

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

PSTBAH 24 (2)  
129-283 (1978)

1978

tom 24 nr 2



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 koreczie (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 koreczie 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 mierszy 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 wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyrfami 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.

*Dr. Wojciech Rode*

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

# Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1978 TOM 24 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową  
Polskiej Akademii Nauk

Psibah 24(2)  
(129-288) (1978)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>



## RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumiel (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa), D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

## REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

## ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

## SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

CZŁONKOWIE REDAKCJI: B. Czartoryska (Warszawa), E. Czuryło (Warszawa), J. Skangiel-Kramska (Warszawa), J. Zborowski (Warszawa)

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne

ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1977

Nakład 2.250 (2.145+105)

Ark. wyd. 12,25, ark. druk. 10,0

Pap. druk. sat. kl. V, 70 g, 70×100

Zam. nr 119/78 S-80

Oddano do składania 18.I.78 r.

Podpisano do druku w maju 1978 r.

Druk ukończono w maju 1978 r.

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

JANINA KWIATKOWSKA \*)

## Rozwój poglądów na mechanizmy regulacji metabolicznych\*\*

### Mechanisms of Metabolic Regulation: Development of Concepts

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Regulacja aktywności enzymów
  - II-1. Ograniczona proteoliza
  - II-2. Regulacja allosteryczna
  - II-3. Transport metabolitów przez błony biologiczne
  - II-4. Modyfikacja kowalencyjna
- III. Regulacja syntezy białka
  - III-1. Modyfikacja kowalencyjna
  - III-2. Udział hormonów sterydowych
  - III-3. Koncepcja „funkcjonalnej jednostki genetycznej”
  - III-4. Wpływ impulsów nerwowych
- IV. Regulacja wzrostu komórek przez czynniki surowicze

#### Contents

- I. Introduction
- II. Regulation of enzyme activity
  - II-1. Limited proteolysis
  - II-2. Allosteric regulation
  - II-3. Transport of metabolites across biological membranes
  - II-4. Covalent modification
- III. Regulation of protein synthesis
  - III-1. Covalent modification

\*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii, Akademia Medyczna, Chalubińskiego 10, 50-368 Wrocław

\*\*) Wykład wygłoszony podczas sesji otwarcia XV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego 24 września 1977 roku w Gdańsku

Wykaz stosowanych skrótów: ATP — trójfosforan adenozyiny; cAMP — cykliczny nukleotyd adenylowy; cGMP — cykliczny nukleotyd guanylowy; Glu-6-P — glukoza-6-fosforan; UTP — trójfosforan cytydyny; UDPG — urydyldwufosfoglukoza; NAD i NADH — dwunukleotyd nikotynamidoadeninowy i jego forma zredukowana; Acetylo-CoA — acetylo-koenzym A; IF-E<sub>2</sub> — czynnik inicjacji eukariotycznych organizmów.

**III-2. The role of steroid hormones****III-3. The concept of a functional gene unit****III-4. Influence of nerve impulses****IV. Regulation of cell growth by serum factors****I. Wstęp**

W niniejszym artykule pokazano ogólny obraz mechanizmów i sposobów, wykorzystywanych w regulacji przemian w organizmach eukariotycznych. Należy uprzedzić czytelnika, że nie przedstawiono tu rozwoju naszych obecnych pojęć o regulacji w formie systematycznego, chronologicznego przeglądu kolejnych odkryć i powstałych na ich podstawie teorii i hipotez. Starano się natomiast podkreślić pewne właściwe procesom regulacyjnym cechy, kształtujące nasze poglądy. Pierwszą z tych cech, ułatwiającą poznanie, lecz prowadzącą często do uproszczeń, jest jedność i powszechność mechanizmów regulacyjnych. Takie same mechanizmy kontrolne występują bowiem nie tylko w różnych ciągach metabolicznych, ale i w różnych typach regulacji, a więc zarówno w kontroli aktywności, jak i syntezy poszczególnych enzymów, czy aktywności enzymu i transportu produktów jego działania przez błony. Zazwyczaj wykrycie jakiegoś określonego sposobu regulacji powoduje napływ informacji o występowaniu tego mechanizmu w wielu procesach metabolicznych. Często jednak w ślad za pierwszymi sukcesami zaczynają się mnożyć spostrzeżenia, powodujące powstanie rys na klarownym — jak się zdawało — obrazie. Przeważnie nie podważają one istoty danego mechanizmu, ale nakazują ostrożność w ocenie jego wagi w całokształcie zagadnień regulacji i przestrzegają przed pochopnymi uogólnieniami.

