewrażliwego na cyjanek następuje zatem, w wyniku syntezy *de novo* oksydazy niewrażliwej na cyjanek z udziałem cytoplazmatycznych rybosomów. Dodanie aktynomycyny D (50 µg/ml) równocześnie z chloramfenikolem opóźnia proces biosyntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek.

Oksydazę niewrażliwą na cyjanek można także indukować bromkiem etyldyny, który hamuje proces transkrypcji w mitochondriach. Z powyższych obserwacji wynika, że zarówno procesy transkrypcji jak i translacji mitochondrialnego DNA mają wpływ na syntezę oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Zahamowanie któregośkolwiek z tych procesów prowadzi do indukcji oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Po odmyciu chloramfenikolu i przeniesieniu komórek *Neurospora crassa* do świeżej pożywki następuje zanikanie oddychania niewrażliwego na cyjanek. Pierwotny poziom utrzymuje się, jeżeli w pożywce znajduje się cykloheksimid. W czasie 30 min okresu utajonego (*lag phase*), pomiędzy hamowaniem transkrypcji lub translacji mitochondrialnego DNA a pojawieniem się oddychania niewrażliwego na cyjanek, następuje indukcja oksydazy niewrażliwej na cyjanek (20). Brak różnic w poziomie ATP, cyklicznego AMP, NADH, NAD, NADP

lub NADPH w komórkach traktowanych chloramfenikolem i kontrolnych wskazuje, że żadna z tych substancji nie bierze udziału w procesach regulacji indukcji oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Przypuszcza się, że w mitochondriach jest syntetyzowane białko, które reguluje syntezę oksydazy niewrażliwej na cyjanek lub blokuje jakieś określone miejsce w błonie mitochondrialnej, uniemożliwiając w ten sposób związaną się oksydazę z błoną. Możliwe, że białko to działa również poza mitochondriami zapobiegając transkrypcji lub translacji mRNA na cytoplazmatycznych rybosomach. Badania genetyczne wskazują, że białka mitochondrialne biorą udział w regulacji syntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek i że ich działanie jest pozamitochondrialne. Przypuszcza się, że białko syntetyzowane w mitochondriach może być przenoszone z mitochondriów do jądra, gdzie działa jako represor (19, 47). Chloramfenikol może zatem hamować syntezę białka represorowego lub białek oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Te ostatnie białka łączą się przypuszczalnie w aktywną cząsteczkę oksydazy w błonie mitochondrialnej. Schemat regulacji biosyntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek przedstawiono na rycinie 1.



Ryc. 1. Regulacja biosyntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek w komórkach *Neurospora crassa* [(20) zmodyfikowany].

CAP-chloramfenikol

Można przypuszczać, że podobny mechanizm regulacji biosyntezy oksydazy niewrażliwej na cyjanek występuje w mutantach *Neurospora crassa* z uszkodzonym cytochromowym łańcuchem oddechowym. Mutanty te wykazują wyraźnie zmniejszoną wydajność oksydacyjnej fosforylacji i zwiększoną syntezę białek na cytoplazmatycznych rybosomach (48, 49).

Oddychanie niewrażliwe na cyjanek pojawia się także w mutantach z zablokowanym procesem metylacji w syntezie fosfatydylocholiny (50) oraz w mutantach niezdolnych do syntezy waliny i izoleucyny (51). W wyniku wspomnianych mutacji następują zmiany w błonie mitochondrialnej dotyczące bądź składników lipidowych, bądź białkowych.

IV. Układ oksydazy niewrażliwej na cyjanek

Przez prawie 15 lat podzielano pogląd, że niektóre cytochromy typu b (b_7) pełnią funkcję oksydazy niewrażliwej na cyjanek (53—56). Obecnie wiadomo, że mitochondria badanych roślin były zanieczyszczone nie zidentyfikowanymi dotychczas organellami, których składnikiem jest właśnie cytochrom b_7 (57) i któremu niesłusznie przypisywano funkcję oksydazy (58, 58).

Wyniki badań kinetyki utleniania lub redukcji poszczególnych składników łańcucha oddechowego w mitochondriach roślin wyższych wskazują, że w obecności antymycyny A cytochromy typu b są całkowicie zredukowane, podczas gdy flawoproteidy pozostają w znacznym stopniu utlenione (59). Zawartość flawoproteidów jest trzy do pięciu razy większa w mitochondriach, w których oddychanie jest niewrażliwe na cyjanek niż w mitochondriach, w których oddychanie jest całkowicie hamowane przez cyjanek (60, 61). Wydaje się, że różnice zawartości flawoproteidów świadczą o ich specjalnej funkcji, przypuszczalnie funkcji w transporcie elektronów przez drogę niewrażliwą na cyjanek. Taką hipotezę postawił już w 1937 r. van Herk (62), który wykazał, że oddychanie niewrażliwe na cyjanek zależy przede wszystkim od obecności flawoproteidu i że układ cytochromowy nie bierze w tym procesie udziału. Obecnie wykazano, że w mitochondriach izolowanych z kolb *Symplocarpus foetidus*, flawoproteid fluoryzujący o wysokim potencjale oksydoredukcyjnym (Fp_{hr} — *fluorescent, high potential flawoproteid*) jest stałym składnikiem oksydazy niewrażliwej na cyjanek (63). Nie występuje on w mitochondriach ssaków i ptaków. Fakt, że kwas m-chlorobenzenohydroksamowy hamuje utlenianie Fp_{hr} i że ani cyjanek ani antymycyna A nie mają żadnego wpływu na ten proces, świadczy, że składnik ten bierze udział tylko w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek. Nie może on pełnić funkcji oksydazy, ponieważ w wyniku utleniania substratów powstaje woda a nie nadtlenek wodoru (59, 64).

Obecnie przypuszcza się, że żelazosulfoproteid pełni funkcję oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Brak różnic pomiędzy zawartością tego białka w mitochondriach, w których oddychanie jest wrażliwe i niewrażliwe na cyjanek podważa słuszność tego poglądu (65), natomiast selektywne hamowanie utleniania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek przez czynniki chelatujące, popiera ten pogląd (30, 66, 67). Wyniki badań za po-

mocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego wskazują, że udział żelazoflawoproteidu w tym utlenianiu jest możliwy (68).

W pierwotniakach, *Trypanosoma mega*, (28), podobnie jak w bakteriach wielu rodzaj (69), przypuszczano, że funkcję oksydazy niewrażliwej na cyjanek pełni cytochrom o. Przypisywanie funkcji oksydazy cytochromowi o oparte było na własnościach wiązania tlenu węgla przez ten cytochrom oraz niewrażliwości oddychania na cyjanek. Funkcję cytochromu o jako oksydazy niewrażliwej na cyjanek podaje w wątpliwość fakt, że cytochrom o obecny jest także u tych *Trypanosoma*, u których oddychanie jest tylko w 5% niewrażliwe na cyjanek.

V. Kontrola oddychania niewrażliwego na cyjanek

Udział oddychania niewrażliwego na cyjanek i antymycynę A w całkowitym oddychaniu można określić na podstawie miareczkowania kwasem hydroksamowym. Oddychanie niewrażliwe na cyjanek nie jest związane z fosforylacją (29, 70). W związku z tym mitochondria, w których oddychanie jest częściowo niewrażliwe na cyjanek muszą posiadać dwa mechanizmy kontroli transportu elektronów. Pierwszy z nich, wspólny dla mitochondriów roślinnych i zwierzęcych, polega na kontroli oddychania przez zapotrzebowanie na energię i wyraża się potencjałem fosforylacyjnym. Mimo, że zjawisko to znane jest od wielu lat, pierwszy etap wiązania energii utleniania nie jest dotąd poznany i w związku z tym sam mechanizm kontroli nie jest dostatecznie jasny. Według Chanc'e'a i wsp. (71, 72) kontrolę oddechową określa się stosunkiem aktywności oddychania w stanie 3 (w obecności ADP) do aktywności oddychania w stanie 4 (w nieobecności ADP). W mitochondriach roślinnych, w których oddychanie jest tylko częściowo wrażliwe na cyjanek, ten rodzaj kontroli odnosi się tylko do oddychania, w którym biorą udział składniki cytochromowe.

Drugi rodzaj kontroli dotyczy oddychania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek. W tym przypadku kontrolę wyraża się zmianą stosunku aktywności tej oksydazy do całkowitej aktywności utleniania przy przejściu mitochondriów ze stanu 3 do 4 (29, 73). Teoretycznie możliwych jest kilka mechanizmów kontroli oddychania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek. W pierwszym przypadku mogłaby to być kompetycja pomiędzy oksydazą niewrażliwą na cyjanek a oksydazą cytochromową, w innym zaś stopień redukcji jednego z cytochromów mógłby regulować funkcjonowanie oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Być może, że w wyniku wysokiej redukcji cytochromów lub innego składnika łańcucha oddechowego następuje allosteryczna modyfikacja tej oksydazy. Nie jest także wykluczone, że potencjał fosforylujący reguluje oddychanie przez drogę niewrażliwą na cyjanek. Wreszcie można przyjąć, że dwa różne składniki łańcucha oddechowego będące ze sobą w równowadze oksydoredukcyjnej

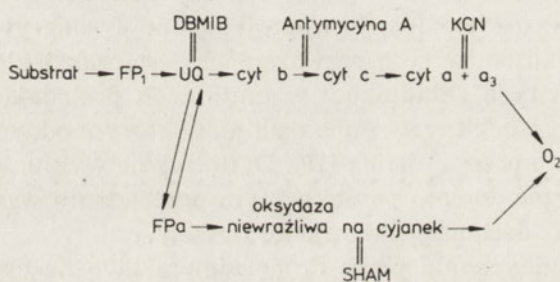
znajdują się w miejscu rozgałęzienia i że każda z oksydaz otrzymuje redukujące równoważniki od niezależnych przenośników.

W mitochondriach *Symplocarpus foetidus* w obecności cyjananku lub kwasu benzenohydroksamowego obydwa przenośniki powinny być całkowicie zredukowane. Wówczas oddychanie przez niezahamowaną cyjanankiem drogę powinno zachodzić z maksymalną szybkością. W nieobecności inhibitorów, przenośnik biorący udział w oddychaniu z udziałem oksydazy cytochromowej powinien być całkowicie zredukowany, a przenośnik biorący udział w oddychaniu z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek, częściowo utleniony z powodu wyższej aktywności tej oksydazy. Stopień redukcji przenośnika biorącego udział w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek jest czynnikiem regulującym aktywność oksydazy niewrażliwej na cyjanek (29, 73). Omówiony powyżej mechanizm regulacji oddychania występuje przypuszczalnie we wszystkich mitochondriach roślin wyższych. Wydaje się, że oddychanie w mitochondriach izolowanych z komórek *Neurospora crassa* hodowanych w obecności chloramfenikolu regulowane jest w podobny sposób (19). Przenośniki elektronów biorące udział w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek w mitochondriach izolowanych z komórek *Neurospora crassa* są nieznanne i nie wydaje się, aby podobnie jak w mitochondriach *Symplocarpus foetidus*, flawoproteidy mogły odgrywać jakąś rolę. Głównym argumentem w tych rozważaniach jest brak jakichkolwiek różnic w zawartości tych składników w mutantach posiadających oksydazę niewrażliwą na cyjanek i w szczepie dzikim, w którym oddychanie jest całkowicie hamowane przez cyjanek (19). Definitywne wykluczenie tej możliwości może nastąpić dopiero po dokładnym przebadaniu wszystkich składników łańcucha oddechowego w rejonie flawiny.

W regulacji oddychania przez drogę niewrażliwą na cyjanek w cytoplazmatycznych mutantach oddechowych *Neurospora crassa* szczególną rolę może odgrywać ubichinon. Stężenie ubichinonu w mitochondriach mutantów mi-1 i mi-4 jest około cztery razy większe niż w szczepie dzikim (17, 74). Mimo dużego nadmiaru ubichinonu w stosunku do innych składników łańcucha oddechowego cała jego ilość bierze udział w mitochondrialnych procesach oksydoredukcyjnych. Wyniki zmian stopnia redukcji ubichinonu w różnych stanach metabolicznych mitochondriów mogą wskazywać, że czynnikiem regulującym działanie oksydazy niewrażliwej na cyjanek, w rozgałęzionym systemie oddechowym mutantów mi-1, może być stopień redukcji ubichinonu (75). Wiadomo, że w normalnym łańcuchu oddechowym ubichinon pełni funkcję akceptora redukujących ekwiwalentów dostarczanych przez różne dehydrogenazy (76—80) oraz donora elektronów dla układu cytochromowego (81). W systemie oddechowym mutantów mi-1, w czasie bardzo aktywnego utleniania NADH ubichinon jest w dużym stopniu zredukowany, ponieważ szybkość utleniania zredukowanego ubichinonu przez mało aktywną oksydazę cytochromową jest niewielka. W wyniku tej sytuacji wysoki stopień redukcji ubichinonu może być czynnikiem uru-

chamiającym drogę utleniania, niewrażliwą na cyjanek. Wyniki tych badań sugerują, że ubichinon znajduje się w równowadze oksydoredukcyjnej ze składnikiem znajdującym się w pobliżu flawiny (Ryc. 2).

Funkcję ubichinonu jako regulatora oddychania niewrażliwego na cyjanek w mitochondriach mutantu *Neurospora crassa* mi-1 wykazano także w badaniach przy użyciu DBMIB (82). DBMIB jest znanym inhibitorem transportu elektronów w łańcuchu oddechowym roślin (83), bakterii (84) i zwierząt (85). Struktura chemiczna tego inhibitora pozwala przypuszczać, że działa on w łańcuchu oddechowym na poziomie ubichinonu. Nieznaczące „wyliminowanie” ubichinonu z procesów oksydoredukcyjnych przez DBMIB zmienia w widoczny sposób aktywność oddychania niewrażliwego na cyjanek. Brak hamowania oddychania wrażliwego na cyjanek w mitochondriach mutantu mi-1 przy niższych stężeniach DBMIB świadczy, że z całej puli zredukowanego ubichinonu tylko pewna określona jego część jest utleniana przez oksydazę cytochromową i tylko ta część ubichinonu bierze udział w utlenianiu przez drogę cytochromową. Dopiero dalsze „eliminowanie” tej koniecznej puli ubichinonu przez DBMIB wpływa na zmniejszenie aktywności oddychania (82).



Ryc. 2. Schemat łańcucha oddechowego w mitochondriach mutantu mi-1 *Neurospora crassa* (82).

FP₁ — dehydrogenazy flawoproteidowe; FP_a — flawoproteid biorący udział w utlenianiu niewrażliwym na cyjanek; SHAM — kwas salicylohydroksamowy; DBMIB — dwubromotymochinon. || — miejsca działania inhibitorów.

Ostatnio, wyniki badań szybkości utleniania poszczególnych składników łańcucha oddechowego w mitochondriach roślin wyższych, w których oksydazę cytochromową zahamowano tlenkiem węgla, wskazują, że ubichinon jest składnikiem głównego łańcucha oddechowego i że jest on w stanie „bliskim” równowagi oksydoredukcyjnej (*quasi redox equilibrium*) z flawiną biorącą udział w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek (86).

VI. Utlenianie niewrażliwe na cyjanek a aksydacyjna fosforylacja

W mitochondriach izolowanych z kolb *Symplocarpus foetidus* utlenianie jabłczanu lub bursztynianu hamowane jest w 15—30% przez cyjanek. W nieobecności cyjaneku wartość stosunku ADP/O z bursztynianem wynosi

1,3 a z jabłczanem 1,9, zaś w obecności cyjanku stosunek ADP/O z bursztynianem wynosi zero, a z jabłczanem 0,7. Wyniki te wskazują, że w czasie oddychania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek powstaje jedna cząsteczka ATP. Wiązanie energii utleniania w ATP w obecności cyjanków i antymycyny A świadczy, że ta część łańcucha oddechowego, w której zachodzi pierwsza fosforylacja, bierze udział w oddychaniu katalizowanym przez oksydazę cytochromową i oksydazę niewrażliwą na cyjanek (66). Po zahamowaniu oddychania niewrażliwego na cyjanek kwasem hydroksamowym zwiększa się stosunek ADP/O, niezależnie od użytego substratu co wskazuje, że oddychanie nie jest związane z fosforylacją.

Mitochondria izolowane z mutantu *mi-1 Neurospora crassa* wykazują niską kontrolę oddechową i niski stopień sprzężenia oddychania z fosforylacją (44, 87, 88). Mitochondria szczepu dzikiego, izolowane tymi samymi metodami, wykazują natomiast wysoką kontrolę oddechową (44, 86a). Fosforylacja w tych mitochondriach, mierzona stosunkiem P/O, z cytrynianem jako substratem, wynosi 3,0 (89). W mitochondriach mutantu *mi-1*, podobnie jak w mitochondriach roślinnych, w których oddychanie jest częściowo hamowane przez cyjanek, kontrola oddechowa i wydajność fosforylacji zwiększa się po zahamowaniu oddychania niewrażliwego na cyjanek.

U mutantu *mi-1* z jądrową mutacją supresorową (poky f^+) wykazano, że fosforylacja zachodzi głównie w II i III miejscu w normalnym, cytochromowym łańcuchu oddechowym. Pierwsze miejsce jest przypuszczalnie mało wydajne, ponieważ różnica w wydajności fosforylacji pomiędzy substratami utlenianymi z udziałem NAD i bursztynianem jest bardzo mała (44).

W mitochondriach mutantu *mi-1*, charakteryzującego się bardzo wolnym wzrostem wykazano, że fosforylacja zachodzi w I i III miejscu łańcucha oddechowego (88). Brak fosforylacji w II miejscu wynika prawdopodobnie z braku cytochromu b w mitochondriach izolowanych z młodych komórek. W mitochondriach izolowanych z komórek hodowli 4—5 dniowych wydajność fosforylacji jest znacznie wyższa w związku ze wzrostem zawartości cytochromów b i oksydazy cytochromowej (18). Mimo rozbieżności wyników (44, 88) większość badaczy uważa, że w łańcuchu oddechowym mutantu *mi-1* energia utleniania substratów z udziałem NAD wiązana jest w jedną cząsteczkę ATP. Nie wiadomo jednak, czy fosforylacja ta zachodzi w tym samym miejscu co w łańcuchu oddechowym dzikiego szczepu. Mitochondria mutantu *mi-1* są niewrażliwe na rotenon (44, 88), który jest inhibitorem pierwszej fosforylacji w łańcuchu oddechowym w mitochondriach zwierzęcych (90). Brak wrażliwości na rotenon ogromnie utrudnia interpretację wyników. W przypadku NADH, substratu aktywnie utlenianego przez mitochondria mutantu *mi-1 Neurospora crassa* oraz bursztynianu, oddychanie z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek nie jest sprzęgnięte z fosforylacją. W mitochondriach *Neurospora crassa*, podobnie jak w mitochondriach *Sacharomyces carlsbergensis* (27, 91) utlenianie egzo-

gennego NADH sprzężone jest z dwiema fosforylacjami: w II i III miejscu łańcucha oddechowego.

VII. Rozgałęzienie łańcucha oddechowego.

Początkowa część łańcucha oddechowego, w skład której wchodzi odpowiednio dehydrogenazy, jest wspólna dla drogi utleniania wrażliwej i niewrażliwej na cyjanek (11, 55, 59, 92). Żaden z cytochromowych składników biorących udział w oddychaniu hamowanym przez cyjanek nie bierze udziału w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek (16, 18, 75). W związku z tym nasuwa się przypuszczenie, że rozgałęzienie łańcucha oddechowego na część wrażliwą i niewrażliwą na cyjanek następuje na poziomie flawiny lub ubichinonu (63, 75, 93). Najbardziej prawdopodobne jest założenie, że w miejscu rozgałęzienia łańcucha oddechowego znajdują się dwa różne przenośniki elektronów, które są ze sobą w równowadze oksydoredukcyjnej. Jeden z nich bierze udział w oddychaniu katalizowanym przez oksydazę niewrażliwą na cyjanek, drugi zaś, w oddychaniu z udziałem oksydazy cytochromowej. Zidentyfikowanie tych przenośników napotykało na duże trudności. Trudność ta polegała głównie na doborze odpowiedniego inhibitora oksydazy cytochromowej, ponieważ kompleks cytochromowej oksydazy z cyjankiem jest stosunkowo nietrwały (94). Zastosowanie tlenku węgla jako inhibitora głównej drogi utleniania, pozwoliło obserwować reakcje składników drogi oddychania niewrażliwej na cyjanek (86). Dysocjacja kompleksu oksydaza cytochromowa—tlenek węgla, w warunkach doświadczenia, następuje w ciągu 3—5 sek (95), podczas gdy $t_{1/2}$ dla transportu elektronów przez łańcuch oddechowy wynosi 1—500 msek. Kompleks oksydaza cytochromowa—tlenek węgla jest zatem wystarczająco trwały, by transport elektronów przez drogę niewrażliwą na cyjanek mógł się odbyć bez interferencji składników łańcucha cytochromowego.

Badania kinetyki utleniania poszczególnych przenośników elektronów w mitochondriach roślinnych, w których oksydaza cytochromowa została zahamowana przez tlenek węgla, wykazały, że ubichinon jest szybko utleniany przez oksydazę niewrażliwą na cyjanek. Wśród szybko utleniających się przenośników łańcucha oddechowego znajduje się także flawoproteid, którego ilość stanowi 25—30% całej ilości flawoproteidów znajdujących się w mitochondriach. Dodanie kwasu m-chlorobenzenohydroksamowego powoduje znaczne wydłużenie czasu utleniania flawoproteidu i ubichinonu. Flawoproteid, którego potencjał oksydoredukcyjny ($E_{m_{7,2}}$) wynosi +20 mV jest prawdopodobnie przenośnikiem elektronów w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek. Jest on przypuszczalnie w równowadze oksydoredukcyjnej z ubichinonem, przenośnikiem biorącym udział w oddychaniu hamowanym przez cyjanek. Różnica potencjałów pomiędzy flawoproteidem a ubichinonem [$E_{m_{7,2}} = 70$ mV (94)] jest wystarczająco duża, aby małe zmiany stopnia redukcji ubichinonu wpływały znacznie na stopień redukcji flawoproteidu (86).

Przedmiotem intensywnych badań dotyczących lokalizacji miejsca, w którym następuje rozgałęzienie łańcucha oddechowego częściowo wrażliwego na cyjanek był także mutant *Neurospora crassa* mi-1. Podobnie jak w mitochondriach roślinnych, wykluczono udział cytochromowej części łańcucha oddechowego w utlenianiu przez drogę niewrażliwą na cyjanek i mimo, że nie stwierdzono, który z pozostałych przenośników elektronów mógłby brać udział w oddychaniu niewrażliwym na cyjanek, to jednak zasugerowano, że może być nim flawoproteid lub ubichinon (96). Zmiany oksydoredukcyjne ubichinonu w obecności inhibitorów oksydazy niewrażliwej na cyjanek lub oksydazy cytochromowej wskazują, że ubichinon znajduje się w miejscu rozgałęzienia łańcucha oddechowego i że bierze on udział zarówno w oddychaniu wrażliwym i niewrażliwym na cyjanek.

Pogląd, że ubichinon znajduje się w miejscu rozgałęzienia łańcucha oddechowego częściowo wrażliwego na cyjanek jest ogólnie przyjęty (18, 75, 86). Brak korelacji pomiędzy aktywnością oddychania z udziałem oksydazy niewrażliwej na cyjanek a stopniem redukcji ubichinonu wskazuje, że nie jest on bezpośrednio zaangażowany w transport elektronów przez tę drogę.

In vitro w mitochondriach mutantu *Neurospora crassa* mi-1, oddychanie niewrażliwe na cyjanek szybko zanika (96). Równocześnie z zanikaniem tego oddychania wzrasta stopień redukcji ubichinonu w obecności cyjaneków oraz zmniejsza się możliwość utleniania zredukowanego ubichinonu przez oksydazę niewrażliwą na cyjanek (97). Stosując cyjanek jako inhibitor oksydazy cytochromowej i kwas hydroksamowy jako inhibitor oksydazy niewrażliwej na cyjanek wykazano, że aktywność utleniania egzogenego NADH spada w wyniku inaktywacji oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Spadek aktywności oddychania w obecności egzogenego NADH zachodzi w podobny sposób również w mitochondriach szczepu dzikiego. Aktywność utleniania NADH nie zmienia się, jeżeli mitochondria przechowuje się w atmosferze azotu. W związku z tym, wydaje się, że w warunkach aerobowych zarówno u mutantu mi-1 jak i w szczepie dzikim inaktywacji ulega ten sam składnik łańcucha oddechowego. Być może, że składnikiem tym jest żelazosulfoproteid, który znajduje się w mitochondriach szczepu dzikiego i mutantu mi-1. Być może, że w mutancie mi-1 pełni on funkcję oksydazy niewrażliwej na cyjanek. Wniosków tych nie da się jednak pogodzić z wykazaną syntezą, *de novo*, oksydazy niewrażliwej na cyjanek w mitochondriach dzikiego szczepu *Neurospora crassa* hodowanego w obecności chloramfenikolu. Wyizolowanie i zidentyfikowanie oksydazy niewrażliwej na cyjanek jest konieczne do uzgodnienia tych poglądów.

VIII. Znaczenie fizjologiczne oddychania niewrażliwego na cyjanek.

Znaczenie fizjologiczne oksydazy niewrażliwej na cyjanek nie jest dotychczas jednoznacznie określone. Wyniki doświadczeń na różnych organizmach pozwalają stawiać różne hipotezy nie dające się dotychczas ze so-

bą powiązać. W *Symplocarpus foetidus*, głównym zadaniem oddychania niewrażliwego na cyjanek jest, jak się przypuszcza, produkcja ciepła pozwalająca tolerować niskie temperatury otoczenia. Różnica temperatury pomiędzy tkanką a otoczeniem może wynosić od 10—25° (29). Obliczono, że ilość ciepła wydzielająca się w czasie utleniania bursztynianu przez oksydazę niewrażliwą na cyjanek, w stosunku do ilości ciepła wytwarzanego w czasie utleniania bursztynianu przez normalny łańcuch oddechowy jest o 40—50% większa (29).

Bardziej prawdopodobne jest przypuszczenie, że oksydaza niewrażliwa na cyjanek działa wtedy, kiedy poziom ADP w mitochondriach jest bardzo niski. W nieobecności akceptora fosforanu niemożliwe jest funkcjonowanie drogi cytochromowej, która jest sprzęgnięta z oksydacyjną fosforylacją (29, 61). Wówczas uruchomiona zostaje niewrażliwa na cyjanek droga oddychania, przy udziale której utleniany jest cytoplazmatyczny NADH, nieodzowny w procesach glikolitycznych.

W mutancie *Neurospora crassa* mi-1, u którego w wyniku mutacji normalny łańcuch cytochromowy jest w drastyczny sposób zmieniony, wydaje się, że oddychanie niewrażliwe na cyjanek kompensuje mało aktywną oksydazę cytochromową. Można sądzić, że ta droga ma znaczenie, przede wszystkim, w utlenianiu cytoplazmatycznego NADH, zapewniając w ten sposób funkcjonowanie glikolizy, która w młodych komórkach jest głównym źródłem energii. Obecność specyficznej dehydrogenazy utleniającej egzogeny NADH zlokalizowanej na zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej, oprócz dehydrogenazy NADH utleniającej matriksowy NADH, pozwala sądzić, że taka funkcja oksydazy niewrażliwej na cyjanek w cytoplazmatycznych mutantach oddechowych *Neurospora crassa* jest bardzo prawdopodobna.

Pojawianie się oddychania niewrażliwego na cyjanek w okaleczonych tkankach (98, 99) oraz w mikroorganizmach, których komórki znajdują się w fazie stacjonarnej wzrostu (39, 40, 41) tłumaczyć można koniecznością usuwania przez komórkę zbędnych lub toksycznych substancji.

Mimo, że rola oksydazy niewrażliwej na cyjanek nie jest całkowicie wyjaśniona, to z całą pewnością jej obecność zwiększa szanse przeżywalności komórki w warunkach niekorzystnych.

Artykuł nadszedł 2.4.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 27.9.1977

PIŚMIENNICTWO

1. Genevois M. L., (1929), *Rev. Gen. Botanique*, **41**, 252—271, cyt. wg Henry M. F., Nyns E. J., (1975), *Sub. Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
2. Henry M. F., Nyns E. J., (1975), *Sub. Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
3. Bonner Jr. W. D., (1965), *Plant Biochemistry*, Wyd. Bobber J., Varner J. E., str. 89—123, Academic Press, New York.

4. Hall F. R., Hollingworth R. M., Shankland D. L., (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, **38B**, 723—737.
5. Von Brand T., Johnson E. M., (1947), *J. Cell. Comp. Physiol.*, **29**, 33—49.
6. Evans D. A., Braun R. C., (1971), *Nature*, **230**, 251—252.
7. Braun R. C., Evans D. A., (1971), *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **65**, 256.
8. Ray S. K., Gross G. A. M., (1972), *Nature, New Biology*, **237**, 174—175.
9. Browman J. B. R., Srivastawa H. K., Flynn I. W., (1972), *Comparative Biochemistry of Parasites*, red. Van den Bosche H., str. 329—342, Academic Press, New York.
10. Grant P. T., Sargent J. R., (1960), *Biochem. J.*, **76**, 229—237.
- 10a Ryley J. F., (1962), *Biochem. J.*, **85**, 211—223.
11. Ikuma H., (1972), *Ann. Rev. Pl. Physiol.*, **23**, 419—436.
12. Grimmelikhuijzen C. J. P., Slater E. C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 67—79.
13. Butow R. A., Zeydel M., (1967), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2545—2549.
14. Haskins F. A., Tissieres H. A., Mitchell H. K., Mitchell M. B., (1953), *J. Biol. Chem.*, **200**, 819—826.
15. Tissieres A., Mitchell H. K., Haskins F. A., (1953), *J. Biol. Chem.*, **205**, 423—433.
16. Lambowitz A. M., Slayman C. W., Slayman C. L., Bonner W. D., Jr. (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1536—1545.
17. Drabikowska A. K., Kruszezwska A., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 1112—1117.
18. Von Jagow G., Weiss H., Klingenberg M., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **33**, 140—157.
19. Edwards D. L., Rosenberg E., Maroney P. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3551—3556.
20. Edwards D. L., Rosenberg E., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 217—221.
21. Von Jagow G., Klingenberg M., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 278—282.
22. James W. O., Elliott D. C., (1955), *Nature*, **175**, 89.
23. James W. O., Beevers H., (1950), *New. Phytol.*, **49**, 353—374.
24. Hackett D. P., (1957), *J. Exp. Bot.*, **8**, 157—171
25. Nakano M., Asahi T., (1970), *Plant Cell Physiol.*, **11**, 499—502.
26. Tissieres A., Mitchell H. K., (1954), *J. Biol. Chem.*, **208**, 241—249.
27. Kidder III, G. W., Goddard D. R., (1965), *Plant. Physiol.*, **40**, 552—556.
28. Wiskich J. T., Bonner Jr., W. D., 1963, *Plant. Physiol.*, **38**, 594—604.
29. Bahr J. T., Bonner W. D., Jr (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3441—3445.
30. Schonbaum G. R., Bonner W. D., Storey B. T., Bahr J. T., (1971), *Plant Physiol.*, **47**, 124—128.
31. Neilands J. B., (1966), *Struct. Bonding*, **1**, 59—108.
32. Haydon A. H., Davis W. B., Arceneaux J. E. L., Byers B. R., (1973), *J. Bacteriol.*, **115**, 912—918.
33. Henry M. F., de Troostembergh J. C., Nyns S. J., (1973), *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, **81**, 971.
34. Von Schmeling B., Kulka M., (1966), *Science*, **152**, 659.
35. Lyr H., Luthardt W., Ritter G., (1971), *Z. Allg. Microbiol.*, **11**, 373—385.
36. Lyr H., Ritter G., Casperson G., (1972), *Z. Allg. Microbiol.*, **12**, 271—280.
37. Lyr H., Schewe T., (1975), *Acta Biol. Med. Germ.*, **34**, 1631—1641.
38. Marsch P. B., Goddard D. R., (1939), *Am. J. Bot.*, **26**, 724—728.
39. Matsunaka S., Morita S., Conti S. F., (1966), *Plant. Physiol.*, **41**, 1364—1369.

40. Kitsutani S., Sawada K., Osumi M., Nagahisa M., (1970), *Plant Cell Physiol.*, **11**, 107—118.
41. Henry M. F., Hamaide-Deplus M. C., Nyns E. J., (1974), *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Sereology*, **40**, 79—91.
42. Gleason F. H., (1974), *Mycologia*, **66**, 73—76.
43. Lambowitz A. M., Slayman C. W., (1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 1087—1096.
44. Lambowitz A. M., Smith E. W., Slayman C. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4859—4865.
45. Edwards D. L., Kwieciński F., (1973), *J. Bacteriol.*, **116**, 610—618.
46. Wilson B. W., Donforth W. F., (1958), *J. Gen. Microbiol.*, **18**, 535—542.
47. Barath Z., Kunzel H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1371—1374.
48. Woodward D. O., Edwards D. L., Flavell R. B., (1970), *Symposia of the Society for Experimental Biology* red. Miller P. L., t. 24 str. 55—69.
49. Flavell R. B., Woodward D. O., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **13**, 548—553.
50. Juretić (1976), *J. Bacteriol.* **136**, 542—543.
51. Berggnist A., Eakin E. A., Eakin R. T., Wagner R. P., (1974), *Biochem. Genet.*, **12**, 39—49.
52. Luck D. J., (1965). *J. Cell. Biol.*, **24**, 445—460.
53. Bendall D. S., Hill R., (1956), *New Phytol.*, **55**, 206—212.
54. Hackett D. P., Haas D. W., (1958), *Plant. Physiol.*, **33**, 27—32.
55. Chance B., Hackett D. P., (1959), *Plant. Physiol.*, **34**, 33—49.
56. Yocum C. S., Hackett D. P., (1957), *Plant. Physiol.*, **32**, 186—191.
57. Douce R., Christensen E. L., Bonner W. D., Jr. (1972), *Biochim Biophys. Acta*, **275**, 148—160.
58. Storey B. T., Bahr J. T., (1969), *Plant. Physiol.*, **44**, 115—125.
59. Bendall D. S., Bonner W. D., (1971), *Plant. Physiol.*, **47**, 236—245.
60. Lance C., Bonner W. D. Jr. (1968), *Plant. Physiol.*, **43**, 756—766.
61. Ikuma H., Bonner W. D., Jr. (1967), *Plant. Physiol.*, **42**, 1535—1544.
62. Van Herk A. W. H., (1937), cyt. wg Henry M. F., Nyns E. J., (1975), *Sub. Cell. Biochem.*, **4**, 1—65.
63. Erecińska M., Storey B. T., (1970), *Plant., Physiol.*, **46**, 618—624.
64. Misushima S., Arima K., (1960), *J. Biochem.*, **47**, 351—360.
65. Dizengremel P., Chauveau M., Lance C., (1973), cyt. wg *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, (1975), **26**, 117—126.
66. Bendall D. S., Bonner W. D., Jr., Plesnicar M., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, 731.
67. Wilson S. B., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 49—52.
68. Cammack R., Palmer J. M., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 816—823.
69. White D. C., Sinclair P. R., (1971), *Adv. Microbiol. Physiol.*, **5**, 173.
70. Storey B. T., Bahr J. T., (1969), *Plant. Physiol.*, **44**, 126—134.
71. Chance B., Lee C. P., Mela L., (1967), *Fed. Proc.*, **26**, 1341—1354.
72. Chance B., (1972), *FEBS Letters*, **23**, 3—20.
73. Bahr J. T., Bonner W. D., Jr. (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3446—3450.
74. Drabikowska A. K., Kruszewska A., (1969), *Neurospora Newsl.*, **15**, 4.
75. Drabikowska A. K., (1975), *Acta Biochim. Polon.*, **22**, 169—178.
76. Szarkowska L., Heller J., (1961), *Acta Biochim. Polon.*, **8**, 437.
77. Szarkowska L., Drabikowska A. K., (1963), *Life Sci.*, **7**, 519—523.
78. Drabikowska A. K., Szarkowska L., (1965), *Acta Biochim. Polon.*, **12**, 387—394.
79. Drabikowska A. K., (1967), *Acta Bioch. Polon.*, **15**, 241—247.
80. Klingenberg M., Kröger A., (1967), *Biochemistry of Mitochondria*, wyd.

- Slater E. C., Kaniuga Z., Wojtczak L., str. 11—27, Academic press London and New York, PWN.
81. Kröger A., Klingenberg M., (1973), *Eur. J. Biochem.* **39**, 313—323.
 82. Drabikowska A., (1977), *Life Sci.*, (w druku).
 83. Böhme H., Reimer S., Trebst A., (1971), *Z. Naturforsch.*, **26B**, 341—352.
 84. Poole R. K., Haddock B. A., (1975), *FEBS Letters*, **52**, 13—16.
 85. Loschen G., Azzi A., (1974), *FEBS Letters*, **41**, 115—117.
 86. Storey B. T., (1976), *Plant. Physiol.*, **58**, 521—525.
 - 86a. Weiss H., von Jagow G., Klingenberg M., Bücher T., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **14**, 75—82.
 87. Eakin R. T., Mitchell H. K., (1970), *J. Bacteriol.*, **104**, 74—78.
 88. Drabikowska A. K., Frank C., Kosmakos F., Brodie A. F., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 733—740.
 89. Hall D. O., Greenawalt J. W., (1964), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **17**, 565—569.
 90. Ernster L., Dallner G., Azzone G. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 1124—1131.
 91. Von Jagow G., Klingenberg M., (1970), *Eur. J. Biochem.*, **12**, 583—592.
 92. Meense B. J. D., (1975), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **26**, 117—126.
 93. Storey B. T., (1970), *Plant Physiol.*, **45**, 455—460.
 94. Storey B. T., (1975), *Plant. Physiol.*, Supplement 56, 68.
 95. Chance B., (1953), *J. Biol. Chem.*, **202**, 397—406.
 96. Lambowitz A. M., Smith E. W., Slayman C. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4850—4858.
 97. Drabikowska A. K., (1977), praca przygotowana do druku.
 98. Hackett D. P., Haas D. W., Griffiths S. K., Niederpruem D. J., (1960), *Plant. Physiol.*, **35**, 8—19.
 99. Jacobson B. S., Laties G. G., Smith B. N., Epstein S., Laties B., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **216**, 295—304.
 100. Douce R., Mannella C. A., Bonner W. D., Jr. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **275**, 148—160.

KOMUNIKAT

VII Międzynarodowy Zjazd „Histamine Club” odbędzie się w Łodzi w dniach 2-6 maja 1978 roku. Bliższych informacji udziela prof. dr C. Maśliński z Zakładu Amin Biogennych Instytutu Farmakologii, PAN, 90-136 Łódź, ul. Narutowicza 60.

KRYSTYNA KASMAN *

Budowa grubego filamentu mięśnia szkieletowego**

Structure of Skeletal Muscle Thick Filament

Spis treści

- I. Białka grubego filamentu
 - I-1. Budowa cząsteczki miozyny z mięśni szkieletowych
 - I-2. Inne białka grubego filamentu
- II. Modele miozynowych filamentów
 - II-1. Model Huxleya
 - II-2. Model Pepe'a
 - II-3. Model Squire'a
- III. Syntetyczne filamenty

Contents

- I. Proteins of thick filament
 - I-1. Submolecular structure of the myosin molecule
 - I-2. Other proteins of thick filament
- II. Models of the myosin filaments
 - II-1. Huxley's Model
 - II-2. Pepe's Model
 - II-3. Squire's Model
- III. Synthetic filaments

I. Białka grubego filamentu

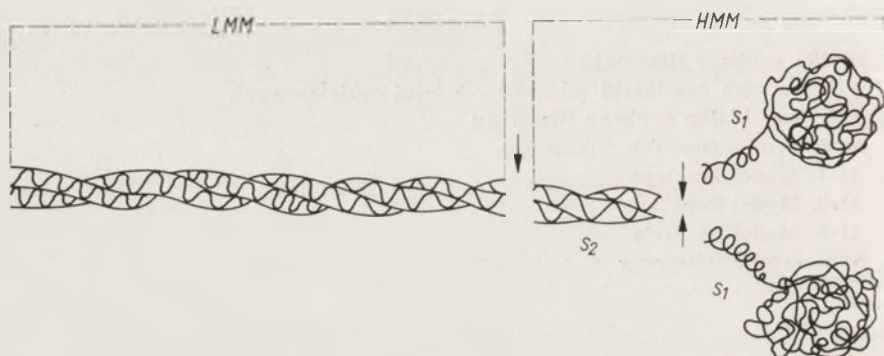
I-1. Budowa cząsteczki miozyny z mięśni szkieletowych

Podstawowym elementem strukturalnym grubego filamentu jest cząsteczka miozyny o ciężarze cząsteczkowym około 470 000 (1). Zastosowanie w badaniach mikroskopowo-elektronowych techniki napyłania preparatu

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

**) W ciągu ostatnich lat na temat struktury i funkcji białek mięśniowych na łamach *Postępów Biochemii* opublikowano następujące artykuły: R. Dąbrowska i W. Drabikowski — „Regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni szkieletowych” (1970), 16, 405—425, R. Dąbrowska i W. Drabikowski — „Molekularne podstawy skurczu mięśni”, (1973), 19, 343—359.

podczas obracania go umożliwiło poznanie kształtu cząsteczki. Jest to mianowicie pałeczka (w dalszym ciągu artykułu stosowane będzie również jako synonim określenie ogon) długości około 1450Å (2, 3), posiadająca na jednym ze swych końców dwie głowy. Cząsteczkę miozyny można obrazowo przyrównać do dwugłowej kijanki (Ryc. 1). Kształt ten ma swe molekularne podłoże w liczbie i sposobie powiązań poszczególnych łańcuchów polipeptydowych — czyli w czwartorzędowej strukturze tego białka. Dwa z nich, tak zwane ciężkie łańcuchy polipeptydowe (o ciężarach cząsteczkowych około $200\,000$) na odcinku około 1370Å , mają strukturę uporządkowaną.



Ryc. 1. Schemat budowy cząsteczki miozyny. Strzałkami zaznaczono miejsca działania enzymów proteolitycznych.

Trypsyna rozбивa cząsteczkę miozyny na dwa fragmenty ciężką meromiozynę (HMM) i lekką meromiozynę (LMM). Papaina odtrawia od cząsteczki dwa aktywne subfragmenty S_1 ; Ciężką meromiozynę rozбивa zaś na dwa subfragmenty S_1 i jeden subfragment S_2 .

Każdy z nich zwinięty jest w alfa-spiralę. Na odcinku 1370Å oba łańcuchy ułożone są równolegle i utrzymują się razem dzięki niekowalencyjnym wiązaniom (hydrofobowym i wodorowym), tworząc część pałeczkowatą miozyny (4). Niektórzy autorzy głoszą pogląd, iż część pałeczkowata zbudowana jest z łańcuchów zwiniętych wokół siebie, tworząc dwułańcuchowy splot, tak zwaną superspiralę (5). Średnica pałeczki wynosi około 20Å . W miejscu, które w mikroskopie elektronowym widoczne jest jako rozwidlenie się pałeczki w dwie głowy, łańcuchy ulegają rozwinięciu. Zakończenia łańcuchów zmieniają swą konfigurację na tak zwaną strukturę chaotycznego zwoju. Długość odcinka będącego rzutem główek na długą oś filamentu, wynosi około 150Å . Średnica każdej główki wynosi $30\text{—}40\text{Å}$ (6). Kształt tych główek jest labilny i zależy od warunków doświadczenia na przykład w wysokiej sile jonowej główki wydłużają się (7).

Działając trypsyną rozbito cząsteczkę miozyny na dwie części: część lek-

ką, zwaną L-meromiozyną (LMM) (w angielskiej terminologii *light meromyosin*), o ciężarze 130 000 i długości 850 Å, nierozpuszczalną w roztworach o niskiej sile jonowej, oraz ciężką, rozpuszczalną, zwaną H-meromiozyną (HMM) (w angielskiej terminologii *heavy meromyosin*) o ciężarze około 370 000. W tym właśnie fragmencie jest cała aktywność enzymatyczna ATP-azy cząsteczki miozyny.

Trawienie papainą powoduje fragmentację ciężkiej meromiozyny na dwa rozpuszczalne i enzymatycznie aktywne subfragmenty S-1, oraz jeden subfragment S—2 o ciężarze cząsteczkowym 60 000 i długości 450 Å, nie wykazujący własności ATP-azy (7—11) (Ryc. 1).

Badając własności L-meromiozyny wykazano, iż cechuje ją zdolność agregacji końcami lub bokami poszczególnych pałeczek (Ryc. 4a). Powstające w ten sposób fibrylarne polimery utworzone z całych cząsteczek miozyny noszą nazwę syntetycznych filamentów.

Podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS miozyna ulega rozdziałowi na łańcuchy polipeptydowe: ciężkie, o których była mowa powyżej i trzy typy lekkich. Pierwszy, o ciężarze cząsteczkowym około 25 000 (występujący w ilości jednego mola na mol miozyny) — LC₁, drugi LC₂, zwany także łańcuchem DTNB, o ciężarze cząsteczkowym około 18 000 (w ilości 2 mole na mol miozyny) i trzeci — LC₃ o ciężarze cząsteczkowym około 16 000 (w ilości jednego mola na mol miozyny). Wiedza jednak na temat stechiometrii łańcuchów lekkich nie jest sprawą zamkniętą: S a r k a r (12) podaje stosunek LC₁ : DTNB : LC₃ jako 1,35 : 2 : 0,65; W e e d s (13) przedstawia ten stosunek odpowiednio 1 : 1,5 : 0,48; w naszej pracowni uzyskaliśmy dane wskazujące na możliwość jeszcze innych proporcji tych łańcuchów w cząsteczce miozyny (14).