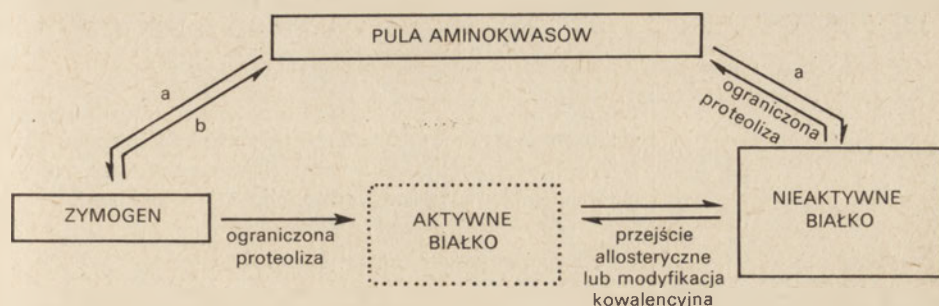
Dochodzi tu do głosu druga cecha biologicznych układów regulatorowych, która czyni je niezmiernie precyzyjnymi i elastycznymi, ale zarazem i bardzo skomplikowanymi. Cecha ta wyraża się zaopatrzeniem głównych układów regulacji w nadrzędne, lub równoległe mechanizmy kontroli. Nauka dostrzega je naogół później, w sposób mniej pełny, pełen luk i niedomówień. O ileż później niż same harmonie poznano regulację ich syntezy, a także regulację wydzielania hormonów przez czynniki podwzgorza. Do kontroli regulacji należy zaliczyć układy usuwające regulatory oraz ich „wtórne sygnały” (np. cykliczne nukleotydy) z komórek i płynów ustrojowych. Należą tu też mechanizmy, powodujące powrót cząsteczki białkowej, zmienionej przez regulator, do stanu wyjściowego (np. fosfatazy enzymów regulowanych przez fosforylację).

Omawiając różne „techniki” regulacyjne pominięto działanie jonów. Różnorodność i powszechność ich działania we wszystkich procesach metabolicznych uniemożliwia wprowadzenie tego zagadnienia do niniejszego artykułu bez szkody dla jego jasności. Udział jonów w regulacji powinien stanowić temat odrębnego przeglądu.



## II. Regulacja aktywności białek

Na rycinie 1. pokazano prosty schemat mechanizmów regulujących aktywność białek. Wyróżnić w nim można działania nieodwracalne, polegające na ograniczonej proteolizie, oraz odwracalne, takie jak regulacja allosteryczna, agregacja czy modyfikacja kowalencyjna.



Ryc. 1. Główne mechanizmy kontrolne aktywności enzymatycznej (1, zmodyfikowane).

### II-1. Ograniczona proteoliza

Aktywowanie proenzymów, prohormonów oraz innych nieczynnych białek w drodze hydrolizy określonych wiązań peptydowych okazało się daleko bardziej rozpowszechnione, niż sądzono do niedawna. Liczba znanych białek uczynnianych w ten sposób wzrasta bardzo szybko (patrz. Tabela 1).

Biorąc pod uwagę niedoskonałość metod wydzielenia białek z materiału biologicznego można przypuszczać, że wiele enzymów otrzymujemy już po proteolizie. Ulegają jej na ogół wiązania peptydowe, umieszczone N-terminalnie w stosunku do obszaru aktywnego białka, położone w pętach znajdujących się na powierzchni cząsteczki. Aktywacja zymogenu jest często dodatkowo kontrolowana przez umieszczenie zymogenu i aktywatora w różnych częściach komórki, a nawet w różnych tkankach. Aktywacja nosi charakter jedno- lub wielostopniowy. Przykładem dwustopniowej aktywacji jest uczynnianie chymotrypsynogenu, proelastazy, prokarboksypeptydazy i profosfolipazy przez trypsynę, powstałą uprzednio z protrypsyny pod wpływem enterokinazy. Wielostopniowe kaskady, podległe samoregulacji mają miejsce w procesie krzepnięcia i w układzie komplementu. Proteoliza może też zachodzić dwukrotnie w jednej uczynnianej cząsteczce, tak jak to się dzieje w przypadku preproenzymów i preprohormonów trzustki. Dodatkowy peptyd na N-końcu łańcucha polipeptydowego ulega odszczepieniu przy przejściu przez błonę endoplazmatyczną i w wyniku tej proteolizy powstaje proenzym.