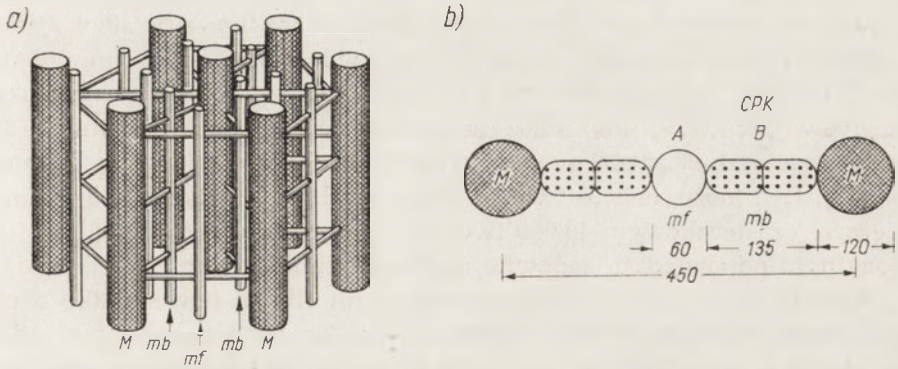
Badania nad odtrawionymi papainą głowami miozyny, tak zwanymi subfragmentami S-1 (Ryc. 1) wykazały, że wszystkie łańcuchy lekkie znajdują się w głowowej części cząsteczki. Ich rozmieszczenie jest jednak, jak dotąd, przedmiotem dyskusji. I tak na przykład na podstawie badań immunologicznych i enzymatycznych S. L o w e y (15, 16) uważa, że obie główki miozyny są bądź równocenne, bądź różnocenne. W przypadku pierwszym oznacza to występowanie cząsteczek miozyny w dwu formach homodimerycznych (17), czyli posiadających w obu główkach łańcuchy LC₁, albo łańcuchy LC₃. W drugim przypadku, przypadku heterodimerów cząsteczki miozyny w jednej główce mają łańcuchy LC₁, w drugiej zaś LC₃. Grupa badaczy japońskich (18, 19), opowiada się za zróżnicowaniem główek, a co za tym idzie, za innym rozmieszczeniem łańcuchów lekkich. Podobne sugestie wysuwano już wcześniej, opierając się na badaniach kinetycznych wiązania substratu i jego analogów z enzymem oraz kinetyki hydrolizy ATP (20). Jednakże w różnych pracowniach (21) uzyskiwano różne wartości dla ilości uwalnianego P_i na mol miozyny w początkowej fazie reakcji. Te znaczne różnice powodują różnice interpretacji wyników dotyczących różnocenno-

ci główek. Zauważono ponadto, że wiązanie ADP wyłącznie do jednego z dwu miejsc w cząsteczce miozyny wywołuje zmiany widma białka w ultrafioletcie (22). Ostatnio potwierdzono różnicowość subfragmentów S-1 dzięki badaniom kinetyki hydrolizy ATP przez miozynę w obecności Mn^{++} (23, 24). W badaniach tych udało się zróżnicować główki pod względem roli, jaką pełnią podczas hydrolizy ATP (25, 26).

I-2. Inne białka grubego filamentu

Badając skład peptydowy preparatów miozyny przy zastosowaniu elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS Offer zaobserwował oprócz peptydów miozynowych jeszcze inne peptydy (27). Peptydy oznaczono kolejnymi literami alfabetu według ich ruchliwości elektroforetycznej. Peptyd A o najmniejszej ruchliwości w żelu, a więc o największym ciężarze cząsteczkowym, odpowiadał ciężkim łańcuchom miozyny. Ledwo widoczny peptyd J, mający ruchliwość aktywny świadczył o nieznacznym zanieczyszczeniu preparatu miozyny tym białkiem cienkiego filamentu. Trzy peptydy charakteryzujące się największą elektroforetyczną ruchliwością, odpowiadają lekkim łańcuchom miozyny. Peptydy od B do I stały się przedmiotem ogromnej liczby dalszych badań. Już z wcześniejszych bowiem prac nad strukturą mięśni szkieletowych wynikało, że w grubym filamencie oprócz miozyny mogą być wbudowane inne jeszcze białka. Białkiem, któremu poświęcono najwięcej uwagi, jest białko C (peptyd C), o ciężarze cząsteczkowym 140 000, charakteryzujące się mieszaną strukturą beta oraz nie uporządkowanego kłęбка. Obecnie wiadomo, iż zawiera ono 17 reszt cysteinowych. Oczyszczone białko C otrzymuje się przez wysolenie 35—40% nasyconym siarczanem amonu, jego kompleksu z miozyną, a następnie rozdzielenie tego kompleksu na kolumnie DEAE-Sephadex w buforze fosforanowym (28). Białko C związane jest z filamentem miozynowym w określonych miejscach, co można zauważyć w mikroskopie elektronowym — stosując właściwe przeciwciała — jako prążki ułożone równolegle po obu stronach linii H sarkomeru. Badania skrawków mięśnia szkieletowego, przeprowadzone przez Huxleya przy zastosowaniu metody niskokątowej dyfrakcji promieni X, oraz mikroskopii elektronowej pozwoliło wykazać obecność 9 prążków po każdej stronie pasma. H. Pepee (29) i Offer (30—32) stosując oczyszczone przeciwciała przeciwko białku C, wykazali obecność białka C w 14 prążkach. Prążki te prostopadłe do długiej osi filamentu, są odległe od siebie o 430 Å. W świetle powyższych badań wydaje się, że białko C spina filament niczym klamrami (33). Za słusznością teorii klamrowej przemawiają wyniki badań nad usieciowaniem (*cross-linking*) tego białka z monomerem miozyny, które wykazały brak interakcji z monomerycznym białkiem, podczas gdy taka interakcja z filamentem miozyny zachodzi dość łatwo (34). Wydłużony kształt cząsteczki odpowiada również fizycznemu wyobrażeniu klamry.

Liczbę cząsteczek białka C, związanych z grubym filamentem, wyliczono na podstawie krzywych densytometrycznych elektroferogramów miofibryli. Różni autorzy podają różną jej wartość [od 37 ± 7 (35) do 52 ± 5 (31)]



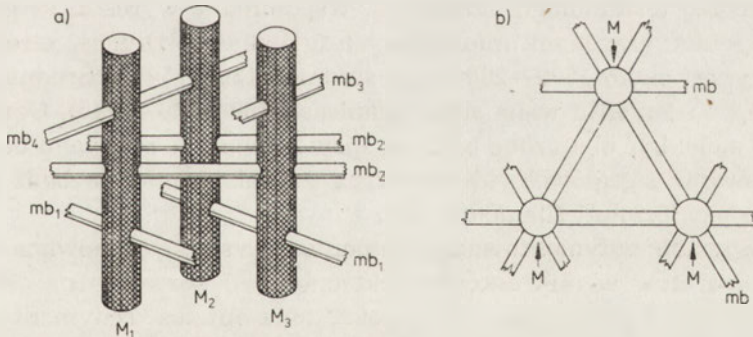
Ryc. 2. Schemat linii M według Knappeisa i Carlsena (39), model Williama i innych (37).

a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny

M — filamety miozynowe, mf — filamety z białka M zwanego przez Eaton i Pepe białkiem A (38), mb — mostki białka linii M o ciężarze cząstkowym 40 000, które według Williama i innych jest kinazą kreatynową — CPK.

cząsteczek białka C, związanych z jednym miozynowym filamentem. Przyjmuje się, iż w każdym z 14 prążków są po 2, 3 lub nawet 4 cząsteczki tego białka (31).

Skład białek linii M, przebiegającej przez środek sarkomeru nie jest jeszcze dokładnie poznany. Wyizolowane różnymi metodami peptydy mają



Ryc. 3. Model linii M według Pepe'a (40).

a) przekrój podłużny, b) przekrój poprzeczny

M — filamety miozynowe, mb — mostku linii M. Do każdego filametu miozynowego dochodzi 6 mostków linii M.

odmienne ciężary cząsteczkowe i trudno je jednoznacznie sklasyfikować. I tak np. jedni uważają, że w skład linii M wchodzi dwa peptydy stwierdzone, po rozdiale elektroforetycznym w żelu poliakrylamidowym, tuż pod łańcuchami ciężkimi miozyny. Są to białka o ciężarach cząsteczkowych

195 000 i 180 000, oznaczane greckimi literami alfa i beta (36). Inni sądzą, że linia M zbudowana jest z trzech białek: jednego — o ciężarze cząsteczkowym 40 000 [według Wallimanna i wsp., (37) jest to kinaza kreatynowa], drugiego — o ciężarze cząsteczkowym 100 000 i trzeciego — o ciężarze cząsteczkowym 165 000. To ostatnie białko charakteryzuje się wyjątkowo silnym powinowactwem z miozyną i odpowiada prawdopodobnie peptydowi B Offera. Związane jest ono z cząsteczką miozyny nawet w wysokiej sile jonowej, w której sama miozyna występuje w postaci monomeru (34). Białko o ciężarze cząsteczkowym 100 000 ma zdolność tworzenia filamentów (38). Być może, ono to tworzy filanty linii M (Ryc. 2 i 3). Białko o ciężarze cząsteczkowym 40 000 tworzy dimery, które pod względem funkcjonalnym odpowiadają zapewne mostkom linii M (Ryc. 2).

Ostatnio uczeni japońscy wyizolowali z miofibryli nowe białko o ciężarze cząsteczkowym 50 000—białko I. Białko to związane jest silnie z prążkiem A sarkomeru, a jego funkcja polega na hamowaniu interakcji aktomiozynowej. Białko I być może jest białkiem regulującym związanym z filamentem miozynowym (41—43). O białkach regulujących (44) związanych z aktynowym filamentem napisano w *Postęпах Biochemii*.

II. Modele miozynowych filamentów

Oglądając w mikroskopie elektronowym obrazy izolowanych natywnych filamentów miozynowych, uzyskano dane pozwalające opisać bliżej ich strukturę. Długość natywnych filamentów waha się w granicach od 1,5 μ do 1,6 μ (45—47). Powierzchnia ich jest szorstka, pokryta wyrostkami z wyjątkiem zupełnie gładkiej części środkowej, tak zwanej gołej strefy (w angielskiej terminologii *bare zone*). Wspomniane wyrostki są globularnymi częściami cząsteczek miozynowych (główkami). Długość strefy środkowej wynosi około 1500—2000 Å, a średnica 130—150 Å. Średnica pozostałej części filamentu waha się w granicach 180—200 Å (45). Oczywiście, liczby te mogą być obciążone błędem, spowodowanym wpływem barwienia na zachowanie się główek, to znaczy na ich odsuwanie się bądź przysuwanie do powierzchni filamentu (48).

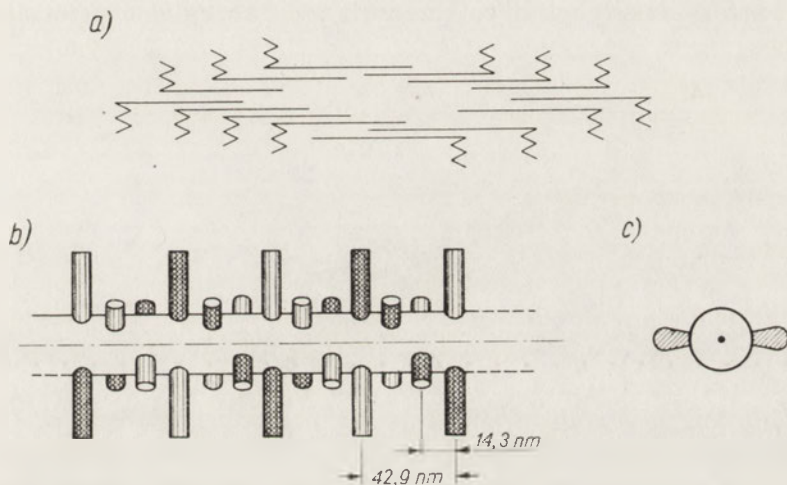
Zastosowanie sedymentowania filamentów na siatkę (stosowaną do oglądania preparatów w mikroskopie elektronowym) pozwoliło na określenie liczby włókienek przypadających na określoną objętość sedymentowanego roztworu. Wyniki obliczeń pokrywały się z wynikami uzyskanymi inną metodą, opartą na oznaczeniu stosunku liczby mostków poprzecznych do monomeru aktyny w miofibrylach; (mostki poprzeczne w angielskiej terminologii *cross-bridges*) są to wychylające się z filamentu zakończenia cząsteczek miozyny aktywne enzymatycznie i służące podczas skurczu mięśnia do wytwarzania połączeń z aktyną). Z uzyskanych wyników i znanego stężenia roztworu obliczono ciężar molekularny grubego filamentu. Wynosi on $204 \pm 11 \times 10^6$. Przyjmując ciężar cząsteczkowy miozyny za

470 000 i biorąc poprawkę na inne białka, wyliczono, iż w jednym grubym filamencie mięśnia szkieletowego występuje 445 ± 24 cząsteczki miozyny (35).

II-1. Model Huxleya

O podstawowej jednostce strukturalnej mięśnia szkieletowego — sarkomerze, pisano już na łamach *Postępów Biochemii* (49, 50). Pragnę tu tylko przypomnieć, że filamenty miozynowe stanowią tak zwany prążek A sarkomeru.

W przeciwieństwie do stosunkowo dobrze poznanej struktury aktynowego filamentu, budowa filamentu miozynowego stanowi nadal pasjonującą zagadkę.



Ryc. 4. Budowa filamentów według Huxleya (51).

a) schemat agregacji cząsteczek miozyny, b) rozmieszczenie mostków poprzecznych, c) przekrój poprzeczny w interpretacji Squire'a.

Słupkami zaznaczono mostki poprzeczne. Odległość pomiędzy kolejnymi poziomami na których znajdują się mostki wynosi 14,3 nm. Odległość między mostkami znajdującymi się w tej samej pozycji na walcu filamentu wynosi 42,9 nm.

Autorem pierwszego modelu ułożenia cząsteczek miozyny w filamencie jest H. E. Huxley (45, 51). Stosując technikę negatywowego barwienia obserwował on w mikroskopie elektronowym preparaty naturalnych i syntetycznych filamentów. Filamenty syntetyczne uzyskujemy przez obniżenie siły jonowej środowiska, w którym występuje monomeryczna miozyna z $\mu = 0,5$ M KCl do wartości fizjologicznej $\mu = 0,15$ M KCl. W konsekwencji Huxley doszedł do wniosku, że pałeczki cząsteczek miozyny stanowią trzon, a główki leżą na powierzchni filamentu, oraz że cząsteczki miozyny w filamencie ułożone są przeciwrównoległe w każdej połowie filamentu. W ten sposób w środku powstaje goła strefa bez główek na powierzchni.

W miejscu tym cząsteczki miozyny stykają się ze sobą ogonami, mając główki zwrócone ku przeciwnym końcom filamentu. Na pozostałej długości filamentu ogony jednostronnie skierowanych cząsteczek zachodzą dachówkowato za główki cząsteczek znajdujących się poza nimi (w angielskiej terminologii *region of overlap*) (Ryc. 4a). Ułożenie takie tłumaczy ostre zakończenie filamentów (Ryc. 5). Obserwując obrazy linii niskokątowej dyfrakcji promieni X na skrawkach mięśni wysnuto hipotezę (51, 52), że głowy miozyny leżą na powierzchni filamentu w określonym porządku, wyznaczającym spiralę o 430-angstromowym powtórzeniu i 143-angstromowej translacji, czyli odległości pomiędzy sąsiadującymi poziomami, na których znajdują się głowy (Ryc. 4b). Tak wygląda dwuspiralny (w terminologii angielskiej *two-stranded model*) huxleyowski model miozynowego filamentu, wskazujący, że na każdym poziomie spirali znajdują się dwie przeciwnie skierowane główki (Ryc. 4c), a miejsce następnej pary główek wyznaczone jest przez tory dwóch spirali zataczanych przez każdą głowę (rotacja 120°).



Ryc. 5. Gruby filament.

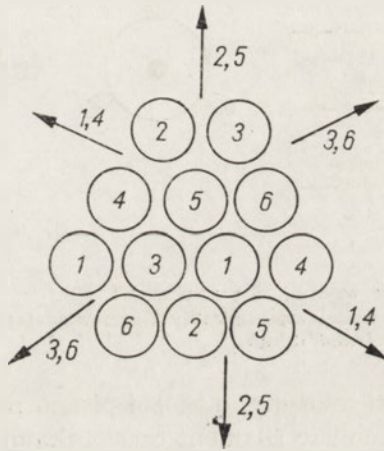
Powiększenie zdjęcia 99 000 x. Strzałka wskazuje gołą strefę. Zdjęcie wykonano w pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

W ten oto sposób sześć główek miozyny znajduje się na jednym skoku spirali. Z porównania ciężarów cząsteczkowych filamentu miozynowego, miozyny i ilości mostków poprzecznych przypadających na jeden filament (200—220) wyliczono, że na jeden mostek poprzeczny przypada 1 do 2 cząsteczek miozyny (51).

II-2. Model Pepe'a

Model konstrukcji filamentu Pepe'a (40, 53, 54) oparty jest głównie na badaniach immunochemicznych i cytochemicznych skrawków mięsni-

wych, obserwowanych w mikroskopie elektronowym. Uważa się, że cząsteczki miozyny uszeregowane są równoległe i zorientowane w każdej połowie filamentu w strony przeciwne. W strefie środkowej — to jest w strefie interakcji pałeczka-pałeczka — białka linii M stykają się z filamentami w sposób pokazany na rycinie 3, a różny od modelu zaproponowanego przez K n a p p i e s a i C a r l s e n a (39, Ryc. 2a). Linia M stanowi jak gdyby ruszt sieciujący filanty miozynowe^{*)}. W tej części filamentu agregaty cząsteczek ułożone są spiralnie, ponieważ obrazy przekrojów poprzecznych skrawków mięśniowych przez linię M mają kształt kół. Dalsze poprzeczne przekroje filamentu mają kształt trójkątny, co według Pepe'a świadczy o równoległym ułożeniu cząsteczek miozyny (Ryc. 4) i odpowiada innemu typowi agregacji miozynowej, a mianowicie typowi główka-pałeczka (Ryc. 4a). Tak więc, każda 860-angstromowa część cząsteczki, odmie-



Ryc. 6. Budowa filamentów według Pepe'a (53).

Przekrój poprzeczny. Kółka oznaczone liczbami przedstawiają liniowe agregaty miozyny, z których zbudowany jest każdy gruby filament mięśnia szkieletowego. Strzałki z cyframi oznaczają pary główek tworzące mostki poprzeczne.

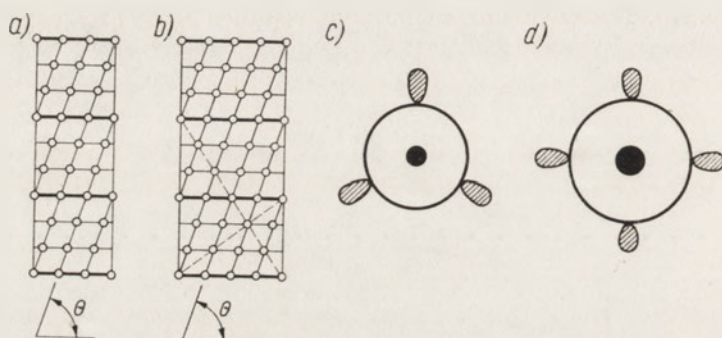
rzając od końca pałeczki-ogona, znajduje się w szkielecie filamentu, a 430-angstromowa część zachodzi na sąsiednią cząsteczkę (zjawisko zachodzenia stanowi przyczynę 430-angstromowych linii dyfrakcyjnych, obserwowanych przez Huxleya), zasłaniając jej część pałeczkowatą. Globularna reszta wychyla się z filamentu. Autor modelu uważa, że cząsteczki miozyny łączą się w liniowe agregaty. Filament zbudowany jest z 12 takich agregatów, równoległych do długiej osi filamentu (Ryc. 6). Agregaty te zgrupowane są w trzy zestawy po cztery rzędy cząsteczek. Dwie globularne części białka składają się na jeden mostek poprzeczny (strzałki na rycinie 6). W efek-

^{*)} Białkom linii M, jak również strukturom, które tworzą, poświęcony zostanie oddzielny artykuł.

cie na każdą 430-angstromową część filamentu przypada 6 mostków poprzecznych.

II-3. Model Squire'a

Squire (55—59) budując swój model starał się wykazać, iż schemat konstrukcji filamentów miozynowych jest właściwie identyczny w mięśniach szkieletowych i gładkich. A ściślej mówiąc, siatka — jaką tworzą głowy miozyny na powierzchni filamentów — ma taki sam rysunek (wyjątek stanowi gładka strefa, nie zaobserwowana dotąd w mięśniu gładkim). Podstawowymi przesłankami, na których oparł Squire swą hipotezę, by-



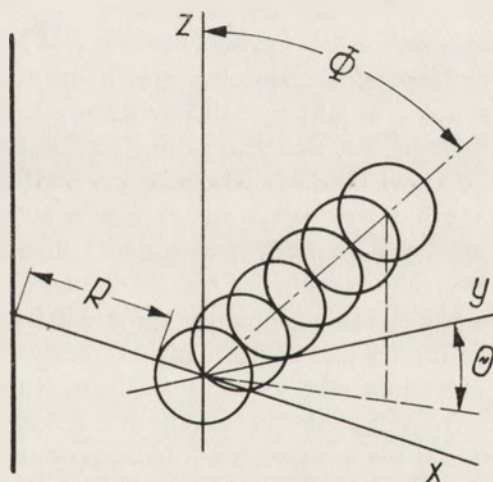
Ryc. 7. Budowa filamentów według Squire'a (57, 58).

a) model trójspiralny, b) model czterospiralny i odpowiadające im przekroje poprzeczne, c) dla trójspiralnego, d) dla czterospiralnego.

ły: — budowa cząsteczki miozyny, o której pisano powyżej, fakt, że odległość między upakowanymi w filament cząsteczkami wynosi 20 \AA (60) — i że odległość ta może wynosić 17 \AA w wypadku nie uwodnionych cząsteczek (61). Obserwacje syntetycznych agregatów lekkiej meromiozyny, agregatów LMM wraz z subfragmentem S_2 oraz agregatów całych cząsteczek miozynowych dostarczyły danych dotyczących długości zachodzenia pałeczek miozynowych na siebie. Dodatkową przesłanką dla Squire'a w wyjaśnianiu sposobu agregacji cząsteczek miozyny było powstawanie długich tubularnych struktur z lekkiej meromiozyny-C, uzyskanej drogą nieenzymatycznej hydrolizy bromocyjanem. Struktury te powstały w chlorku amonu (62). Pałeczki cząsteczek białka tworzącego tubulę, okręcają się wokół jej osi, przechodząc przez 6 kolejnych pozycji, będących względem siebie pod kątem 60° . Na każdym poziomie znajdują się dwie cząsteczki miozyny, a odległość między poziomami wynosi 143 \AA . Badając obraz dyfrakcyjny mięśnia, Squire zauważył pojawienie się dodatkowych refleksów, świadczących o tym, że główki miozyny mogą być odchylone od osi włókna o około 5° (Ryc. 6). Ponadto, w budowie swego modelu autor oparł się na wynikach uzyskanych w badaniach nad ugięciem promieni X (52) i z mi-

kroskopii elektronowej (45, 53, 54, 63), oraz na informacjach dotyczących ilości cząsteczek znajdujących się w filamencie (39).

Obrazy dyfrakcyjne filamentów miozynowych wskazują na 429-angstremową powtarzalność elementów struktury. Południkowe odbicie trzeciego rzędu obserwuje się w odległościach 143-angstremowych — odpowiadają one osiowej translacji podjednostek. Liczba cząsteczek miozyny w filamencie dała możliwość obliczenia, iż ilość cząsteczek przypadających na jedno 143-angstremowe przesunięcie wynosi trzy lub cztery (Ryc. 7a, b). Bardziej prawdopodobny, według Squire'a, jest model „trój-głównowy”, w których trzy globularne fragmenty cząsteczek znajdują się na powierzchni filamentu pod kątem 120° względem siebie. Każda z tych trzech głów rysuje na powierzchni filamentu własną spiralę o skoku równym $3 \times 429 \text{ \AA}$. W ten sposób na jeden obrót śruby przypada 9 główek miozynowych. Rycina 8 przedstawia względną pozycję dwóch główek w mostku poprzecznym. Wyliczono, że odległość mostka poprzecznego od osi filamentu wynosi $70\text{--}90 \text{ \AA}$ (R), a wartość kąta orientującego mostek w przestrzeni, mieści się w granicach $30\text{--}60^\circ$ (Φ). Dane te pokrywają się z wartościami uzyskanymi z wyliczeń z obrazów dyfrakcyjnych. Ponadto model



Ryc. 8. Kąt ustawienia w przestrzeni mostka poprzecznego w stosunku do osi filamentu.

R — odległość główki od osi filamentu, Φ — kąt odchylenia mostka poprzecznego od osi filamentu, x, y, z — współrzędne.

Squire'a zakłada takie upakowanie pałeczek miozyny, przy którym konieczna jest obecność rdzenia o średnicy $30\text{--}40 \text{ \AA}$ (Ryc. 7c, d), ale nie wiadomo jeszcze jakiego rodzaju miałby on być.

W bardzo ogólnym zarysie tak przedstawiają się modele filamentu miozynowego z mięśnia szkieletowego kręgowców. Wynikają one w gruncie rzeczy z różnej interpretacji danych doświadczalnych. Kto ma rację, trud-

no dziś jeszcze orzec. Każdy dzień przynosi nowe fakty rodzące nowe pytania, które, być może, doczekają się szybkiej odpowiedzi. Nie wiadomo na przykład, w jaki sposób wyjaśnić występowanie ośmiu przerw w rozmieszczeniu mostków poprzecznych po obu stronach linii M i na obu końcach filamentu. Przerwy te obserwował Squire, Pepe ich nie zauważył, a Craig i Offer zanotowali obecność tylko dwóch przerw na obu końcach filamentu (64).

III. Syntetyczne filamenty

Porównanie budowy syntetycznych filamentów z natywnymi i obserwacje dotyczące powstawania syntetycznych filamentów służą dokładnemu poznaniu struktury grubego filamentu.

Pierwsze badania dotyczące porównania struktury filamentów syntetycznych i naturalnych wiążą się z nazwiskiem Huxleya (45). Stosując mikroskopię elektronową do oglądania preparatów utrwalonych formaldehydem lub aldehydem glutarowym i następnie barwionych octanem uranylu Huxley zaobserwował różnice w długości filamentów. Filamenty syntetyczne były znacznie dłuższe od naturalnych, a znajdujące się na ich powierzchni wyrostki były rozmieszczone nieregularnie. Na kształt wyrostków wpływa utrwalanie i barwienie preparatów (45, 48). Szerokość filamentów, zarówno natywnych jak i syntetycznych jest stała i utrzymywana przez mechanizm mający jakiś związek z główkami miozyny (47, 65, 66). Zastanawiający jest fakt, w jaki sposób powstaje tak sztywna struktura, jaką jest filament miozynowy. Badacze zajmujący się tym problemem (47, 65—67) są zdania, że zjawisko dachówkowego nachodzenia na siebie pałeczek miozynowych może w pewien sposób wyjaśniać sztywność filamentów.

Badano wpływ szeregu czynników na ustalenie się długości filamentów. Stwierdzono, iż w wypadku szybkiego rozcieńczenia, a więc gwałtownego obniżania siły jonowej, powstają filamente krótkie ($0,5 \mu$), ponieważ w tych warunkach zmiana stężenia jest szybsza niż prędkość agregacji. W miarę wydłużania czasu obniżania siły jonowej (dializa), długość powstających filamentów wzrasta. W przypadku szybkiego rozcieńczenia stężenie jonów wodorowych środowiska nie wpływa na długość powstających filamentów. Podczas gdy w toku dializy obserwuje się najdłuższe filamente, przy pH 7. Niektórzy autorzy (68) reprezentują pogląd, że długość filamentów może być nieograniczona, a świeże preparaty miozyny zawierają czynnik wzrostu, który zanika w miarę starzenia się białka. Miozyna pozbawiona metodą Weedsa łańcucha DTNB tworzyła filamente bardzo krótkie ($0,15$ — $0,20 \mu$), dodanie z powrotem tego łańcucha powodowało wzrost filamentów ($0,50$ — $1,0 \mu\text{m}$) (68). Warto zauważyć, iż filamente otrzymywane z miozyny oczyszczonej na kolumnie i pozbawionej łańcucha DTNB (14) nie posiadały w ogóle gołej strefy (69). Ostatnio preparaty filamentów z kilkoma gołymi strefami uzyskał Hayaishi, ale nie wyjaśnił jeszcze przyczyn tego zjawiska (70)

Interesującą sprawą jest różnorodność kształtów filamentów. Niektórzy autorzy (71) uważają, że utrata białka C powoduje stępienie końców filamentów z jednoczesnym rozszerzeniem samych filamentów. Ponieważ odizolowanie białka C od miozyny następowało z równoczesnym usunięciem łańcucha DTNB (14), a polimeryzacja miozyny z dodanym uprzednio białkiem C nie doprowadziła do zwężenia filamentów (68), nasuwa się wniosek, że łańcuch DTNB odgrywa rolę w mechanizmie powstawania filamentów. Usuając wyłącznie ten łańcuch z cząsteczki miozyny, uzyskaliśmy w naszej pracowni filamenty miozynowe znacznie szersze od natywnych i o bardziej rozluźnionej strukturze (72). W obecnej chwili nie jesteśmy jeszcze w stanie dokładnie wytłumaczyć faktu rozluźniania się struktury, być może, ma on związek ze zmianami konformacji cząsteczki po usunięciu łańcucha DTNB.

I choć wiedza ludzka poczyniła ogromne postępy, mając do dyspozycji wspaniałą aparaturę i wprost nieograniczone środki materialne, to jak dotąd nie rozumiemy wielu mechanizmów ruchu. A przecież badaniu zjawisk ruchu poświęca się człowiek od wieków. „To, co stawia opór, musi być różne do tego, co się porusza; i to tak, aby całość pierwszego była różna od całości drugiego, a rzecz w ten sposób nieruchoma nie stanowiła żadnej rzeczy poruszanej; w przeciwnym razie rzecz się wcale nie poruszy”. „...dlatego ilekroć się zdarzy, że jedna z rzeczy (które się spotykają) jest czynna, a druga bierna, a skądinąd żadnej z nich nie brakuje nic ze swych istotnych właściwości, natychmiast jedna rzecz wywiera wpływ, a druga go odbiera” (Arystoteles 384—322 p.n.e.).

Pani doc. dr hab. Irenie Kąkol pragnę wyrazić swoją wdzięczność i podziękowanie za pomoc i cenne rady merytoryczne udzielone mi przy opracowywaniu powyższego artykułu.

Artykuł otrzymano 31.5.1977; po rewizji autorskiej otrzymano 14.9.1977

PIŚMIENNICTWO

1. Gershman L. C., Stracher A., Dreizen P., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 2428—2436.
2. Cohen C., Lowey S., Harrison R. G., Kendrick-Jones J., Szent-Györgyi A. G., (1970), *J. Mol. Biol.*, **47**, 605—609.
3. Harrison R. G., Lowey S., Cohen C., (1971), *J. Mol. Biol.*, **519**, 531—535.
4. Morel J. E., Pinset-Härström J., (1975), *Biomedicine* **22**, 88—96.
5. Lehninger A. L., (1971), *Biochemistry*, Worth Publishers Inc. New York.
6. Moor P. B., Huxley H. E., De-Rosier D., (1971), *J. Mol. Biol.*, **50**, 279—295.
7. Lowey S., Slayter H. S., Weeds A. G., Baker H., (1969), *J. Mol. Biol.*, **42**, 1—29.
8. Cohen C., Szent-Györgyi A. G., (1958), *Intern. Congres Biochem.*, t. 3, str. 108—118, Vienna.

9. Gergely J., (1950), *Fed. Proc.*, **9**, 176.
10. Mueller H., Perry S. V., (1961), *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 599—601.
11. Perry S. V., (1967), *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, t. 17, Pergamon Press, Oxford.
12. Sarkar S., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 14—17.
13. Weeds A. G., Pope B., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 129—157.
14. Kasman K., Kąkol I., (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **491**, 509—514.
15. Margossian S. S., Lowey S., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 301—311.
16. Holt J. C., Lowey S. (1975), *Biochemistry* **14**, 4609—4614.
17. Alexis M. N., Gratzner B., (1976) *FEBS Letters* **67**, 119—121.
18. Tonomura Y., (1972), *Muscle Protein, Muscle Contraction and Cation Transport*, University of Tokyo Press, Tokyo.
19. Hayasi Y., (1972), *J. Biochem.*, **72**, 93—100.
20. Kanazawa T., Tonomura Y., (1965), *J. Biochem.*, **57**, 604—615.
21. Lynn R. W., Taylor E. W., (1970), *Biochemistry* **9**, 2975—2983.
22. Morita F., (1971), *J. Biochem.*, **69**, 517—524.
23. Yazawa M., Morita F., Yagi K., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 1107—1117
24. Hozumi T., Tawada K., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* **347**, 469—482.
25. Tanigucki S., Tawada K., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 853—860.
26. Inoue A., Tonomura Y., (1976), *J. Biochem.*, **79**, 419—434.
27. Starr R., Offer G., (1971), *FEBS Letters* **15**, 40—44.
28. Offer G., Moos C., Starr R., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 653—676.
29. Pepe F. A., Drucker B., (1975), *J. Mol. Biol.*, **99**, 609—617.
30. Offer G., (1976), *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **192**, 439—449.
31. Craig R., Offer G., (1976), *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **192**, 451—461.
32. Moos C., Offer G., Starr R., Bennett P., (1975), *J. Mol. Biol.*, **97**, 1—9.
33. Offer G., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 87—93.
34. D'Albis A., (1975), *FEBS Letters* **58**, 241—244.
35. Morimoto K., Harrington W. F., (1974), *J. Mol. Biol.*, **83**, 83—97.
36. Porzio M. A., Pearson A. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta* **490**, 27—34.
37. Walliman T., Turner D. C., Eppenberger H. M., (1975), *Proc. Ninth. FEBS Meeting, Budapest*, 119—124.
38. Eaton B. L., Pepe F. A., (1972), *J. Cell. Biol.*, **55**, 681—695.
39. Knappeis G. G., Carlsen F., (1968), *J. Cell. Biol.*, **38**, 202—211.
40. Pepe F. A., (1975), *J. Hist. Cyt.*, **23**, 543—562.
41. Ohashi K., Kimura S., Deguchi K., Maruyama K., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 233—236.
42. Ohashi K., Masaki T., Maruyama K., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 237—242.
43. Maruyama K., Kunitomo S., Kimura S., Ohashi K., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 243—247.
44. Dąbrowska R., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 467—481.
45. Huxley H. E., (1963), *J. Mol. Biol.*, **7**, 281—308.
46. Page S., Huxley H. E., (1963), *J. Cell. Biol.*, **19**, 369—390.
47. Katsura J., Noda H., (1973), *Advances in Biophysics* **5**, 177—202.
48. Pinset-Härström I., Trufy J., (1976), nie publikowano.
49. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 405—420.
50. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 343—359.
51. Huxley H. E., (1969), *Science* **164**, 1356—1366.
52. Huxley H. E., Brown W., (1967), *J. Mol. Biol.*, **30**, 383—434.
53. Pepe F. A., (1967), *J. Mol. Biol.*, **27**, 203—205.
54. Pepe F. A., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 97—108.
55. Squire J. M., (1975), *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 137—163.

56. Squire J. M., (1971), *Nature* **233**, 457—502.
57. Tregear R. T., Squire J. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 279—290
58. Squire J. M., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 291—323.
59. Sjöström M., Squire J. M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **109**, 49—68.
60. Elliot A., Lowy J., Squire J. M., (1968), *Nature* **219**, 1224—1226.
61. Parry J. D. A. D., (1968), *Nature* **218**, 656—659.
62. Young M., King M. V., O'Hara D. S., Molberg P. J., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 65—76.
63. Pepe F. A., Drucker B., (1972), *J. Cell. Biol.*, **52**, 255—260.
64. Craig R., Offer G., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 325—332.
65. Katsura J., Noda H., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 245—256.
66. Katsura J., Noda H., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 257—268.
67. Burke M., Barton J. S., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 77—85.
68. Pinset-Härström I., Morel J. E., (1975), *Proc. Ninth FEBS Meeting Budapest 193—203*.
69. Eaton B., Pepe F. A., (1974), *J. Mol. Biol.*, **82**, 421—423.
70. Hayashi T., Robert B., Silver-Wallace I p., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 159—171.
71. Moos C., (1972), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **37**, 93—95.
72. Kasman K., Kąkol I., (1976), *Streszczenia Komunikatów, 14 Zjazd PTBioch., Lublin*, 105—106.

KOMUNIKAT

The XIth International Congress of Biochemistry will be held in Toronto, Canada, July 8-14, 1979. It is being hosted by the Canadian Biochemical Society and sponsored by the International Union of Biochemistry.

The scientific program will reflect the current state of the most rapidly developing fields of biochemistry in 1979. Papers will be presented at symposium sessions by invited speakers. Submitted papers will be accepted for presentation in the form of posters. Symposia and poster sessions will be devoted to each of the following 13 topics.

- 1) Structure, organization and replication of genetic elements.
- 2) Genetic expression and its regulation.
- 3) Structure and function of proteins.
- 4) Mechanism and regulation of enzyme action.
- 5) Membrane structure and function.
- 6) Bioenergetics and transport.
- 7) Biochemistry of growth and differentiation.
- 8) Biochemical aspects of immunology.
- 9) Neurochemistry.
- 10) Biochemistry of sensory, contractile and motile systems.
- 11) Hormones: biochemistry and molecular mechanisms of action.
- 12) Molecular mechanisms of disease.
- 13) Environmental biochemistry.

For additional information please contact:

Ken Charbonneau
Executive Secretary,
XIth International Congress of Biochemistry,
c/o National Research Council of Canada,
Ottawa, Ontario, Canada KIA OR6

MAŁGORZATA MANTEUFFEL-CYMBOROWSKA *)

Biochemiczne podstawy cytotoksycznego działania ametoptyeryny

Biochemistry of Cytotoxicity of Amethopterin

Spis treści

- I. Wprowadzenie
- II. Miejsca działania ametoptyeryny w komórce
 - II-1. Reduktaza dihydrofolianowa jako główny enzym docelowy
 - II-1.1. Zahamowaniu redukcji dihydrofolianu w komórce a efekt toksyczny ametoptyeryny
 - II-1.2. Rola „wolnej” ametoptyeryny w komórce
 - II-2. Inne niż reduktaza dihydrofolianowa miejsca działania ametoptyeryny w komórce
- III. Podłoże biochemiczne śmierci komórek traktowanych ametoptyeryną
 - III-1. Niedobór tymidylanu a niedobór puryn
 - III-1.1. Różnice wrażliwości komórek różnych linii
 - III-1.2. Wrażliwość na tempo proliferacji komórek
 - III-1.3. Rola N⁵⁻¹⁰-metylenotetrahydrofolianu jako substratu w syntezie tymidylanu i puryn
 - III-2. Zaburzenia syntezy białek mitochondrialnych
- IV. Oporność komórek na ametoptyerynę
 - IV-1. Biochemiczne podłoże oporności
 - IV-2. Oporność wrodzona i oporność nabyta
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Sites of action of amethopterin in the cell
 - II-1. Dihydrofolate reductase as a main target enzyme

*) Dr, Zakład Biochemii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, 02-093 Warszawa, Pasteura 3.

Wykaz stosowanych skrótów: C₁ — jednostki jednowęglowe; H₂PteGlu — dihydrofolian; H₄PteGlu — tetrahydrofolian; N¹⁰-formyloH₄PteGlu — N¹⁰-formylotetrahydrofolian; N⁵⁻¹⁰metenyloH₄PteGlu — N⁵⁻¹⁰-metenylo-tetrahydrofolian; N⁵⁻¹⁰metylenoH₄PteGlu — N⁵⁻¹⁰-metylenotetrahydrofolian; N⁵-metyloH₄PteGlu — N⁵-metylotetrahydrofolian; FUDr — 5-fluorodezoksyurydyna; fMet-tRNA^{Met} — formylometionylo-tRNA; Met-tRNA^{Met} — metionylo-tRNA.

- II-1.1. Inhibition of dihydrofolate reductase in the cell and toxic effect of amethopterin
- II-1.2. The role of free amethopterin in the cell
- II-2. Others than dihydrofolate reductase sites of action of amethopterin in the cell
- III. Biochemical basis of cell death after treatment with amethopterin
 - III-1. Thymineless or purineless death
 - III-1.1. Differentiated sensitivity of cells
 - III-1.2. Cells sensitivity and their proliferation rate
 - III-1.3. The role of methyltetrahydrofolate as a substrate for dTMP and purines synthesis
 - III-2. Disturbances in the synthesis of mitochondrial proteins
- IV. Resistance to amethopterin
 - IV-1. Biochemical basis of cell resistance
 - IV-2. Intrinsic and acquired resistance
- V. Concluding remarks

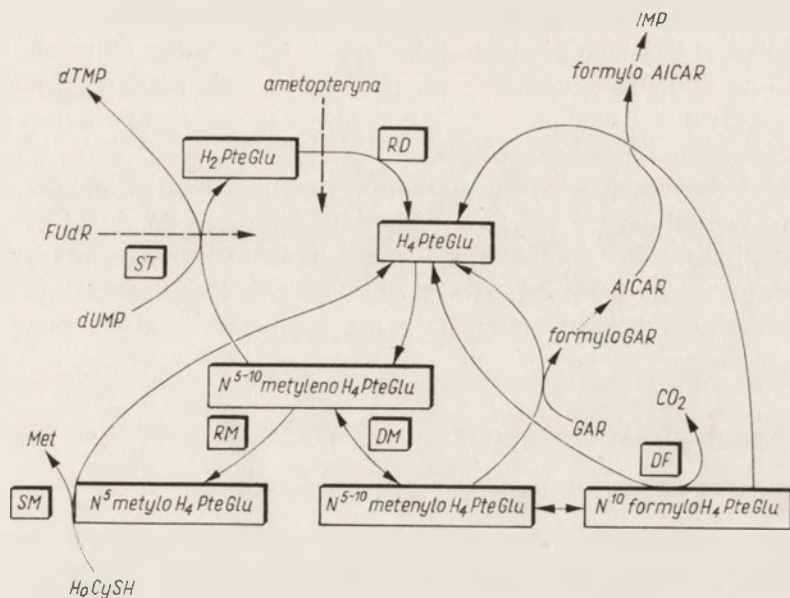
I. Wprowadzenie

Wkrótce minie trzydzieści lat od chwili kiedy po raz pierwszy doniesiono o zastosowaniu 4-amino-analogu kwasu foliowego — aminopteryny w terapii choroby nowotworowej (1). Niebawem okazało się, że efektywniej niż aminopteryna działa jej N¹⁰-metylowa pochodna — ametoptyryna (Methotrexate, MTX). Od tego czasu związek ten jest stosowany z mniejszym lub większym powodzeniem jako chemioterapeutyk w chorobach nowotworowych, takich, jak różnego rodzaju białaczki, raki i mięsaki (2). Od dokładnego poznania mechanizmu działania ametoptyryny zależy rozszerzenie spektrum działania tego użytecznego leku, co jest równoznaczne ze zwiększeniem jego terapeutycznej przydatności.

Ametoptyryna, znana przede wszystkim jako silny inhibitor reduktazy dihydrofolianowej pośrednio hamujący redukcję folianu i dihydrofolianu do tetrahydrofolianu, wywiera wpływ na tak ważne procesy metaboliczne w komórce jak biosynteza kwasów nukleinowych, białek, a nawet na metabolizm lipidów i cukrowców (przegląd piśmiennictwa wg 3). Powszechnie przyjęta hipoteza o jednym miejscu działania ametoptyryny postulowała, że cytotoksyczny efekt tego związku jest wyłącznie następstwem hamowania reduktazy dihydrofolianowej, a zatem zahamowania regeneracji tetrahydrofolianu z dihydrofolianu powstającego w czasie przemiany dUMP w dTMP (Schemat 1).

Rola tetrahydrofolianu w komórce polega na przenoszeniu jednostek jednowęglowych C₁*)^{*}, których donorami są formiminoglutaminian powstający w czasie rozkładu histydyny, seryna oraz mrówczan powstającego między innymi z glicyny.

*) Porównaj artykuł przeglądowy (5).



Schemat 1. Reakcje katalizowane przez koenzymy tetrahydrofolianowe i ich powiązanie z metabolizmem komórkowym (44, zmodyfikowany).

Skróty: *ST* — syntetaza tymidylnowa; *RD* — reduktaza dihydrofolianowa; *SM* — syntetaza metioninowa; *DF* — dehydrogenaza formylo-tetrahydrofolianu; *DM* — dehydrogenaza metyleno-tetrahydrofolianu; *RM* — reduktaza metyleno-tetrahydrofolianu; *GAR* — rybotyd glicynoamidu; *AICAR* — rybotyd 5'-amino-4-imidazolokarboksyamidu; *IMP* — inozynomonofosforan; *dUMP* — dezoksyurydynomonofosforan; *dTMP* — dezoksytymidynomonofosforan.