Usunięcie peptydu z proenzymu narusza, jak się wydaje równowagę sił, dyktującą określoną konformację cząsteczki. Umożliwia to przyjęcie przez białko konformacji, dogodnej dla wyrażenia się aktywności. Proteoliza może też usuwać przeszkodę przestrzenną, uniemożliwiającą dostęp substratów do obszaru aktywnego proenzymu (1).

Tabela 1

Przykłady zymogenów, przekształcanych w aktywne białka drogą ograniczonej proteolizy (1, zmodyfikowane).

Enzymy	Protyrozynaza, profenylooksydaza, prorenina, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa leukocytów, kinaza pirogronianowa erytrocytów, pepsynogen, trypsynogen, chymotrypsynogen, prochymozyna, prokarboksylaza, profosfolipaza, proelastaza
Hormony	Proinsulina, preparathormon, proglukagon
Substancje naczyniowo aktywne	Angiotensynogen, prokalikreina, kininogen
Czynniki krzepnięcia	czynnik VII, czynnik IX, czynnik X, protrombina, fVIII, fibrynogen
Czynniki fibrynolizy	Proaktywator plazminogenu, plazminogen
Układ komplementu	Propedryna, czynnik C <sub>3</sub> i C <sub>5</sub>
Czynniki rozwoju	Syntetaza prochityny, prokokonaza, prokolagenaza, proakrozyna, prokolagen

Jak wynika z obserwacji poczynionych w badaniu enzymów krwinek czerwonych, ograniczona proteoliza może brać udział w powstawaniu różnych form molekularnych enzymów. Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa jest u człowieka kodowana przez jeden gen, ale w leukocytach i erytrocytach występują odmienne formy enzymu. Różnią się one od siebie ruchliwością elektroforytyczną, punktem izoelektrycznym i właściwościami kinetycznymi. Formę erytrocytarną można uzyskać trawiąc enzym z leukocytów za pomocą karboksypeptydazy B, usuwającej C-terminalne reszty lizyny i leucyny. Forma leukocytna jest, jak się wydaje, natywnym enzymem. Występuje ona też w retikulocytach. W miarę ich dojrzewania, obok tej rodzimej formy pojawia się enzym właściwy krwinkom czerwonym, o C-terminalnej sekwencji Gly-Ala. Dominuje on w starych krwinkach czerwonych (2).

Kinaza pirogronianowa występuje w erytrocytach jako homotetramer zbudowany z 4 identycznych podjednostek, oraz heterotetramer, składający się z dwu podjednostek typu L i dwu — wykazujących większy ciężar



cząsteczkowy. Te ostatnie przechodzą po proteolizie w podjednostki formy L. Można sądzić, że kinaza pirogronianowa powstaje w krwinkach czerwonych jako prekursor, który drogą ograniczonej proteolizy przekształca się w formę L enzymu (3).

Przypuszcza się, że głównym czynnikiem kontrolującym ilość enzymu w komórce jest jego synteza. Nie jest jednak wykluczone, że ma również znaczenie rozkład cząsteczek białkowych w drodze proteolizy. Zachowanie równowagi między degradacją i powstawaniem cząsteczek jest ważne zwłaszcza w przypadkach, gdy czas półtrwania białka jest krótki. Tak rzecz ma się z enzymami glikolitycznymi mięśni szkieletowych. Warto zwrócić uwagę, że okres półtrwania fosfofruktokinazy — enzymu pełniącego kluczową rolę w regulacji glikolizy — jest o połowę krótszy, niż innych enzymów tego cyklu. Podobnie też zawartość fosfofruktokinazy jest mniejsza niż innych enzymów glikolitycznych. Wynosi ona 1,5  $\mu\text{mola/kg}$  mięśni, podczas gdy ilość izomerazy fosfoheksosowej wynosi 4,5  $\mu\text{mola/kg}$ , a kinazy pirogronianowej 17,0—63,0  $\mu\text{mola/kg}$ . Podatność białek na degradację może zależeć od stopnia ich agregacji. Monomery i dimery fosfofruktokinazy ulegają proteolizie daleko łatwiej, niż tetramery. Asocjacja i dysocjacja podjednostek fosfofruktokinazy zależy od stężeń metabolitów, pH, temperatury i stężenia białka. Warunki sprzyjające dysocjacji enzymu będą zatem powodować wzmożoną proteolizę fosfofruktokinazy i zmniejszać jej zawartość w komórce (4).

W mięśniach gładkich i szkieletowych, a także w śluzówce jelit występują proteazy działające wybiórczo na enzymy, których koenzymem jest fosfopirydoksal. Aktywność tych proteaz jest kontrolowana przez hormony, zależy także od diety. Na przykład proteaza rozkładająca fosforylaze mięśniową wykazuje silną aktywność przy diecie ubogiej w białko. Obecność fosfopirydoksalu i fosfopirydoksaloaminy chroni enzym przed trawieniem. W tkankach występują swoiste inhibitory białkowe proteaz, utrzymujące je w stanie nieczynnym. Znalezione także proteazy, działające wybiórczo na enzymy związane z koenzymami pirydynowymi (5).

## II-2. Regulacja allosteryczna

Efekty allosteryczne były przewodnim tematem badań nad regulacją metaboliczną od chwili wykrycia tego zjawiska. Możliwość zastosowania hemoglobiny w badaniach modelowych, opracowanie metod pomiarów kinetycznych i ich interpretacji, a także wydzielenie wielu enzymów regulatorowych w czystej postaci przyczyniły się do szybkiego postępu w tej dziedzinie. Obraz powstały w wyniku badań zachwycał swą zornością, logiką i ekonomicznością. Metabolity i koenzymy, powszechnie występujące w różnych ciągach przemian, jak ATP, ADP, AMP, NAD, NADH, cytrynian, acetylo-CoA i inne są zarazem substratami czy produktami oraz

regulatorami tych ciągów. Regulacja allosteryczna powoduje na ogół zmianę powinowactwa enzymu do substratu, a nie zmianę szybkości maksymalnej reakcji, co pozwala na bardzo precyzyjną regulację na styku przemian, gdy enzymy współzawodniczą o ten sam substrat. Jak się wydawało, zmiana stężeń wymienionych wyżej metabolitów może być przyczyną błyskawicznego włączania i wyłączenia z działania takich ciągów metabolicznych jak glikoliza, glikoneogeneza, synteza kwasów tłuszczowych i cykl kwasów trójkarboksylowych.