Jednostki C_1 o różnym stopniu utlenienia, połączone z tetrahydrofolianem, stanowią wewnątrzkomórkową pulę koenzymów tetrahydrofolianowych. Biorą one udział w syntezie puryn (N^{5-10} -metenilo- i N^{10} -formylo-tetrahydrofolian), w syntezie tymidylnu (N^{5-10} -metyleno-tetrahydrofolian), w formylacji metionilo-tRNA (N^{10} -formylo-tetrahydrofolian), oraz w syntezie metioniny (N^5 -metylo-tetrahydrofolian) (4, 5). W powyższych reakcjach biosyntetycznych uwalniany zostaje tetrahydrofolian, co jest bardzo istotne ze względu na niski jego poziom w komórce. Brak wolnego tetrahydrofolianu obserwowany między innymi przy diecie ubogiej w folian i kobalaminę powoduje zaburzenia w normalnym metabolizmie seryny, histydyny i mrówczanu.

Przy nadmiarze jednostek jednowęglowych może następować również na drodze enzymatycznej uwalnianie tetrahydrofolianu z formylo-tetrahydrofolianu z równoczesnym odłączeniem CO_2 . Szybkość tej przemiany zależy od stężenia metioniny (6) i wolnego tetrahydrofolianu (7).

Zahamowanie powstawania tetrahydrofolianu na poziomie reduktazy dihydrofolianowej przez ametoptyrynę drastycznie obniża jego wewnątrzkomórkowe stężenie, prowadząc do częściowej lub całkowitej inhibicji tych wszystkich reakcji, w których biorą udział czynne koenzymatycznie formy tetrahydrofolianu, a zwłaszcza inhibicji syntezy grupy metylowej

dTMP. Do przebiegu tej reakcji niezbędny jest bowiem metylenotetrahydrofolian w ilościach nie koenzymatycznych, ale substratowych. Śmierć komórki po podaniu ametoptyny, jak uważano do niedawna, następuje głównie na skutek niedoboru dTMP prowadzącego do upośledzenia syntezy DNA.

Wyniki dotyczące wpływu ametoptyny na komórki ssaków, przedstawione w niniejszym artykule, skłaniają jednakże do dużej ostrożności w przyjmowaniu wspomnianego modelu działania ametoptyny. Jak się wydaje mechanizm cytotoksycznego efektu wywieranego przez ten antymetabolit jest bardziej złożony niż by to wynikało z powyższego modelu.

II. Miejsca działania ametoptyny w komórce *)

II-1. Reduktaza dihydrofolianowa jako główny enzym docelowy

Reduktaza dihydrofolianowa dzięki swemu wysokiemu powinowactwu do ametoptyny uważana jest powszechnie za enzym docelowy (target enzyme) tego antyfolianu, a jej hamowanie przez ametoptynę zarówno *in vitro* jak i *in vivo* jest dziś obszernie udokumentowane (przegląd literatury według 3). Równocześnie jednak dysponujemy danymi sugerującymi, że w niektórych organizmach ametoptyna zastosowana nawet w wysokich stężeniach nie całkowicie hamuje reduktazę dihydrofolianową lub też hamuje jedynie redukcję folianu, przy nieupośledzonej redukcji dihydrofolianu (9, 10).

II-1.1. Zahamowanie redukcji dihydrofolianu w komórce a efekt toksyczny ametoptyny

Wyniki wielu badań wskazywały, że działanie ametoptyny przejawia się w zahamowaniu redukcji dihydrofolianu do tetrahydrofolianu. Można zatem było sądzić, że w komórkach hodowanych w obecności ametoptyny nagromadzać się będzie dihydrofolian. Nie wykazano jednak takiego nagromadzenia dihydrofolianu w komórkach chomika chińskiego pozostających w kontakcie z ametoptyną przez dobę. Chromatograficzny obraz zredukowanych pochodnych folianowych był jednakowy w komórkach z hodowli kontrolnych i traktowanych ametoptyną (11).

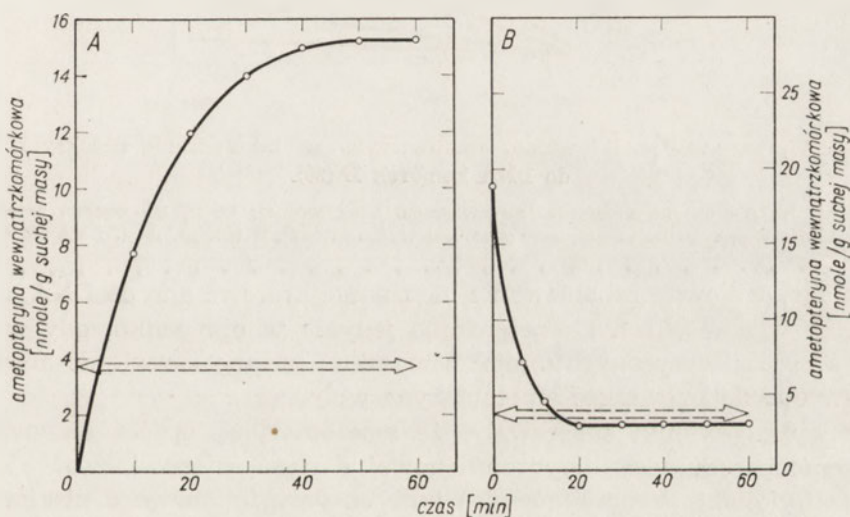
Na nierównoległy przebieg dwóch zjawisk — zahamowania przez ametoptynę reduktazy dihydrofolianowej i inkorporacji dezoksyurydyny do DNA — wskazują badania, do których użyto komórek trzech linii leukemicznych izolowanych z myszy traktowanych uprzednio ametoptyną (12). Jak stwierdzono, pomimo całkowitej inhibicji aktywności reduktazy dihydrofolianowej, stopień inkorporacji dezoksyurydyny przez ko-

*) Porównaj artykuł Grzelakowska-Sztabert B. (1977), Metabolizm aminoanalogów folianu, *Post. Biochem.* 23, 559—575.

mórki wyizolowane z myszy doświadczalnych, był tylko nieznacznie niższy niż w przypadku komórek z myszy kontrolnych, którym nie podawano ametoptyryny.

II-1.2. Rola „wolnej” ametoptyryny w komórce

Proces pobierania ametoptyryny przez komórki był przedmiotem licznych, dokładnych badań (13—18). Stwierdzono, że zachodzi on na drodze aktywnego transportu przy udziale białkowego przenośnika, który czynny jest najprawdopodobniej również w transporcie innych antyfolianów oraz koenzymatycznych form tetrahydrofolianu (13—18). Wnikająca do komórki ametoptyryna wiąże się silnie z reduktazą dihydrofolianową, która — jak potwierdziły to ostatnie badania — wydaje się być jedynym białkiem w komórce o tak wysokim powinowactwie do tego antyfolianu (19). Po wysyceniu reduktazy dihydrofolianowej pobieranie ametoptyryny przez komórkę zachodzi dalej ze zmniejszoną szybkością, aż do osiągnięcia stanu równowagi (Ryc. 1A). Jeśli komórki przeniesie

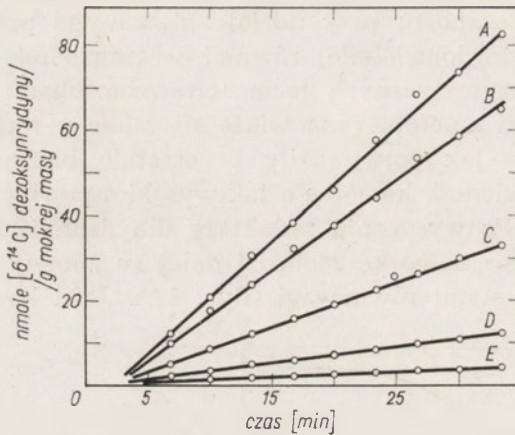


Ryc. 1. Pobieranie (A) i wpływ (B) ametoptyryny z komórek L1210 badany w 37°C (17).

(A) — stężenie zewnątrzkomórkowe ametoptyryny wynosiło 2,2 μM . (B) — komórki inkubowano z ametoptyryną przez 20 min, przemywano i zawieszano w pożywce niezawierającej antyfolianu. Strzałką przerywaną zaznaczono poziom reduktazy dihydrofolianowej w badanych komórkach.

się następnie do środowiska nie zawierającego ametoptyryny obserwuje się stopniowy spadek wewnątrzkomórkowego jej stężenia aż do osiągnięcia poziomu równego stężeniu reduktazy dihydrofolianowej (Ryc. 1B). Ametoptyrynę związaną silnie z reduktazą dihydrofolianową określa się jako ametoptyrynę „związaną” lub „niewymienialną” (*bound, nonexchangeable*) w przeciwieństwie do ametoptyryny wypływającej z komórki nazywanej „wolną” lub „wymienialną” (*free, exchangeable*).

Jak stwierdzono inkorporacja dezoksyurydyny do DNA badana *in vitro* w komórkach L uległa całkowitemu zahamowaniu tylko wówczas, jeśli oprócz ametoptyeryny związanej z reduktazą dihydrofolianową obecna była w komórce ametoptyeryna wolna (20, Ryc. 2). Stopień inhibicji syntezy DNA zależał od wewnątrzkomórkowego stężenia wolnej ametoptyeryny, a przy jej braku wynosił 27⁰/o.



Ryc. 2. Wpływ związanej i wolnej ametoptyeryny na inkorporację dezoksyurydyny do DNA komórek L (20).

A — kontrola; B — obecna ametoptyeryna związana, brak wolnej; C, D, E — obecna ametoptyeryna związana, stężenie ametoptyeryny wolnej wynosiło 0,12 μM (C), 0,6 μM (D), 6,0 μM (E).

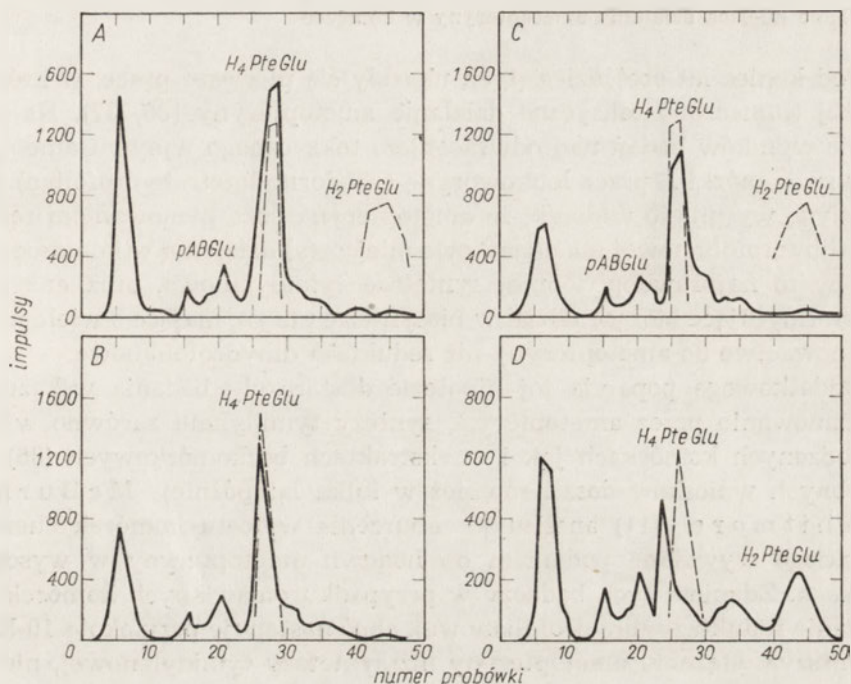
Podobnie, całkowite zahamowanie inkorporacji mrówczanu do DNA, RNA i białek w komórkach L stwierdzono jedynie w przypadku, gdy w komórce oprócz wysyconych miejsc o wysokim powinowactwie do ametoptyeryny obecna była także ametoptyeryna wolna (21).

Powyższe wyniki sugerowały, że ametoptyeryna, oprócz hamowania w komórce reduktazy dihydrofolianowej o wysokim powinowactwie do tego antyfolianu, hamuje również inne enzymy folianowe o niskim powinowactwie takie jak np. syntetazę tymidylanową, czy drugą formę molekularną reduktazy dihydrofolianowej^{*)} (20, 21).

Jak stwierdzono jednak ostatnio, redukcja dihydrofolianu do tetrahydrofolianu (w przeciwieństwie do redukcji folianu) nie ulegała zaburzeniu w komórkach raka Ehrlicha w obecności związanej ametoptyeryny przy jednoczesnym braku ametoptyeryny wolnej (31, Ryc. 3). Wydaje się więc, że aby zinterpretować otrzymane wyniki badań (20, 21, 31) nie koniecznie należy przyjąć oddziaływanie w badanych komórkach ametoptyeryny z enzymami o niskim powinowactwie. Wyniki te dają się bowiem wy-

^{*)} W komórkach ssaków i bakterii obserwuje się częstokroć występowanie reduktazy dihydrofolianowej w dwu lub więcej formach (*multiple forms*) różniących się niekiedy powinowactwem do ametoptyeryny (22—30).

tłumaczyć na podstawie interakcji pomiędzy ametopteryną a formą reduktazy dihydrofolianowej o wysokim powinowactwie do tego antyfolianu. Wiadomo, że przy niskim pH hamowanie reduktazy dihydrofolianowej przez ametopterynę należy do typu pseudoniedwracalnego (stoichio-



Ryc. 3. Wpływ związanej i wolnej ametoptyryny na przemiany [³H]dihydrofolianu w komórkach raka Ehrlicha (31).

A — kontrola; B — obecna ametoptyryna związana, brak wolnej; C, D — obecna ametoptyryna związana i wolna, stężenie ametoptyryny wolnej wynosiło 0,05 μM (C) i 10 μM (D). Komórki inkubowano z 10 μM [³H]dihydrofolianem przez 15 min, następnie sonifikowano je i ekstrakt nanoszono na kolumnę z DEAE-celulozy razem z wzorcowymi nieradioaktywnymi związkami (---).

metrycznego) (32, 33). Natomiast w fizjologicznym zakresie pH powinowactwo inhibitora do enzymu obniża się stając się zależne od stężenia substratu — dihydrofolianu. Tym samym pewna ilość wolnego antyfolianu jest niezbędna do utrzymania w stanie wysyconym całej reduktazy dihydrofolianowej znajdującej się w komórce. Krytyczna ilość reduktazy dihydrofolianowej, przy której komórka funkcjonuje normalnie, jest bardzo niska. Według obliczeń Jacksona i Harrapa (34) 5% ogólnej aktywności reduktazy dihydrofolianowej wystarcza aby utrzymać w niezaburzonym stanie wzrost komórek L1210. W komórkach L synteza tetrahydrofolianu utrzymuje się na normalnym poziomie nawet przy aktywności reduktazy dihydrofolianowej sięgającej tylko 2% normalnego jej poziomu (31) (porównaj rozdział II-2). Tak więc całkowite

zahamowanie syntezy tetrahydrofolianu można osiągnąć w tych komórkach tylko w przypadku wysokiego wewnątrzkomórkowego poziomu wolnej ametoptyeryny, stanowiącej 80% ogólnej zawartości ametoptyeryny w komórce (35).

II-2. Inne miejsca działania ametoptyeryny w komórce

Pod koniec lat sześćdziesiątych ukazały się pierwsze prace, w których inaczej tłumaczono toksyczne działanie ametoptyeryny (36, 37). Na podstawie wyników badań nad odwracaniem toksycznego wpływu ametoptyeryny na komórki L przez leukoworynę (N^{10} -formylotetrahydrofolian) oraz tymidynę wysunięto wniosek, że ametoptyeryna poza hamowaniem reduktazy dihydrofolianowej ma dodatkowe miejsce(a) działania w komórce (37). Byłyby to najprawdopodobniej syntetaza tymidylanowa, oraz enzym(y) transformylujące biorące udział w biosyntezie puryn, mające o wiele niższe powinowactwo do ametoptyeryny niż reduktaza dihydrofolianowa.

Dodatkowego poparcia tej hipotezie dostarczyły badania wskazujące na hamowanie przez ametoptyerynę syntezy tymidylanu zarówno w nieuszkodzonych komórkach jak i w ekstraktach bezkomórkowych (36). Do podobnych wniosków doszli również w kilka lat później Mc Burney i Whitmore (11) analizując zaburzenia wzrostu komórek chomika chińskiego wywołane podaniem do hodowli ametoptyeryny w wysokich dawkach. Zdaniem tych badaczy w przypadku omawianych komórek hamowanie reduktazy dihydrofolianowej, choć następuje przy około 10-krotnie niższym stężeniu ametoptyeryny niż syntetazy tymidylanowej, nie ma jednak znaczenia biologicznego, ponieważ komórki te zawierają pulę pochodnych tetrahydrofolianu wystarczającą na przeżycie 48 godzin. Obserwowany toksyczny wpływ ametoptyeryny wydaje się być zatem wynikiem bezpośredniego zahamowania syntetazy tymidylanowej, oraz wspomnianego już enzymu lub enzym(ów) biorących udział w syntezie puryn (11).

Udział bezpośredniego zahamowania syntetazy tymidylanowej w toksycznym działaniu ametoptyeryny został ostatnio dokładnie przedyskutowany (38). Powinowactwo tego enzymu do ametoptyeryny jest o wiele niższe niż reduktazy dihydrofolianowej. I tak np. w przypadku komórek L1210 K_i reduktazy dihydrofolianowej wynosi 6.7×10^{-11} M, podczas gdy syntetazy tymidylanowej — 1.5×10^{-5} M (39). Z drugiej jednak strony V_{max} syntetazy tymidylanowej jest o wiele niższa niż reduktazy dihydrofolianowej, co pozwala przypuszczać, że w obecności ametoptyeryny w wysokich stężeniach, w pewnych przypadkach, enzymem ograniczającym wzrost komórek będzie właśnie syntetaza tymidylanowa (38).

Biorąc pod uwagę znane parametry kinetyczne enzymów folianowych w komórkach W1-L2 Niethammer i Jackson (38) przeprowadzili następujące obliczenia. Aby zmniejszyć do połowy V_{max} reduktazy

dihydrofolianowej, której stężenie w komórce wynosi około $0,19 \mu\text{M}$, trzeba enzym ten zahamować w $95,45\%$, co następuje przy ogólnym stężeniu ametoptyeryny w komórce równym $0,226 \mu\text{M}$. W tych warunkach stężenie wolnej ametoptyeryny wynosić będzie $0,044 \mu\text{M}$. Ametoptyeryna w tym stężeniu jedynie nieznacznie hamuje syntetazę tymidylanową w omawianych komórkach. Inna jednak jest sytuacja w opornych na ametoptyerynę komórkach WR9-1, w których aktywność reduktazy dihydrofolianowej jest 234 razy wyższa. W komórkach tych ograniczenie syntezy tetrahydrofolianu następuje dopiero przy zahamowanej w $99,96\%$ aktywności reduktazy dihydrofolianowej. Przy ogólnym stężeniu ametoptyeryny w komórce równym $60 \mu\text{M}$ (stężenie wolnej ametoptyeryny osiągnięte wówczas $15,5 \mu\text{M}$) reduktaza dihydrofolianowa zostanie zahamowana w $99,68\%$ — nie osiągając zatem wartości krytycznej. Natomiast aktywność syntetazy tymidylanowej ulegnie poważnemu ograniczeniu. Tak więc bezpośrednie oddziaływanie ametoptyeryny z syntetazą tymidylanową może mieć znaczenie cytotoksyczne, zwłaszcza w przypadku komórek opornych na ametoptyerynę.

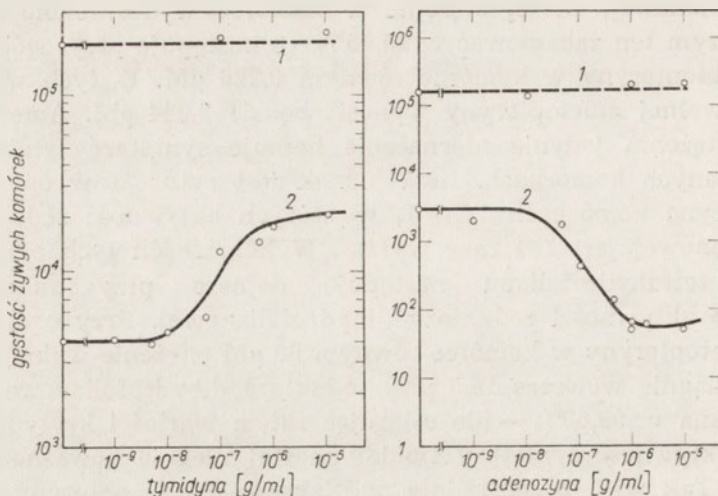
III. Podłoże biochemiczne śmierci komórek traktowanych ametoptyeryną

III-1. Niedobór tymidylanu a niedobór puryn

III.1.1. Różnice wrażliwości komórek różnych linii

Koenzymatyczne formy tetrahydrofolianu biorą udział w przenoszeniu jednostek jednowęglowych zarówno w czasie biosyntezy tymidylanu jak i puryn (Schemat 1). Powstaje zatem pytanie czy przyczyną śmierci komórki po podaniu ametoptyeryny jest zahamowanie syntezy dTMP, czy też syntezy puryn, występujące w konsekwencji niedoboru koenzymatycznych form folianu w komórce.

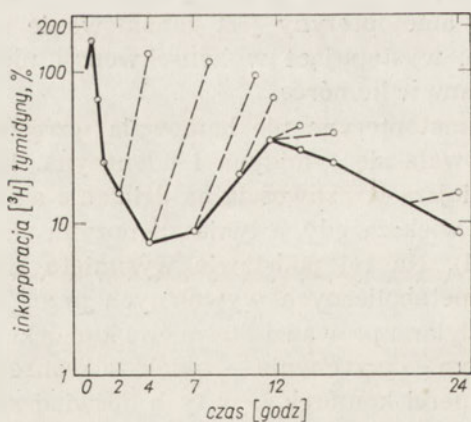
Jak stwierdzono ametoptyeryna nie hamowała wzrostu komórek L, jeśli w pożywce znajdowała się tymidyna i adenozyzna. Komórki te charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na działanie ametoptyeryny w obecności tymidyny, a większą gdy jedynie adenozyzna znajdowała się w pożywce (40, Ryc. 4). Na tej podstawie wysunięto roboczą hipotezę, że z dwóch bloków metabolicznych wywołanych przez ametoptyerynę inhibicja syntezy tymidylanu prowadzi do śmierci komórki, podczas gdy hamowanie syntezy puryn — przeciwnie — zwiększa szanse przeżycia komórki. Jako przyczynę śmierci komórek L w tych doświadczeniach uważano zahamowanie syntezy DNA przy zachodzącej normalnie syntezie RNA i białek (*unbalanced growth*). Przy równoczesnym zaś ograniczeniu syntezy DNA, RNA i białek nie występuje zachwianie równowagi metabolicznej i komórki mogą dłużej przeżywać (40).



Ryc. 4. Wpływ tymidyny i adenozyzny na wzrost komórek L hodowanych przez 72 godz. w pożywce zawierającej ametoptyerynę w stężeniu 10^{-6} g/ml (40).