Z czasem zaczęto jednak przyglądać się bardziej krytycznie warunkom oznaczeń i kwestionować bezwzględne przenoszenie wyników doświadczeń *in vitro* na układy fizjologiczne żywej komórki. Badania prowadzono często w niefizjologicznych stężeniach substratów i metabolitów, albo w układach zbyt czystych, izolowanych od składników obecnych zawsze w żywej komórce. Co więcej, w komórkach stężenie składników ulega stałym zmianom, czego nie uwzględniano w doświadczeniach. Przykładem rewizji poglądów na regulację allosteryczną mogą służyć prace nad syntetazą cytrynianową. Enzym ten, katalizujący pierwszą reakcję cyklu kwasu cytrynowego stanowi doskonały punkt kontrolny całego cyklu. Wiadomo było, że syntetaza cytrynianowa jest bardzo podatna na działanie efektorów, do których zalicza się palmito-CoA, ATP, ADP, NADH,  $\alpha$ -ketoglutaran, bursztynylo-CoA, jony  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$ . Występują przy tym wyraźne różnice gatunkowe. Zależnie od rodzaju inhibitorów sklasyfikowano syntetazy cytrynianowe, występujące w przyrodzie na trzy grupy: 1) hamowane przez NADH i  $\alpha$ -ketoglutaran, 2) hamowane przez NADH i chronione przez AMP, 3) hamowane przez ATP. Do grupy pierwszej należą syntetazy wydzielone z bakterii gram-ujemnych, do drugiej — z pewnych szczepów bakteryjnych, do trzeciej — z organizmów eukariotycznych i bakterii gram-dodatnich. Okazało się jednak, że można tak dobrać warunki (np. niskie, lecz leżące w zakresie fizjologicznym stężenie szczawiooctanu), że syntetaza cytrynianowa z wątroby szczura jest hamowana przez NADH i ketoglutaran. W fizjologicznych stężeniach magnezu nie zachodzi hamowanie enzymu wątrobowego przez ATP; enzym z *Escherichia coli* nie jest hamowany przez  $\alpha$ -ketoglutaran w fizjologicznych stężeniach potasu. Hamowanie przez palmito-CoA nie może zachodzić w takich stężeniach enzymu i substratu, jakie występują w komórce. Stężenie jabłczanu ma duży wpływ na działanie efektorów, co może mieć istotne znaczenie wobec stosowania dehydrogenazy jabłczanowej w testach przy oznaczeniu aktywności syntetazy cytrynianowej (6).

Ulepszenie metod badawczych pozwala na wyeliminowanie wielu błędów, czynionych dawniej; drastyczny przykład syntetazy cytrynianowej wykazuje jak bardzo ostrożnym należy być przy interpretowaniu wyników doświadczeń *in vitro*. Działanie efektorów allosterycznych jest bardzo złożone i zależy ono od obecności wielu składników i czynników istniejących aktualnie w komórce. Czynniki te zmieniają się nieustannie, mo-



dyfikując efekt allosteryczny: potęgując go, osłabiając lub znosząc całkowicie.

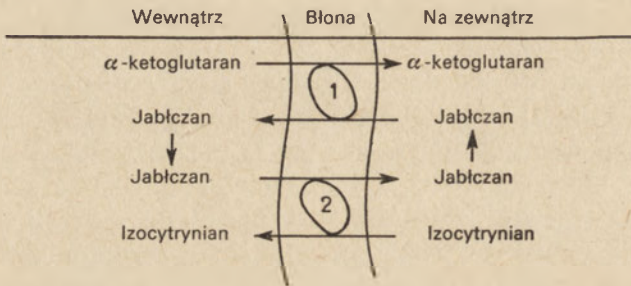
W tym miejscu należy wspomnieć o regulacji aktywności enzymów za pomocą agregacji i dysocjacji cząsteczek i podjednostek. Zjawisko to wiąże się często z efektami allosterycznymi. W pewnych przypadkach odpowiedni stan agregacji jest warunkiem działania enzymu. Na przykład nieaktywne monomery karboksylazy acetylo-CoA ulegają polimeryzacji jedynie w obecności dodatnich efektorów (cytrynianu i izocytrynianu) przechodząc w spolimeryzowany stan aktywny. Jak się wydaje, wiele enzymów może występować w różnych stopniach agregacji podjednostek lub cząsteczek, wykazując zależnie od tego całą gamę wartości aktywności swoistej. Fosfofruktokinaza z mięśni tworzy aktywne agregaty o ciężarze cząsteczkowym od 360 000 do 2 milionów, a z erytrocytów — agregaty od 380 000 do kilku lub kilkunastu milionów. Agregaty te różnią się między sobą aktywnością, powinowactwem do fruktozo-6-fosforanu, współczynnikiem Hilla, podatnością na działanie ATP jako inhibitora allosterycznego. Stan agregacji zależy od stężenia białka, od pH, stężenia substratów i efektorów i od temperatury. Kinaza pirogronianowa, wydzielona z komórek wysiękowego raka Ehrlicha (typ K enzymu), występuje w postaci subaktywnego dimeru i wysoce aktywnego tetrameru. Wzajemne przejście obu form zachodzi bardzo wolno. Alanina, która jest allosterycznym inhibitorem kinazy pirogronianowej przesuwa równowagę dimer — tetramer w stronę dimeru (7).

### II-3. Transport metabolitów przez błony biologiczne

Efektorowe działanie metabolitów zależy od ich stężenia w określonej strukturze subkomórkowej. Stężenie to zmienia się nie tylko wskutek powstania i rozpadu w przebiegu przemian, ale i wskutek transportu przez błony. Błona cytoplazmatyczna i błony ograniczające organelle komórkowe, zwłaszcza mitochondria, są wyposażone w szereg nośników, czyli translokaz, kierujących metabolity do wnętrza i na zewnątrz błony w sposób ściśle kontrolowany. Nośniki te działają na ogół systemem „handlu wiązanego”: przejście określonej substancji lub jonu przez błonę zachodzi równocześnie z przesunięciem „przeciwjonów” w kierunku przeciwnym. Na przykład translokaza kwasów dwukarboksylowych przenosi bursztynian lub jabłczan do wnętrza błony mitochondrialnej wzamian za jon fosforanowy, przenoszony na zewnątrz; translokaza kwasów trójkarboksylowych przenosi cytrynian wzamian za jabłczan;  $\alpha$ -ketoglutaran „wymieniany” jest za jabłczan i fosforan, asparaginian za glutaminian i tak dalej. Sprzężona akcja dwu lub kilku translokaz umożliwia jednoczesne przenoszenie przez błonę substancji, nie mających wspólnego nośnika (patrz, Ryc. 2).



Jak widać, sumaryczny efekt przeniesienia  $\alpha$ -ketoglutaranu na zewnątrz i izocytrynianu — do wnętrza mitochondrium zachodzi z udziałem dwu nośników, dla których „przeciwnym” jest jabłczan. W łańcuchach takich sprzężonych działań transportowych włączają się także enzymy umieszczone w cytoplazmie i w mitochondriach, co umożliwia zmianę stężeń po obu stronach błony takich metabolitów, które nie posiadają nośników. Przykładem może być tu szczawiooctan. Cytoplazmatyczny izoenzym dehydrogenazy jabłczanowej przekształca szczawiooctan w jabłczan, który po przeniesieniu do wnętrza mitochondrium ulega utlenieniu



**Ryc. 2.** Transport  $\alpha$ -ketoglutaranu i izocytrynianu przez błonę mitochondrialną  
1 — translokaza alfa-ketoglutaran : kwas dwukarboksylowy, 2 — translokaza kwas trójkarboksylowy : jabłczan.

z udziałem mitochondrialnego izoenzymu. Powstały szczawiooctan może ulegać transaminacji i transportowi w formie asparaginianu, ten zaś w cytoplazmie przechodzi znów w szczawiooctan. Odpowiednia transaminaza znajduje się zarówno w mitochondriach jak i w cytoplazmie.

Ponieważ przenoszone metabolity są nie tylko substratami, ale i efektarami enzymów, kontrolowany transport jest dodatkowym regulatorem efektów allosterycznych. Jako przykład może służyć transport cytrynianu do cytoplazmy. Staje się on tam nie tylko substratem liazy cytrynianowej, dostarczającej acetylo-CoA dla syntezy kwasów tłuszczowych, ale i aktywatorem pierwszego enzymu tej syntezy: karboksylazy acetylo-CoA. W mitochondriach cytrynian hamuje dehydrogenazę pirogronianu, a więc usunięcie jego nadmiaru do cytoplazmy będzie pobudzać powstawanie mitochondrialnego acetylo-CoA. Translokaza cytrynianu podlega działaniu efektorów. Jej inhibitorem jest acylo-CoA o długim łańcuchu węglowym. Wzrost zawartości wysokich kwasów tłuszczowych w cytoplazmie powoduje zmniejszenie powinowactwa translokazy do cytrynianu, wyrażające się 2 — 3-krotnym wzrostem wartości  $K_m$ . Nagromadzenie aktywnych kwasów tłuszczowych w cytoplazmie, mające miejsce w cukrzycy i u głodzonych zwierząt będzie zatem hamować syntezę tych kwasów, zarówno przez pozabawienie jej wyjściowego substratu, jak i dodatniego efektora — cytrynianu. W mitochondriach nastąpi zmniejszenie produkcji acetylo-CoA wskutek nagromadzenia cytrynianu (8).