1 — hodowle kontrolne; 2 — hodowle rosnące w obecności ametoptyeryny i tymidyny lub ametoptyeryny i adenozyzny.

Jak się przyjmuje odmienny jest mechanizm toksycznego działania ametoptyeryny w mysich komórkach leukemicznych L5178Y (41, 42). Pierwszym zjawiskiem obserwowanym w tych komórkach po podaniu ametoptyeryny był niedobór puryn, który prowadził do śmierci komórek przez zahamowanie syntezy RNA oraz białek o krótkim okresie półtrwania. Na fakt, że brak nukleotydów purynowych jest czynnikiem ograniczającym syntezę polinukleotydów wskazywało przejściowo odwracane przez hy-



Ryc. 5. Odwracanie przez hypoksantynę wpływu ametoptyeryny na intensywność inkorporacji tymidyny w komórkach L5178Y (41).

—O— komórki traktowane 1×10^{-6} M ametoptyeryną; ---O--- komórki traktowane ametoptyeryną jak wyżej i 2×10^{-6} M hypoksantyną dodawaną w różnym czasie od podania ametoptyeryny.

poksantynę zahamowanie inkorporacji tymidyny do DNA (Ryc. 5). Bezpośrednich dowodów dostarczyły pomiary wielkości puli nukleotydów adeninowych i guaninowych, która w okresie początkowym po dodaniu ametoptyeryny ulegała obniżeniu. W obserwowanym następnie okresie jej wzrostu dodanie adenozyiny nie odwracało inhibicji inkorporacji tymidyny (Ryc. 5), której niedobór był przyczyną śmierci komórek, o czym świadczył między innymi równoległy przebieg krzywych śmiertelności komórek i intensywności inkorporacji dezoksyurydyny.

Powyższe wyniki znalazły swe potwierdzenie w badaniach dotyczących antypurynowego i antytymidynowego działania ametoptyeryny w 9-ciu różnych liniach komórkowych (43, 44). Wynika z nich również, że zaburzenia metabolizmu folianu pod wpływem ametoptyeryny są różne w różnych typach komórek. Co więcej różnice takie wystąpić mogą także w komórkach tej samej linii, lecz różniących się fazą wzrostu hodowli.

III-1.2. Wrażliwość a tempo proliferacji komórek

Przyjmuje się często, że im szybsze jest tempo proliferacji komórek tym większa jest ich wrażliwość na działanie antymetabolitów (45, 46). Ponieważ antymetabolity interferują specyficznie z określonymi procesami anabolicznymi można przypuszczać, że najwrażliwsze na działanie ametoptyeryny są komórki w fazie syntezy DNA, a więc w tak zwanej fazie S. Ponieważ ponadto intensywność syntezy DNA w komórkach szybko rosnących może być większa niż w komórkach wolno rosnących, prowadzi to może do większej wrażliwości komórek szybko proliferujących w porównaniu z komórkami rosnącymi wolniej.

Różnice we wrażliwości komórek na działanie ametoptyeryny z hodowli w logarytmicznej i stacjonarnej fazie wzrostu były przedmiotem wnikliwych badań (47—49). Porównywanie śmiertelności komórek L5178Y pod wpływem ametoptyeryny a także intensywności inkorporacji dezoksyurydyny i tymidyny do DNA komórek z populacji różniących się szybkością wzrostu pozwala przypuszczać, że niedobór puryn wywołany przez ametoptyerynę ogranicza tempo wzrostu populacji. Zaznacza się on o wiele silniej w komórkach z szybko rosnących populacji (47).

III-1.3. Rola N⁵⁻¹⁰-metylenotetrahydrofolianu jako substratu w syntezie tymidylanu i puryn

Badając znaczenie niedoboru puryn w toksycznym działaniu ametoptyeryny zwrócono uwagę na aktywność dwóch enzymów — syntetazy tymidylanowej i dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu — współzawodniczących o wspólny substrat, N⁵⁻¹⁰-metylenotetrahydrofolian (43, 44). Związek ten wykorzystywany jest w szlakach metabolicznych prowadzących do syntezy dTMP i puryn (Schemat 1). Stopień wykorzystania me-

tylenotetrahydrofolianu do syntezy tymidylanu i do syntezy puryn może, jak się wydaje, zależeć od wzajemnego stosunku aktywności wspomnianych enzymów. Współzawodniczenie o wspólny substrat może mieć szczególnie istotne znaczenie, gdy w obecności ametoptyeryny następuje zahamowanie reduktazy dihydrofolianowej, co prowadzi z kolei do obniżenia w komórce poziomu tetrahydrofolianu i pośrednio — koenzymów tetrahydrofolianu. Tak więc w obecności ametoptyeryny wysoka aktywność syntetazy tymidylanowej w komórce powodować może obniżenie syntezy puryn, podczas gdy dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianu o wysokiej aktywności umożliwiać będzie przez pewien czas przebieg syntezy puryn o normalnej intensywności.

Porównując toksyczność ametoptyeryny w stosunku do komórek czterech linii rosnących w obecności nadmiaru tymidyny (kiedy to ujawnia się efekt niedoboru puryn) stwierdzono, że im niższy jest stosunek aktywności dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu do syntetazy tymidylanowej, tym większe są zaburzenia syntezy puryn spowodowane przez ametoptyerynę. Powyższe warunki wzrostu okazały się najbardziej toksyczne dla szybko dzielących się komórek, co mogło mieć związek z obserwowaną w tych komórkach wyższą aktywnością syntetazy tymidylanowej przy praktycznie takim samym poziomie aktywności dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu w porównaniu z komórkami wolno rosnących linii (Tabela 1). Wyniki te dobrze tłumaczą podkreślaną często (47—49) zależność stopnia zaburzeń syntezy puryn wywoływanych w komórce przez ametoptyerynę od szybkości wzrostu komórki (rozdział III-1.2).

Dodatkowe potwierdzenie trafności interpretacji otrzymanych wyników (44) stanowiły doświadczenia, w których komórkom jednocześnie z ametoptyeryną podawano FUDR — specyficzny inhibitor syntetazy tymidylanowej. W ten sposób podwyższano stosunek aktywności dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu do syntetazy tymidylanowej, czemu towarzyszyło obniżenie antypurynowego efektu wywieranego przez ametoptyerynę (46).

Tabela 1

Odwracanie przez tymidynę (200/ μ M) efektu cytotoksycznego ametoptyeryny (49)

Linia Komórkowa	Czas podwojenia (godz)	Aktywność właściwa		Stosunek DM/ST	Gęstość komórek rosnących przez 48 godz. w obecności tymidyny (% kontroli)
		syntetaza tymidylanowa ST	dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianu DM		
Novikoff	10	0,41	4,0	9,8	5
3924 A	15	0,22	4,4	15,7	16
8999 R	39	0,11	7,3	66,3	36
8999 S	81	0,07	6,8	97,5	49

* — aktywność właściwą wyrażono w nmolach przereagowanego substratu w 37°/min/mg białka.

W powyższych rozważaniach należy również pamiętać o tym, że poziom metylenotetrahydrofolianu, (podobnie jak i pozostałych koenzymów tetrahydrofolianu) — a więc jego dostępność w procesie syntezy puryn i dTMP — zależy także od reduktazy metylenotetrahydrofolianu (Schemat 1), której aktywność pośrednio reguluje nadmiar metioniny w komórce (6). W warunkach *in vivo* termodynamiczna równowaga przesunięta jest w kierunku redukcji metylenotetrahydrofolianu do metylo-tetrahydrofolianu, a regeneracja wolnego tetrahydrofolianu z metylo-tetrahydrofolianu jest jedynie możliwa podczas syntezy metioniny (Schemat 1; 6, 50).

III-2. Zaburzenia syntezy białek mitochondrialnych

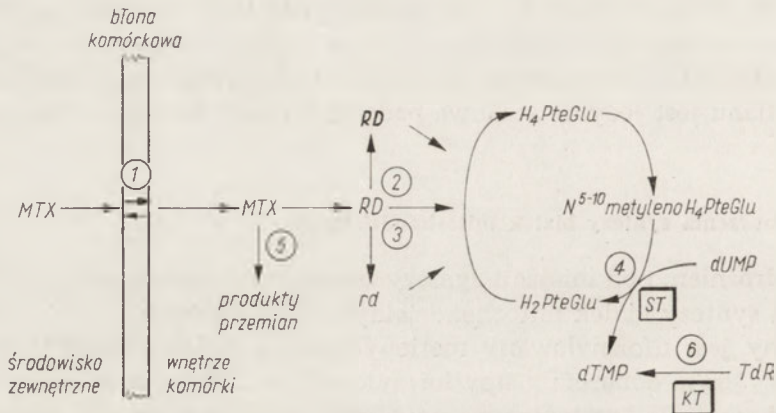
W odróżnieniu od inicjacji syntezy białek cytoplazmatycznych, do rozpoczęcia syntezy białek mitochondrialnych w komórkach eukariotycznych niezbędny jest uformylowany metionylo-tRNA ($fMet-tRNA_i^{Met}$) (51, 52, 52a), przy czym donorem grupy formylowej jest N^{10} -formylotetrahydrofolian (Schemat 1). Ametopteryna prowadząc do zubożenia puli koenzymatycznych tetrahydrofolianów w komórce może hamować formylację metionylo-tRNA, a w następstwie tego syntezę białek mitochondrialnych i pośrednio — wzrost komórek. Wyniki badań dotyczące hamowania przez ametopterynę formylacji mitochondrialnego $Met-tRNA_i^{Met}$ nie są jednak jednoznaczne. Podczas gdy w przypadku komórek HeLa ich krótka inkubacja z ametopteryną oraz z tymidyną i puryną powodowała zahamowanie formylacji metionylo-tRNA (53, 54), to w analogicznych warunkach w komórkach L i KB formylacja metionylo-tRNA oraz inicjacja syntezy białek w mitochondriach przebiegała normalnie (55). W tym kontekście godne zainteresowania są badania antymitotycznej aktywności pirymetaminy [2,4-diamino-5-(p-chlorofenyl)-6-etylopirymidyna] w komórkach ludzkich fibroblastów (56). Związek ten, stosowany między innymi jako lek antymalaryczny, jest analogiem folianu i podobnie jak ametopteryna hamuje silnie reduktazę dihydrofolianową. Główną przyczynę antymitotycznej aktywności pirymetaminy upatruje się właśnie w hamowaniu syntezy białek mitochondrialnych.

IV. Oporność komórek na ametopterynę

IV-1. Biochemiczne podłoże oporności

Badania Hakali z 1957 roku (57), w których stwierdzono normalny wzrost komórek S-180 w obecności ametopteryny, gdy w środowisku znajdowała się hypoksantyna, tymidyna i glicyna dały początek poszukiwaniom mechanizmów wrażliwości komórek na działanie ametopteryny (przegląd piśmiennictwa według 3, 58, 59).

Na schemacie 2 przedstawiono różne sytuacje, w których ametoptyeryna nie wywiera toksycznego wpływu na komórki, pomimo że znajduje się w środowisku w odpowiednio wysokim stężeniu. Pierwsza możliwość to upośledzenie transportu ametoptyeryny do komórki, przy czym istotna



Schemat 2. Niektóre z możliwych mechanizmów oporności komórek na ametoptyerynę.

1 — upośledzony transport ametoptyeryny; 2 — zwiększona aktywność reduktazy dihydrofolianowej; 3 — reduktaza dihydrofolianowa o zmienionym powinowactwie; 4 — zwiększona aktywność syntetazy tymidylanowej; 5 — degradacja ametoptyeryny; 6 — zwiększona aktywność kinazy tymidylanowej. Szczegóły w tekście.

Skróty: RD — reduktaza dihydrofolianowa; **RD** — reduktaza dihydrofolianowa (zwiększona aktywność); **rd** — reduktaza dihydrofolianowa (zmienione powinowactwo); ST — syntetaza tymidylanowa; **KT** — kinaza tymidylanowa; MTX — ametoptyeryna; dTMP, TdR, dUMP.

jest tutaj zmiana szybkości zarówno pobierania tego antyfolianu przez komórkę jak i jego wypływu z komórki (58). W efekcie krytyczny poziom wewnątrzkomórkowej ametoptyeryny może być zbyt niski do związania reduktazy dihydrofolianowej (ametoptyeryna związana) oraz do utrzymania wysycenia tego enzymu (ametoptyeryna wolna) i do inhibicji nowosyntetyzującej się w komórce reduktazy.

Założmy następnie, że transport ametoptyeryny do komórki przebiega normalnie. Mimo to wnikający do komórki antyfolian nie działa toksycznie na skutek wysokiej aktywności reduktazy dihydrofolianowej, zmian jej własności kinetycznych, czy też zwiększonej syntezy *de novo*. Brak toksyczności ametoptyeryny również może mieć związek z podwyższoną aktywnością syntetazy tymidylanowej (59), do takiego poziomu, że pobrana przez komórkę ametoptyeryna hamuje tylko częściowo jej aktywność. Inną jeszcze możliwość stanowi degradacja ametoptyeryny wnikającej do komórki.

Wreszcie w trzecim przypadku ametoptyeryna może wnikać do komórki osiągając poziom krytyczny, hamując reduktazę dihydrofolianową (i ewentualnie syntetazę tymidylanową). Konsekwencje tej inhibicji w zależności od rodzaju komórki mogą być różne: od całkowitego braku efektu

toksycznego do poważnych zaburzeń w funkcjonowaniu i śmierci. W tym przypadku brak toksyczności ametoptyeryny może mieć związek z czynnikami takimi jak:

- wysoki poziom wewnątrzkomórkowej puli kofaktorów tetrahydrofolianowych,
- wysoka wewnątrzkomórkowa pula dezoksyrybonukleotydów umożliwiająca syntezę DNA (60, 43),
- działanie w komórce innych szlaków metabolicznych pozwalających na ominięcie bloku metabolicznego wywołanego podaniem ametoptyeryny (61), a przede wszystkim fosforylacja tymidyny do dTMP przy udziale kinazy tymidylanowej (62).

Lista czynników, od których zależy cytotoksyczne działanie ametoptyeryny pozostaje nadal otwarta.

IV-2. Oporność wrodzona i oporność nabyta

Oporność komórek na ametoptyerynę jest złożonym zjawiskiem zależnym nieraz od wielu czynników. W praktyce jednak nie wszystkie spośród wymienionych mechanizmów oporności komórek na ten antyfolian występują jednakowo często, co stwierdzono prowadząc od wielu lat badania w różnorodnych układach doświadczalnych (przegląd literatury według 3; 63, 64, 59).

Do najczęściej spotykanych przyczyn oporności komórek na ametoptyerynę można zaliczyć zmiany w transporcie ametoptyeryny przez błonę komórkową (65—69), oraz wzrost poziomu reduktazy dihydrofolianowej w komórce (69—77, 65, 66).

Mówiąc o zjawisku oporności komórek na ametoptyerynę rozróżnić można oporność wrodzoną — cechującą komórki stykające się po raz pierwszy z tym antymetabolitem, oraz oporność nabytą (39). Ta ostatnia powstaje w miarę podawania człowiekowi czy zwierzęciu ametoptyeryny, czy też w czasie hodowli komórek czy bakterii w środowisku, w którym znajduje się ametoptyeryna. W takich warunkach przeżywają tylko te komórki, które uległy odpowiednim, korzystnym mutacjom (selekcja). Jak stwierdzono w hodowlach komórek L5178Y traktowanych ametoptyeryną 10^{-7} M częstotliwość występowania mutacji wynosi 2 na 10^6 komórek (78).

Hodując komórki *in vitro* w obecności ametoptyeryny o różnych stężeniach można otrzymać podlinie komórkowe różniące się opornością na ten antyfolian (38, 79). Własności komórek z dziesięciu podlinii wywodzących się z linii WS, wrażliwej na ametoptyerynę, obrazuje Tabela 2. Jak widać w komórkach nastąpił bądź wyraźny (w niektórych liniach przeszło 200-krotny) wzrost aktywności reduktazy dihydrofolianowej bądź też upośledzony został transport ametoptyeryny (Ryc. 6). Najwyższą opornością na ametoptyerynę cechowały się jednak komórki łączące w sobie obydwie te własności (WR9-4).

Obserwowany wielokrotnie zwiększony poziom reduktazy dihydrofolianowej w komórkach opornych na ametoptyerynę może być rezultatem podwyższonej syntezy tego enzymu w komórce, ale także wynikiem nagromadzenia się stabilnego kompleksu enzym — inhibitor, chroniącego

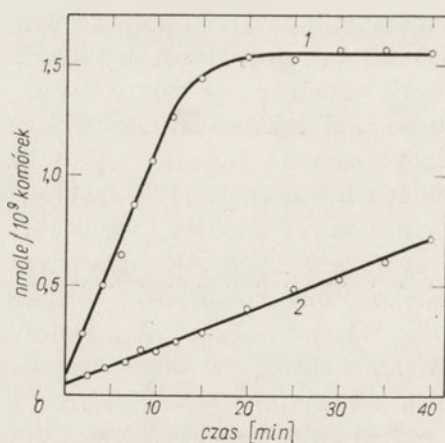
Tabela 2

Własności opornych na ametoptyerynę komórek z podlinii wyprowadzonych z wrażliwej na ametoptyerynę linii WS (38)

Podlinie komórkowe	ID (μM)	Oporność	Reduktaza dihydrofolianowa		Transport ametoptyeryny (% kontroli)
			aktywność (jednostki/ 10^9 komórek)	wzrost aktywności	
WS	0,013	(1)	0,22	(1)	(100)
WR8—1	2,2	170	48,1	222	108,3
WR8—2	3,2	240	17,9	83	93,1
WR8—3	3,0	230	4,5	21	19,7
WR8—4	3,8	290	21,7	100	78,5
WR8—5	2,8	220	30,6	141	93,8
WR9—1	6,8	520	50,7	234	107,4
WR9—2	6,9	530	4,9	23	27,3
WR9—3	11,0	840	5,6	26	11,2
WR9—4	16,0	1230	27,3	126	10,2
WR9—5	6,1	440	14,9	69	76,5

*) — stężenie ametoptyeryny, przy którym liczba komórek uległa zmniejszeniu do połowy.

reduktazę przed szybką degradacją, której normalnie podlega (80). Tym ostatnim zjawiskiem tłumaczy się zwiększony poziom reduktazy dihydrofolianowej w leukocytach i erytrocytach pacjentów, którym podawano



Ryc. 6. Pobieranie ametoptyeryny przez komórki wrażliwe na ametoptyerynę (1) i komórki z opornej podlinii WR9-4 (2) (38). Zewnątrzkomórkowe stężenie ametoptyeryny — 1 μM .

ametoptynę. Nagromadzony enzym jest najprawdopodobniej taki sam jak reduktaza izolowana z komórek krwi zdrowych osób (80).

Wysoki poziom enzymu utrzymujący się w niektórych opornych komórkach hodowanych przez wiele generacji w nieobecności ametoptyryny (81) tłumaczono jako uwarunkowanie genetyczne syntezy reduktazy dihydrofolianowej. Ścisła zależność pomiędzy stopniem oporności na ametoptynę mutantów *Diplococcus pneumoniae* a ilością produkowanej reduktazy dihydrofolianowej, stała się podstawą hipotezy tłumaczącej jedną z możliwości zwiększonej syntezy enzymu (82). Według tej hipotezy reduktaza dihydrofolianowa jest przykładem enzymu, który

Tabela 3

Biochemiczne właściwości hodowanych in vitro komórek zwierzęcych o różnej oporności na ametoptynę (35)

Linia komórkowa	ID ₅₀ * (nM)	Oporność (w porównaniu z L 1210)	Pobieranie ametoptyryny (nmole) / min/10 ⁹ komórek	Zredukowane foliany (nmole/10 komórek)	Aktywność**)	Reduktaza dihydrofolianowa		
						aktywność	K _i ametoptyryny (pM)	K _m dihydrofolianu (μM)
L 1210	5,8	(1)	0,14	24,5	0,024	0,23	5,3	0,16
W 1-L2	13	2,2	0,12	23,0	0,020	0,22	7,3	0,13
L 5187Y	56	9,7	0,20	16,0	0,029	0,29	31	0,42
Yoshida 390	390	67,3	0,12	33,8	0,015	0,36	135	0,30

*) Stężenie ametoptyryny, przy którym liczba komórek uległa zmniejszeniu do połowy po 48 godz.

**) Wyrażona w jednostkach enzymu/10⁹ komórek.

obok funkcji katalitycznej posiada drugą funkcję — kontrolującą, a mówiąc ściślej — represerową. Reduktaza ta miałaby być zatem represorem, w układzie, w którym produkt genu (a więc enzym) hamuje swoją własną syntezę.

O wiele rzadziej w komórkach opornych na ametoptynę stwierdza się produkcję reduktazy dihydrofolianowej o wyraźnie obniżonym powinowactwie w stosunku do ametoptyryny (83, 59, 69). Ostatnio otrzymano interesujące wyniki dotyczące wrodzonej oporności komórek na ametoptynę (35). Tabela 3 przedstawia szereg biochemicznych właściwości komórek czterech badanych linii. Jak widać ani szybkość pobierania ametoptyryny przez komórki, ani aktywność syntetazy tymidylanowej, ani wreszcie wielkość puli zredukowanych folianów nie wykazywały zgodności z opornością komórek na ametoptynę. Wprawdzie najwyższa aktywność reduktazy dihydrofolianowej cechowała komórki najbardziej odporne, ale stwierdzane różnice aktywności były wielokrotnie niższe niż różnice oporności komórek. Aby dokładnie zbadać własności kinetyczne reduktazy dihydrofolianowej z komórek badanych linii enzym ten oczysz-

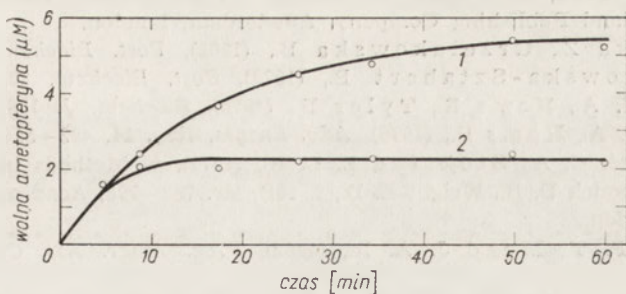
czano do homogenności przy użyciu chromatografii powinowactwa. Stwierdzono, że oczyszczone enzymy nie różniły się zasadniczo ani liczbą obrotów ani stałą Michaelisa dla dihydrofolianu (Tabela 3), natomiast różnice wartości stałych inhibitorowych okazały się znaczne i wykazywały zgodność ze stopniem oporności na ametoptyerynę badanych komórek. Tak więc do czynników, od których może zależeć oporność komórek na ametoptyerynę dodać można jeszcze jeden: własności kinetyczne reduktazy dihydrofolianowej (przy tym samym poziomie aktywności tego enzymu).

V. Uwagi końcowe

Praktyczne znaczenie badań nad mechanizmem działania ametoptyeryny wypływa z faktu, że jest ona związkiem szeroko stosowanym w klinice. Wyniki badań biochemicznych częstokroć dostarczają cennych wskazań co do sposobu stosowania tego antymetabolitu. I tak na przykład na to, jak ważna jest wielkość dawki ametoptyeryny podawanej choremu wskazują badacze stwierdzający w obecności niskich stężeń tego związku podwyższenie aktywności syntetazy tymidylanowej i zarazem syntezy dTMP — a więc efekt przeciwny do zamierzonego (84—86). Podobne wnioski wypływają z badań (20, 21, 31), w których zwrócono uwagę na znaczenie odpowiednio wysokiego poziomu wewnątrzkomórkowej ametoptyeryny w cytotoksyczności tego związku. Poziom ten ulega znacznemu podwyższeniu w obecności winkrystyny (Ryc. 7; 87, 88), co wskazuje, że jednoczesne stosowanie ametoptyeryny i winkrystyny jest bardzo celowe, potęguje ono bowiem działanie ametoptyeryny przy możliwości jednoczesnego obniżenia jej dawek. W wielu ośrodkach prowadzone są badania nad skutecznością chemioterapii łączonej (*combination chemotherapy*) stosowanej w leczeniu z użyciem ametoptyeryny jednocześnie z innymi jeszcze związkami jak np. L-asparaginazą czy FUDR (44, 89—96).

W tym miejscu warto jest jeszcze wspomnieć o udanych próbach podawania cytostatyków w dawkach stopniowo wzrastających i malejących w ciągu doby (97). Taki system podawania leków uwzględniający okołodobową chronotolerancję zwierzęcia w przypadku 1- β -D-arabinozarybocytyny przynosił znaczny wzrost przeżywalności chorych myszy w porównaniu ze zwierzętami, które taką samą ilość leku dostawały w jednakowych dawkach w ciągu doby

Ametoptyeryna jest związkiem wysoce toksycznym nie tylko dla komórek nowotworowych, lecz także i prawidłowych. Aby cofnąć jej toksyczne działanie podaje się pacjentom leczonym ametoptyeryną formylową pochodną tetrahydrofolianu wykorzystując przy tym liczne badania nad odwracaniem toksycznego działania ametoptyeryny przez pochodne tetrahydrofolianu (98—107). Niedawno sygnalizowano możliwość zastosowania



Ryc. 7. Pobieranie ametoptyryny przez komórki raka Ehrlicha w nieobecności (88) i obecności (2) $10 \mu\text{M}$ siarczanu winkrystyny (88). Zewnątrzkomórkowe stężenie ametoptyryny wynosiło $10 \mu\text{M}$.

pochodnej metylowej, zamiast dotąd stosowanej pochodnej formylowej tetrahydrofolianu (108 i 108a). Wykazano bowiem, że w niektórych układach *in vitro* metylotetrahydrofolian znosił toksyczne działanie ametoptyryny w komórkach prawidłowych, które cechowała stosunkowo wysoka aktywność syntetazy metioninowej, zależnej od witaminy B_{12} , podczas gdy w komórkach nowotworowych o niskim poziomie syntetazy metioninowej pochodna metylowa nie znosiła efektu toksycznego ametoptyryny (108a, 108b).

W ostatnich latach podjęto ciekawe próby wywołania niedoboru zredukowanych pochodnych folianu prowadzącego do zahamowania wzrostu pewnych nowotworów (109). Wywoływano ów niedobór nie jak dotąd — podając antyfoliany, ale stosując *in vitro* karboksypeptydazę G_1 , odszczepiającą resztę glutaminianową z folianu i jego koenzymatycznych pochodnych (109).

Główną trudność w chemioterapii nowotworów stanowi występowanie przede wszystkim ilościowych, a nie jakościowych różnic biochemicznych pomiędzy tkankami prawidłowymi a nowotworowymi (44). Bardzo cenne są więc wyniki badań wskazujące na biochemiczne zmiany jakościowe towarzyszące rozwojowi procesu nowotworowego (110—113, 44), lub możliwość wywołania tych zmian przez modyfikację środowiska wewnątrz- czy zewnątrzkomórkowego (40, 44).

Artykuł otrzymano 8.4.1977, po rewizji autorskiej przyjęto 8.6.1977.

PIŚMIENICTWO

1. Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D., Syvester R. F. Jr., Wolf J. A., (1948), *New Engl. J. Med.* 238, 787—793.
2. Chabner B. A., Myers C. E., Coleman C. N., Johns D. G., (1975), *New Engl. J. Med.* 292, 1107—1113.

3. Blakley R. L., (1969), *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
4. Zielińska Z., Grzelakowska B., (1962), *Post. Biochem.* **8**, 453—473.
5. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Post. Biochem.* **22**, 345—385.
6. Krebs H. A., Hems R., Tyler B., (1976), *Biochem. J.* **158**, 341—353.
7. Krebs H. A., Hems R., (1976), *Adv. Enzym. Reg.* **14**, 493—514.
8. Kutzbach C. A., Stokstad E. L. R., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. McCromick D. B., Wright L. D., t. 18B, str. 793—798, Academic Press, New York, London.
9. Condit P. T., Mead J. A. R., (1962), *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **3**, 311.
10. Condit P. T., Mead J. A. R., (1963), *Biochem. Pharmacol.*, **12**, 94—96.
11. Mc Burney M. W., Whitmore G. F., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 586—590.
12. Roberts D., Wodinsky I., (1968), *Cancer Res.*, **28**, 1955—1962.
13. Kessel D., Hall T. C., (1967), *Cancer Res.*, **27**, 1539—1543.
14. Goldman I. D., Lichtenstein N. S., Oliviero V. T., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 5007—5017.
15. Goldman I. D., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3779—3785.
16. Sirotnak F. M., Donsbach R. C., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2120—2126.
17. Sirotnak F. M., Donsbach R. C., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 3332—3340.
18. Grzelakowska-Sztabert B., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 209—320.
19. Bender R. A., Makulu D. R., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **25**, 975—976.
20. Goldman I. D., (1974), *Mol. Pharmacol.*, **10**, 257—274.
21. White J. C., Loftfield S., Goldman I. D., (1975), *Mol. Pharmacol.*, **11**, 287—297.
22. Lovesey A. C., (1971), *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2033—2041.
23. Hanggi U. J., Littlefield J. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1390—1397.
24. Williams M. N., Greenfield N. J., Hoogsteen K., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6380—6386.
25. Dunlap R. B., Gunderson L. E., Huennekens F. M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 772—777.
26. Mell G. P., Martelli M., Kirchner J., Huennekens F. M., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **33**, 74—79.
27. Poe M., Greenfield N. J., Williams M. N., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2710—2716.
28. Gunderson L. E., Dunlap R. B., Harding N. G. L., Freisheim J. H., Otting F., Huennekens F. M., (1972), *Biochemistry* **11**, 1018—1023.
29. Harding N. G. L., Martelli M. F., Huennekens F. M., (1970), *Arch. Biochem., Biophys.*, **137**, 295—296.
30. Otting F., Huennekens F. M., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 429—431.
31. White J. C., Goldman I. D., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 711—719.
32. Werkheiser W. C., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 888—893.
33. Manteuffel-Cymborowska M., Grzelakowska-Sztabert B., (1970), *J. Insect Physiol.*, **16**, 1419—1428.
34. Jackson R. C., Harrap K. R., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* **158**, 827—841.
35. Jackson R. C., Hart L. I., Harrap K. R., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1991—1997.

36. Borsa J., Whitmore G. F., (1969), *Mol. Pharmacol.*, 5, 318—332.
37. Borsa J., Whitmore G. F., (1969), *Mol. Pharmacol.*, 5, 303—317.
38. Niethammer D., Jackson R. C., (1975), *Eur. J. Cancer* 11, 845—854.
39. Harrap K. R., Hill B. T., Furness M. E., Hart L. I., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 186, 312—324.
40. Borsa J., Whitmore G. F., (1969), *Cancer Res.*, 29, 737—744.
41. Hryniuk W. M., (1975), *Cancer Res.*, 35, 1085—1092.
42. Hryniuk W. M., Brox L. W., Henderson J. F., Tamaoki T., (1975), *Cancer Res.*, 35, 1427—1432.
43. Tattersall M. H. N., Jackson R. C., Jackson S. T. M., Harrap K. R., (1974), *Eur. J. Cancer*, 10, 819—826.
44. Jackson R. C., Weber G., (1976), *Biochem. Pharmacol.*, 25, 2613—2618.
45. Skipper H., (1968), *Cancer* 22, 600—610.
46. Bruce W. R., Meeker B. E., Valeriote F. A., (1966) *J. Nat. Cancer Inst.*, 37, 233—245.
47. Hryniuk W. M., Fischer G. A., Bertino J. R., (1969), *Mol. Pharmacol.*, 5, 557—564.
48. Hryniuk W. M., Bertino J. R., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 186, 330—342.
49. Hryniuk W. M., (1972), *Cancer Res.*, 32, 1506—1511.
50. Jaenicke L., (1973), w *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes*, red. Gerlack E., Mosor K., Deutsch E., Wilmans W., str. 362—368, Georg. Thieme Publishers, Stuttgart.
51. Dickerman H. W., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.*, 186, 70—81.
52. Boulter D., Ellis R. J., Yarwood A., (1972), *Biol. Rev.*, 47, 113—175.
- 52a. Crosti P., Gambini A., Lucchini G., Bianchetti R., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, 477, 356—370.
53. Galper J. B., Darnell J. E., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 34, 205—214.
54. Galper J. B., (1974), *J. Cell Biol.*, 60, 755—763.
55. Wallace R. B., Freeman K. B., (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 36, 466—473.
56. Kirk D., Mittwoch U., Stone A. B., Wilkie D., (1976) *Biochem. Pharmacol.*, 25, 681—685.
57. Hakala M. T., (1957), *Science* , 126, 255.
58. Goldman I. D., (1975), *Cancer Chemoter. Rep.*, 6, 51—61.
59. Bertino J. R., Skeel R. T., (1974), *Biochem Pharmacol.*, 2, 101—106.
60. Tattersall M. H. N., Harrap K. R., (1973), *Cancer Res.*, 33, 3086—3090.
61. Sneider T. W., Potter V. R., (1969), *Cancer Res.*, 29, 2398—2403.
62. Wilmanns W., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 186, 365—371.
63. Grzelakowska B., (1963), *Post. Biochem.*, 9, 311—327.
64. Grzelakowska B., (1966), *Chem. listy*, 60, 499—521
65. Misra U. D. K., Humphreys S. R., Friedkin M., Goldin A., Grawford E. J., (1961), *Nature*, 189, 39—42.
66. Bertino J. R., (1963), *Cancer Res.*, 23, 1286—1306.
67. Kessel D., Hall J. C., Roberts D., Wodinsky I., (1965), *Science* 150, 752—754.
68. Sirotnak F. M., Kurita S., Hutchison D. J., (1968), *Cancer Res.*, 28, 75—80.
69. Flintoff W. F., Davidson S. V., Siminovitch L., (1976), *Som. Cell Genet.*, 2, 245—261.
70. Futterman S., Silverman M., (1957), *J. Biol. Chem.*, 224, 31—40.

71. Fischer G. A., (1961), *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 75—77.
72. Bertino J. R., Donohue D. R., Gabrio B. W., Silber R., Alenty A. A., Mayer M., Huennekens F. M. (1962), *Nature*, **193**, 140—142.
73. Mathews C. K., Huennekens F. M., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3436—3442.
74. Perkins J. P., Hillcoat B. L., Bertino J. R., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4771—4776.
75. Hakala M. T., Zakrzewski S. F., Nichol Ch. A., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 952—958.
76. Hakala M. T., Ishihara T., (1962), *Cancer Res.*, **22**, 987—992.
77. Raunio R. P., Hakala M. T., (1967), *Mol. Pharmacol.*, **3**, 279—283.
78. Fischer G. A., (1971), *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **34**, 131—134.
79. Jackson R. C., Niethammer D., Huennekens F. M., (1975), *Cancer Biochim. Biophys.*, **1**, 151—155.
80. Bertino J. R., Cashmore A. R., Hillcoat B. L., (1970), *Cancer Res.*, **30**, 2372—2378.
81. Nakamura H., Littlefield J. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 179—187.
82. Calvo J. M., Fink G. R., (1971), *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 943—944.
83. Sirotnak F. M., Donati G. J., Hutchison D. J., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 4298—4302.
84. Kawai M., Hillcoat B. L., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 1619—1626.
85. Chelo P. L., McQueen C. A., DeAngelis L. M., Bertino J. R., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2442—2449.
86. Bonney R. J., Maley F., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 1950—1956.
87. Goldman I. D., Fyfe M., (1974), *Mol. Pharmacol.*, **10**, 275—282.
88. Goldman I. D., Gupta V., White J. C., Loftfield S., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 276—279.
89. Connors T. A., Jones M., (1970), *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2927—2929.
90. Goldin A., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **186**, 423—437.
91. Capizzi R. L., (1974), *Biochem. Pharmacol. Suppl.*, **2**, 151—161.
92. Capizzi R. L., (1975), *Cancer Chemotherap. Rep.*, **6**, 37—41.
93. Chlopkiewicz B., Koziorowska J., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 1524—1529.
94. Grindey G. B., Moran R. G., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 1702—1705.
95. Harrap K. R., Jackson R. C., (1975), *Adv. Enzyme Reg.*, **13**, 77—96.
96. Fischer B., Rubin H., Saffer E., Wolmark N., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 2714—2719.
97. Scheving L. F., Hans E., Kühl J. F. W., Pauly J. E., Halberg F., Cardoso S., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1133—1137.
98. Vogler W. R., Jacobs J., (1971), *Cancer*, **28**, 884—901.
99. Jaffe N., Paled D., (1972), *Cancer*, **30**, 1627—1631.
100. Jaffe N., Frei E. III, Traggis D., (1974), *New Engl. J. Med.*, **291**, 994—997.
101. Bender R., (1975), *Cancer Treatment Rev.*, **2**, 215—224.
102. Djerassi I., (1975), *Cancer Chemotherapy Rep.*, **6**, 3—6.
103. Frei E. III, Jaffe N., Tattersall M. H. N., Pitman S., Parker L., (1975), *New Engl. J. Med.*, **292**, 846—851.
104. Pitman S. W., Parker L. M., Tattersall N., Jaffe N., Frei E. III, (1975), *Cancer Chemotherapy Rep.*, **6**, 43—49.
105. Pratt C. B., Roberts D., Shanks E., Warmath E. L., (1975), *Cancer Chemotherapy Rep.*, **6**, 13—18.
106. Pinedo H. M., Zaharko D. S., Bull J. M., Chabner B. A., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 4418—4424.

107. Sirotnak F. M., Donsbach R. C., Maccio D. M., Dorick D. M., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 4679—4686.
108. Sauer H., Jaenicke L., (1974), *Blut*, **27**, 321—326.
- 108a. Halpern R. M., Halpern B. C., Clark B. R., Ashe H., Hardy D. N., Jenkinson P. Y., Chou S. C., Smith R. A., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 4018—4022.
- 108b. Ashe H., Clark B. R., Chu F., Hardy D. N., Halpern B. C., Halpern R. M., Smith R. A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 417—424.
109. Bertino J. R., Levitt M., McCullough J. L., Chabner B., (1971), *Ann. N.Y. Acad. Sci* **186**, 486—495.
110. Weber G., (1973), *Adv. Enzyme Regul.*, **11**, 79—102.
111. Weber G., Prajda N., Williams J. C., (1975), *Adv. Enzyme Regul.*, **13**, 3—25.
112. Weber G., (1977), *New Engl. J. Med.*, **296**, 486—493.
113. Weber G., (1977), *New Engl. J. Med.*, **296**, 541—551.

Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]
 Mr. [Name] [Address] [City] [State] [Zip]

SPRAWOZDANIE

International Symposium on Microchemical Techniques 1977 (ISH, 1977)

Davos, 22 — 27 maja 1977

Międzynarodowe Sympozjum Technik Mikrochemicznych 1977 zostało zorganizowane z ramienia IUPAC i Towarzystw Chemicznych różnych narodowości. W skład Komitetu organizacyjnego weszli przedstawiciele:

Szwajcarii — H. Trey, W. Simon

Anglii — R. Belcher, D. Butterworth, R. A. Chalmers, G. Ingram

Austrii — H. Lieb, M. Kuhnert-Brandstätter, H. Malissa, H. Spitz, H. Wagner

Holandii — E. Pungor

Japonii — H. Hatano

RFN — W. Mertz (przewodniczący), G. Tölg

Stany Zjednoczone Ameryki — H. Francis, I. Y. Steel

ZSRR — L. P. Alimarin, N. E. Gelman, I. A. Żołotow

Mikrochemiczne sympozja mają już swoją 27-letnią tradycję. Organizowane co kilka lat w Europie i w Ameryce, zmieniały w zależności od potrzeb swoją problematykę, uwzględniając w niej różnorodne nowe rodzaje metod badawczych, możliwości ich zastosowania oraz efekty za pomocą nich osiągnięte w różnych dziedzinach nauk przyrodniczych. I tym razem sympozjum spełniło swoje zadanie. Niezwykle obszerny program sympozjum stanowił wyczerpujący przegląd nowoczesnych sposobów i technik badawczych stosowanych w pracowniach naukowych i przemysłowych na całym świecie.

Problemem wiodącym w sympozjum w Davos było zebranie nowych metod rozdzielania substancji organicznych z nakierowaniem na nauki przyrodnicze (biologię, geologię itd.). W bardzo dużym zakresie zajmowano się także mikrometodami śladów organicznych i nieorganicznych, analizą powierzchniową pierwiastków oraz mikroanalizą elementarną.

Obrady sympozjum toczyły się w następujących sekcjach:

- a. Ogólna nieorganiczna mikroanaliza i analiza śladów
- b. Ogólna organiczna mikroanaliza
- c. Analiza śladów pierwiastków w nieorganicznych matrycach
- d. Sposoby rozdzielania i wzbogacania pierwiastków
- e. Sposoby rozdzielania i wzbogacania substancji cząsteczkowych
- f. Analiza spektralna
- g. Metody elektrochemiczne
- h. Metody radiochemiczne
- i. Analiza powierzchni
- j. Analizy mikro- i śladowe organicznych matryc
- k. Mikrometody w biochemii
- l. Analizy środowiska

Zgłoszono 237 prac z 408 autorami i 24 referaty plenarne. Największą liczbę referatów plenarnych i doniesień wygłoszono na temat zastosowań fizykochemicznych

metod badawczych, szczególnie spektrofotometrycznych opartych o chromatografię cieczową w wszelkich dziedzinach badań przyrodniczych.

Na podkreślenie zasługują: historyczny referat o rozwoju mikrochemii wygłoszony przez W. Freseniusa, filozoficzny referat o zadaniach analityków w przyszłości wygłoszony przez R. Jungka oraz przeglądowy referat o rozwoju i trendach w chemii analitycznej wygłoszony przez W. Simona. Polskich uczestników reprezentowała dość liczna grupa z ośrodka warszawskiego z prof. Kemulą na czele oraz pojedyncze osoby z ośrodków śląskiego i poznańskiego. Referatów polskich zgłoszono 11.

Obrady odbywały się w pięknej alpejskiej miejscowości wypoczynkowej Davos, w której istnieje od lat Centrum Kongresowe z wszelkimi urządzeniami umożliwiającymi odbywanie się wielkich zjazdów i konferencji.

A. Smoczkiewiczowa

RECENZJE

Eucaryotic Cell Function and Growth Regulation by Intracellular Cyclic Nucleotides

Redaktorzy: Jacques E. Dumont, Barry L. Brown, Nicholas J. Marshall,

wyd. Plenum Press, New York, Londyn, 1976, str. 22 + 838.

Książka obejmuje materiały kursu pt. „Regulacja funkcji i wzrostu komórek eukariotycznych przez wewnątrzkomórkowe cykliczne nukleotydy”. Kurs odbył się w Belgii w 1974 r. a zbiór ponad czterdziestu wykładów ukazał się 2 lata później jako tom 9 podserii Life Sciences serii wydawniczej nazywanej *NATO Advanced Study Institutes Series*. W zasadzie program kursu przewidywał wykłady szkoleniowe dla niespecjalistów, w praktyce szereg prelekcji miało charakter bardzo instruktywnych wykładów, inne zaś miały charakter referatów, w których autorzy prezentowali i dyskutowali swoje własne wyniki. Łatwo to zauważy czytelnik systematycznie studiujący książkę.

O zakresie omówionych kwestii świadczą szczegółowe tytuły kolejnych rozdziałów poczynając od wstępnego, który poświęcono pamięci Earla W. Sutherlanda, odkrywcy cyklicznego AMP. A oto wykaz omówionych zagadnień:

- Izolowanie frakcji komórkowych w drodze frakcjonowego wirowania.
- Wiązanie ligandów przez receptory: teoria.
- Regulacja wewnątrzkomórkowego poziomu cyklicznego AMP: zniesienie wrażliwości cyklaz adenylowych na stymulację przez hormony oraz kompartmentalizacja cyklicznego AMP.
- Interakcja glukagenu z izolowanymi błonami cytoplazmatycznymi komórek wątroby: miejsca wiążące (znaczenie i możliwości pomiarów).
- Wiązanie hormonu przez receptory: wazopresyna.
- Skutki działania choleragenu (egzotoksyny produkowanej przez *Vibrio Cholerae*) i fluorku na cyklazę adenylową.
- Stymulacja cyklazy adenylowej w tarczycy.
- Cyklaza guanylowa.
- Regulacja aktywności fosfodwuesterazy przez cykliczne AMP.
- Teoretyczne symulacje działania t.zw. układu cyklicznego AMP (aktywacja kinaz białkowych przez cykliczne AMP oraz konsekwencja obecności w błonach cytoplazmatycznych cyklazy adenylowej i fosfodiesterazy na wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie i przemiany cyklicznego AMP).
- Kontrola procesów metabolicznych jako efekt fosforylacji białek przez cykliczne AMP.
- Wiązanie cyklicznego AMP i cyklicznego GMP przez receptory tkankowe.
- Oznaczanie cyklicznego AMP w materiale biologicznym.
- Oznaczanie cyklicznego GMP w materiale biologicznym.
- Metody badania metabolizmu cyklicznego AMP w nienaruszonej komórce.
- Kontrola układów cyklaz adenylowych przez nukleotydy.
- Metabolizm cyklicznego AMP w hodowanych *in vitro* fibroblastycznych i nabłonkowych komórkach.

- Analogi nukleotydów cyklicznych.
- Morfologia mikrotubuli.
- Cykliczne AMP a mikrotubule.
- Prostaglandyny a cykliczne nukleotydy.
- Nowe badania nad rolą cyklicznego AMP w działaniu glukagonu i epinefryny.
- Rola cyklicznego AMP w regulacji metabolizmu glikogenu.
- Cykliczne AMP a dehydrogenaza pirogronianowa.
- Cykliczne AMP a biosynteza białka.
- Cykliczne AMP a kontrola lipolizy w komórkach tłuszczowych szczura.
- Badanie mechanizmów działania hormonów tarczycy na komórki tłuszczowe.
- Cykliczne nukleotydy i wapń a transport jonów.
- Wydzielanie insuliny — rola i sposób działania cyklicznego AMP.
- Efekty działania cyklicznego AMP na funkcje komórek B.
- Rola cyklicznego AMP w przednim płacie przysadki.
- Udział cyklicznego AMP w mechanizmach działania niektórych hormonów przysadki (LH i FSH) na komórki jąder.
- Rola cyklicznego AMP w regulacji tonusu mięśnia gładkiego.
- Regulacja metabolizmu komórek gruczołowych tarczycy.
- Charakter wzrostu fibroblastów, powierzchnia komórek a cykliczne AMP.
- Struktura chromatyny i fosforylacja histonów w toku cyklu komórkowego.
- Cykliczne nukleotydy a adhezja i ruch komórek po podłożu (autor proponuje interesujący model wyjaśniający mechanizmy adhezji lokomocji komórek).
- Cykliczne AMP a ekspresja cech odróżniających komórki prawidłowe i nowotworowe.
- Nukleotydy cykliczne a wzrost komórek.
- Cykliczne AMP a różnicowanie mioblastów.

W końcowym wykładzie przedstawiono nieliczne dotąd dane mówiące o zmianach w intensywności przemian nukleotydów cyklicznych obserwowanych u chorych w różnych stanach patologicznych.

Ze względu na wszechstronność opracowania i charakter wykładu książka pt. „Eucaryotic Cell Function and Growth: Regulation by Interacellular Cyclic Nucleotide” winna się znaleźć w bibliotece każdego laboratorium, w których prowadzi się badania w zakresie biologii komórki.

Z. Zielińska

Methods of Protein Separation, tom 2, red. N. Catsimpoclas,

Plenum Press, New York and London, 1976

Jednym z najistotniejszych narzędzi biologii molekularnej jest metodyka rozdzielania oraz charakteryzowania białek obecnych w materiale biologicznym. Rozwój tej dziedziny w ciągu ostatnich kilkunastu lat był niezwykle dynamiczny i doprowadził do powstania szeregu zupełnie nowych lub udoskonalonych technik. Brak jednak było do niedawna wydawnictwa systematyzującego te osiągnięcia i pozwalającego zapoznać się z nowymi technikami bez poszukiwania wiadomości o nich rozsianych w literaturze naukowej.

Lukę tę wypełniła w dużym stopniu omawiana tu książka, wydana w serii „Biolo-

gical Separations. Poszczególne rozdziały, z których każdy stanowi odrębną całość opatrzoną spisem literatury, poświęcono różnym technikom, powierzając opracowanie każdego z nich specjalistom w zakresie danej techniki. Uwzględniono przy tym podstawy teoretyczne, stosowaną aparaturę, zalety i ograniczenia oraz możliwości zastosowania omawianych technik.

Książkę wydano bardzo starannie. Tom 2 liczy 326 stron tekstu zawierającego łącznie ponad 1000 rysunków, fotografii, wykresów i tabel oraz indeks rzeczowy. W recenzowanym tomie szczególnie wiele miejsca poświęcono elektroforezie w żelu poliakryloamidowym. Najdłuższy, bo liczący ponad 100 stron rozdział 2 zajmuje się nowym podejściem do tej techniki. Autorzy (A. Chrambach, T. M. Jovin, P. J. Svendsen i D. Rodbard) opracowali „strategię” zmierzającą do umożliwienia nieprzypadkowego, celowego wyboru warunków optymalnych dla elektroforetycznego rozdzielania materiału biologicznego i wyizolowania określonych cząsteczek w postaci jednorodnej. Strategia ta oparta jest na dokładnej analizie zależności rozdzielania badanego materiału od warunków elektroforezy. W wyniku analizy znajduje się optymalne wartości pH oraz stężenia żelu zarówno dla rozdzielania analitycznego jak i preparatywnego. Poza dokładnym opisem postępowania rozdział ten zawiera opisy budowy aparatury oraz możliwości komputeryzacji analizy wyników. Elektroforeza jest także tematem rozdziału 5 (autor S. Hjertén), w którym omówiono zastosowanie elektroforezy prowadzonej w roztworze pozbawionym nośnika.

Rozdziały 3 i 4 (autor D. Rodbard) poświęcono teoretycznym podstawom oznaczania ciężaru cząsteczkowego na drodze sączenia oraz elektroforezy w żelu poliakryloamidowym. Technice analitycznej poświęcono także rozdział 1 (autor G. K. Ackers). Opisano w nim nowy sposób obserwacji ruchu makrocząsteczek w trakcie ich chromatografii kolumnowej. Sposób ten polega na cyklicznej analizie absorpcji światła ultrafioletowego o określonej długości fali przez kolumnę na całej jej długości. Analizę taką umożliwiała kolumna przesuująca się synchronicznie względem optycznego układu analizującego.

Rozdziały 6 (autor S. Hjertén) i 7 (autor B. H. J. Hofstee) poświęcono technice zwanej często „chromatografią hydrofobową”, przy czym oddzielnie omówiono dwa warianty techniki. W jednym z nich rozdział białek opiera się głównie na oddziaływaniach hydrofobowych (*hydrophobic interaction chromatography*), podczas gdy w drugim (*hydrophobic adsorption chromatography*) wykorzystuje się zarówno oddziaływania hydrofobowe jak i hydrofilowe pomiędzy białkiem a ligandem związanym na wysokocząsteczkowym nośniku. Ostatni 8 rozdział (autor L. H. Kirkegaard) zajmuje się chromatografią sitowo-sorpcyjną (*sieveporptive chromatography*), wykorzystującą przy rozdzielaniu białek proces sączenia molekularnego w połączeniu z wymianą jonową lub innym rodzajem sorpcji.

Omawianą książkę polecić można przede wszystkim biochemikom — zarówno pracownikom nauki jak i studentom.

W. Rode

The Bile Acids, vol. 3: Pathophysiology, red P. P. Nair i D. Kritchewsky

Plenum Press, New York and London, 1976, stron 229.

The „Bile Acids”, praca zbiorowa pod redakcją P. P. Naira i D. Kritchewsky’ego, jest 3-tomowy wydaniem obejmującym kompletny przegląd współczesnej wiedzy o kwasach żółciowych. Tom 1 („The Bile Acids”, vol. 1: Chemistry), który ukazał się

w 1971 roku, omawiał aspekty chemiczne i fizyko-chemiczne kwasów żółciowych oraz metody izolowania i oznaczania tych związków w materiale biologicznym. Tom 2 („The Bile Acids”, vol. 2: „Physiology and Metabolism”) wydany w 1973 roku zawierał dane dotyczące fizjologii i metabolizmu kwasów żółciowych, ze szczególnym uwzględnieniem ich biogenezy, transportu oraz wpływu hormonów i różnych czynników farmakologicznych na metabolizm tych kwasów.

W 1976 roku ukazał się tom 3 („The Bile Acids”, vol. 3: Pathophysiology), w opracowaniu którego, podobnie jak tomów poprzedzających, wziął udział zespół wybitnych specjalistów z różnych krajów. W dziewięciu rozdziałach tego tomu przedstawiono dane o roli kwasów żółciowych w patogenezie niektórych procesów chorobowych, omówiono mechanizmy molekularnej interakcji kwasów żółciowych z enzymami, opisano krótko metody oznaczania kwasów żółciowych w tkankach oraz wpływ pokarmu roślinnego na przemianę kwasów żółciowych.

W rozdziale I, omawiającym zagadnienie występowania kwasów żółciowych w mózgu, zebrano dane dotyczące najnowszych badań nad biosyntezą kwasów żółciowych przez tkankę mózgową. Tkanka mózgową jest szczególnie bogatą w cholesterol, będący zasadniczym substratem w biosyntezie kwasów żółciowych, a ponadto występują w niej prawie wszystkie enzymy uczestniczące w syntezie tych kwasów. W związku z czym można było przyjąć, że w pewnych schorzeniach powodujących wystąpienie zaburzeń w przemianie cholesterolu, może dojść do nagromadzenia się w mózgu zwiększonej ilości kwasów żółciowych (nie pochodzących z wątroby), działających jako naturalny czynnik demielinizujący włókna nerwowe.

Rozdział 2 traktuje w sposób bardzo ogólny zagadnienie metodologii izolowania i oznaczania kwasów żółciowych w tkankach. Wynika to przypuszczalnie z tego, że jest on uzupełnieniem danych zawartych w tomie 1.

Rozdział 3 poświęcony jest problemowi interakcji kwasów żółciowych z makrocząsteczkami. Kwasy żółciowe są związkami, które ze względu na swoje specyficzne właściwości fizyko-chemiczne mogą oddziaływać z różnymi biologicznie aktywnymi białkami zawartymi w komórkach wątroby, jak i w całym przewodzie pokarmowym. Aktywacja lub hamowanie enzymów, blokowanie receptorów komórkowych, wskazuje na ważną rolę kwasów żółciowych w regulacji przemian ustrojowych, zwłaszcza tych związanych z procesem przyswajania pokarmu.

W rozdziałach 4 i 5 omówiono biochemiczne i fizjologiczne mechanizmy za pośrednictwem których kwasy żółciowe uczestniczą w indukowaniu i nasilaniu już istniejących schorzeń wątroby. Z tego względu, że wszystkie reakcje syntezy i wiązania kwasów żółciowych odbywają się głównie w wątrobie, schorzenia tego narządu wpływają w sposób istotny na zmiany w składzie żółci oraz na ich zawartość w krwi krążącej. Charakter zaburzeń w przemianie kwasów żółciowych zależy od rodzaju procesu chorobowego toczącego się w wątrobie. Jedną z konsekwencji zaburzeń w przemianie tych kwasów jest tworzenie się kamieni żółciowych. Poza szczegółowym opisem mechanizmów tworzenia kamieni żółciowych, przedstawiono również dane wyjaśniające drogi, za pośrednictwem których egzogenne kwasy żółciowe mogą zapobiegać tworzeniu się kamieni.

W rozdziale 6 przedstawiono wyniki dotyczących badań nad metabolizmem kwasów żółciowych u chorych z wrodzonymi wadami metabolicznymi, dotyczącymi defektu w utlenianiu łańcucha bocznego cholesterolu. Konsekwencją tych zaburzeń jest zwiększone odkładanie się cholesterolu i cholestanu w tkankach, zwłaszcza w mózgu i ścięgnach (*Cerebrotendinous Xanthomatosis*). U chorych tych stwierdza się zmniejszenie zawartości kwasów żółciowych w żółci, a towarzyszy temu zwiększenie zawartości alkoholi żółciowych. Podanie egzogenne kwasu dezoksycholowego łagodzi ciężkość przebiegu schorzenia, co łączy się ze zmniejszeniem syntezy cholesterolu i obniżeniem jego zawartości w tkankach.

W rozdziałach 7 i 8 zebrano dane wskazujące na ważną rolę, jaką mogą odgrywać kwasy żółciowe w etiologii raka przewodu pokarmowego, a zwłaszcza jelita grubego. Wynika to między innymi z podobieństwa strukturalnego kwasów żółciowych do silnie rakotwórczego węglowodoru jakim jest 3-metylocholanren oraz faktu, że udało się dokonać konwersji kwasu dezoksycholowego w ten związek, z udziałem mikroflory jelitowej.

Rozdział 9 omawia wpływ diety roślinnej na obniżenie stężenia lipidów w surowicy krwi, poprzez stymulację zwiększonego wydalania kwasów żółciowych z kałem. Jakkolwiek mechanizm tego oddziaływania nie jest jeszcze ostatecznie wyjaśniony, przypuszcza się, że odbywa się to przez tworzenie kompleksów między kwasami żółciowymi a celulozą, hemicelulozą, ligniną i innymi składnikami włókien roślinnych, które są wydalane z organizmu.

Wydaje się, że omawiany tom 3 „The Bile Acids”, podobnie jak tomy 1 i 2 może stanowić cenne uzupełnienie wiedzy biochemika o przemianach i roli, jaką spełniają kwasy żółciowe w organizmie ludzkim. Szczególnie należy polecić go biochemikom zatrudnionym w naukowych pracowniach przyklinicznych. Być może, że przeczytanie tej książki skłoni wielu z nich do podjęcia badań w zakresie metabolizmu kwasów żółciowych, które są mało popularne wśród naszych biochemików.

W. Lutz

Methods in Membrane Biology Tom 6, red. E. D. Korn,

wyd. Plenum Press New York and London, str. 248.

Recenzowany tom omawia metody izolacji błon plazmatycznych, organelli i błon wewnątrzkomórkowych z komórek prokariotów i eukariotów. Autorzy podkreślają, jak niezwykle ważne dla poznania mechanizmów funkcjonowania organizmów jest zagadnienie otrzymywania czystych, dobrze zdefiniowanych organelli i frakcji subkomórkowych.

Autorami I rozdziału, pt. *Cell Fractionation techniques* są H. Beaufay i A. Amar-Costesce, współpracownicy prof. De Duvego z pracowni mającej ogromne zasługi w opracowaniu technik izolacji frakcji subkomórkowych. W rozdziale tym przedstawione zostały teoretyczne i praktyczne zasady izolacji frakcji subkomórkowych przy użyciu techniki wirowania różnicowego, wirowania w gradiencie gęstości oraz wirowania przy użyciu rotorów zonalnych. Autorzy podają ogólne zasady, jakimi należy się kierować przy wyborze metody homogenizacji i izolacji frakcji w zależności od rodzaju materiału zużytego do badań. Podano też metody oznaczania czystości otrzymanych frakcji wraz z krytycznym omówieniem wartości poszczególnych testów. Na przykładzie tkanki wątrobowej omówiono sposoby prezentacji interpretacji otrzymanych wyników.

Trzy następne rozdziały tomu dotyczą komórek bakteryjnych.

Komórki te posiadają prostszą budowę aniżeli komórki eukariotów. W bakteriiach gram-dodatnich szereg procesów metabolicznych zachodzi jedynie w błonie plazmatycznej i mesosomach, w bakteriiach gram-ujemnych w zewnętrznej i wewnętrznej błonie. Mimo to izolacja błon komórek bakteryjnych jest trudna ze względu na obecność ściany komórkowej. W rozdziale II pt. *Methods of isolation and characterization of bacterial membranes*, autor dr Salton omawia krytycznie użyteczność dotychczas

stosowanych metod izolacji błon z komórek bakteryjnych. Rozdział III pt. *Selection of bacterial mutants defective in fatty acid synthesis for the study of membrane biogenesis* napisany przez dr Silberta jest ciekawy z ogólno-biologicznego punktu widzenia, gdyż dotyczy badań nad mechanizmem biogenezy błon, głównie lipidowego ich składnika. Rozdział IV pt. *Isolation and characterization of membrane binding proteins* omawia rolę oraz metody izolacji tzw. białek wiążących (*binding proteins*), grupy białek o stosunkowo niskich ciężarach cząsteczkowych i posiadających odwracalną zależność wiązania substancji w specyficznych systemach transportujących.

Reasumując omawiany tom zawiera szereg wiadomości teoretycznych i metodycznych i dzięki obszernej, aktualnej literaturze jest cenną pozycją dla wszystkich badaczy zajmujących się błonami.

G. M. Sarzała

Low Density Lipoproteins red. C. E. Day, R. S. Levy

Plenum Press, New York, London 1976, 445 stron

Lipoproteidy niskiej gęstości (w skrócie LDL) odpowiadające elektroforetycznej frakcji beta lipoproteidów są główną frakcją transportującą cholesterol w osoczu. Białka te są obecnie przedmiotem bardzo intensywnych badań przede wszystkim w związku z przypisywaną im rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych. Ukazująca się ogromna ilość publikacji zarówno w czasopismach biochemicznych jak lekarskich jest prawie niemożliwa do opanowania bez opracowań tematycznych dotyczących poszczególnych dziedzin tego zagadnienia.

Omawiana książka stanowi zbiór artykułów omawiających w wyczerpujący sposób (piśmiennictwo do roku 1975 włącznie) różne aspekty badań nad lipoproteidami niskiej gęstości. W pięciu częściach zawierających razem 15 rozdziałów 16 autorów przedstawia kolejno szczegółowe dane na temat budowy i metod izolowania tych białek, ich metabolizmu w osoczu oraz komórkach człowieka. Obszerna część książki omawia genetycznie uwarunkowane hiperlipoproteinemie oraz α - β -lipoproteinemię — wrodzony brak LDL. W równie obszernej części zestawione są dane na temat lipoproteidów niskiej gęstości u różnych gatunków ssaków i kręgowców niższych grup. Osobna część dotyczy związku lipoproteidów niskiej gęstości z miażdżycą. W różnych częściach książki omówiono wymianę fizykochemiczną lipidów w układach biologicznych, polimorfizm genetyczny LDL, reakcje lipoproteidów ze związkami drobno i wielkocząsteczkowymi, wpływ wysiłku fizycznego na lipidy i lipoproteidy osocza i możliwości farmakologicznego leczenia hiperlipoproteinemii.

Na specjalną uwagę zasługują następujące rozdziały: Eisenberga o syntezie LDL, ich metabolizmie i regulacji ze względu na zwierzę, syntetyczne ujęcie zagadnienia, Kostnera o polimorfizmie genetycznym — reasumujący i porządkujący liczne doniesienia na ten temat i Calverta o lipoproteidach niskiej gęstości u różnych ssaków — ze względu na wyjątkowo obszerne zestawienie literatury.

Omawiane wydawnictwo w zasadzie nie zajmuje się innymi frakcjami lipoproteidowymi, jednak ze względu na bardzo ściśle powiązania zarówno metaboliczne jak i metodyczne zagadnienia te trudno całkowicie rozdzielić i w praktyce czytelnik znajdzie bardzo dużo informacji dotyczących również lipoproteidów wysokiej gęstości (HDL lub alfa lipoproteidów) oraz metabolizmu wszystkich lipoproteidów osocza.

Metabolizm LDL wciąż jeszcze zawiera bardzo wiele nie wyjaśnionych punktów. Przedstawiony w książce schemat stanowi jedynie hipotezę roboczą, do której bardzo dużo argumentów dostarczają badania nad stanami patologicznymi zwłaszcza genetycznie uwarunkowanymi wadami metabolizmu — hiperlipoproteinemiami i innymi. Zagadnienie wzajemnego oddziaływania lipoproteidów i komórek jest bardzo istotne w procesach regulacji syntezy cholesterolu i ściśle związane z przyczynami powstawania miażdżycy. Sprawa odkładania lipidów w komórkach ściany naczyniowej poruszana jest w wielu rozdziałach omawianego wydawnictwa.

Książka wydana jest bardzo starannie. Stanowi bardzo cenną pozycję dla biochemików zajmujących się lipoproteidami osocza, dla zakładów biochemii klinicznej i dla lekarzy internistów i neurologów.

H. Wehr

SPIS TREŚCI

M. Szymona — Polimorfizm białek drobnoustrojowych ze szczególnym uwzględnieniem heksokinaz	3
B. Broniszewska-Ardelt — Heksokinaza mózgu	15
I. Pietrzykowska — Mechanizmy mutageny indukowanej a procesy reoperacji DNA	27
A. K. Drabikowska — Oddychanie niewrażliwe na cyjanek	59
K. Kasman — Budowa grubego filamentu mięśnia szkieletowego	77
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemiczne podstawy cytotoksycznego działania ametoptyryny	93
Sprawozdania	117
Recenzje	119

POSTĘPY BIOCHEMII

March 1978

ARTICLES IN POLISH

Volume 24

Number 1

M. Szymona — Polymorphism of Proteins in Microorganisms with Particular Consideration of Hexokinases (Dept Biochem., Inst. Basic Chemical Sci., Med. School, Lublin)	3
B. Broniszewska - Ardel't — Brain Hexokinase (Dept Neurochem., Exp. and Clin. Med. Centr., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	15
I. Pietrzykowska — Mechanisms of Induced Mutagenesis and DNA Repair (Dept Mol. Biol., Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa) .	27
A. K. Drabikowska — Cyanide-Insensitive Respiration (Dept Gen. Genetic, Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	59
K. Kasman — Structure of Skeletal Muscle Thick Filament (Dept Cellular Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	77
M. Manteuffel-Cymborowska — Biochemistry of Cytotoxicity of amethopterin (Dept Cellular Biochem., M. Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	93
Meeting Reports	117
Book Reviews	120

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

rocznie zł 80.—

półrocznie zł 40.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa-Książka-Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele w terminach:

- do dnia 25 listopada na styczeń, I-szy kwartał, I-sze półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienia w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”.

Zakłady pracy w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW oraz prenumeratorki indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki z a g r a n i c ę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Wydawnictw Naukowych PAN-Ossolineum-PWN, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter) 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

A subscription order stating the period of time, along with the subscriber's name and address can be sent to your subscription agent or directly to Foreign Trade Enterprise Ars Polona-Ruch, 00-068 Warszawa, 7 Krakowskie Przedmieście, P.O. Box 1001, Poland. Please send payments to the account of Ars Polona-Ruch in Bank Handlowy S.A., 7 Traugutt Street, 00-067 Warszawa, Poland.

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. Biophys. 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 autora(ów), rok wydania, tytuł książki, nazwisko(a) i inicjały jej redaktorów(a), tom, pierwszą i ostatnią stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

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

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

Załączniki: Każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk 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 wzorów cyframi rzymskimi. Fotografie czarno-białe (kontrastowe) powinny być wykonane na papierze matowym. Pozostałe ryciny należy wykonać tuszem na białym papierze lub na kalce technicznej. Wymiar ryciny nie powinien być mniejszy niż 10×15 cm, a naniesione linie nie powinny być cieńsze niż 1 mm. Ramki obejmujące wykresy można wykonać linią cieńszą niż linie właściwe wykresu. Cyfry i litery służące do opisu rysunku powinny mieć wysokość nie mniejszą niż 5 mm. Na rysunkach nie należy umieszczać opisów słownych, lecz posługiwać się skrótami. Osie wykresów natomiast winny być opatrzone napisem łatwo zrozumiałym. Dla oznaczenia punktów doświadczalnych można stosować następujące symbole: ○ □ △ ● ■ ▲. Rycinę należy opatrzyć na odwrocie oznaczeniem „górną” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

SPIS TREŚCI

M. Szymosa — Polimerizacja białek drobnoustrojów ze szczególnym uwzględnieniem heksokinazy	3
B. Broniszewska-Ardell — Heksokinaza mózgu	15
I. Pietrzykowska — Mechanizmy mutageny indukcji i powstania replacji DNA	27
A. E. Drabikowska — Oddychanie niewrszliwa na cyjanas	59
E. Kasman — Budowa grubego włókna mięśnia szkieletowego	77
M. Wartenffel-Cyborowska — Biochemiczne podziały cyklu życiowego drążenia amebopierony	93
Sprawozdania	117
Recenzje	119