#### II-4. Modyfikacja kowalencyjna

Odkrycie modyfikacji kowalencyjnej jako mechanizmu regulacji aktywności enzymatycznej stało się kolejnym wielkim wydarzeniem w biochemii. Aktywacja i hamowanie czynności enzymów przez fosforylację cząsteczki, udział cyklicznego AMP jako „drugiego sygnału” działania hormonów w tym procesie, obecność swoistych receptorów hormonów w błonach komórkowych — wszystko to otworzyło nowy rozdział w nauce o regulacji. Pomimo wielostopniowego i kaskadowego przebiegu regulacji, ogólny jej obraz wydawał się początkowo prosty i jasny. Stężenie cyklicznego AMP, jego synteza pod wpływem cykazy adenylowej i rozpad z udziałem fosfodiesterazy zdawały się decydować o przebiegu głównych ciągów przemian. Mechanizm aktywacji, polegający na przyłączeniu cyklicznego AMP do podjednostki regulatorowej i uwolnieniu aktywnej podjednostki katalitycznej okazał się wspólny dla wszystkich kinaz białkowych. We wszystkich znanych enzymach i białkach, ulegających fosforylacji pod wpływem kinaz białkowych stwierdzono istnienie podobnych sekwencji aminokwasowych, położonych N-terminalnie od fosforylowanej seryny. Zawsze znajdują się tam co najmniej dwie kolejno po sobie następujące reszty aminokwasów zasadowych. Dla przykładu podano poniżej kilka takich sekwencji (9, 10):

Kinaza fosforylazy, podjednostka beta:  $\text{Arg—Lys—Arg—Ser—Gly—}$   
<sup>100</sup>  
 Ser—P....

Kinaza fosforylazy, podjednostka alfa:  $\text{Phe—Arg—Arg—Leu—Ser—P....}$   
<sup>20</sup>

Kinaza pirogronianowa:  $\text{Leu—Arg—Arg—Ala—Ser—P....}$   
<sup>35</sup>

Inhibitor fosfatazy białkowej:  $\text{Arg—Arg—Arg—Pro—Thr—P}$   
<sup>30</sup>

Syntetaza glikogenu (obszar 2):  $\text{Lys—Arg—Ala—Ser—P....}$   
<sup>80</sup>  
 Arg

Histon H2B:  $\text{Lys—Lys—Arg—Lys—Arg—Ser—P....}$   
<sup>50</sup>

Histon 1:  $\text{Phe—Arg—Arg—Leu—Ser—P....}$   
<sup>20</sup>

Także fosfataza białkowa okazała się wspólną dla wszystkich enzymów i białek ufosforylowanych pod wpływem kinaz. Jeśli nawet istnieją różne formy molekularne tej fosfatazy (zwanej fosfatazą III), zawierają one identyczną podjednostkę katalityczną, różnią się zaś rodzajem inhibitora białkowego, związanego z tą podjednostką (11).

Stopniowo zaczęto odkrywać dodatkowe mechanizmy, uzupełniające model działania przez fosforylację i defosforylację, a stwarzające nowe możliwości regulacji. Na rycinie 3 przedstawiono schemat regulacji aktywności fosforylazy i syntetazy glikogenu.







spada aktywność kinazy fosforylasy (12). Ale to ograniczenie działania cyklicznego AMP na aktywację fosforylasy może być odraczone dzięki fosfatazie II, defosforylującej wyłącznie podjednostki alfa kinazy fosforylasy. Z fosfatazą II współdziała funkcjonalnie także inhibitor białkowy fosfatazy III. Zahamowanie funkcji tej fosfatazy przedłuża okres wysokiej aktywności kinazy fosforylasy oraz fosforylasy. Inhibitor—1 fosfatazy jest sterowany przez cykliczny AMP. Pod wpływem kinazy białkowej, zależnej od cAMP inhibitor—1 ulega fosforylacji. W tej formie hamuje on aktywność fosfatazy III. Po defosforylacji inhibitor—1 traci zdolność hamowania fosfatazy (9).

Fosfataza III jest uczynniana przez glukozę, stąd też w hyperglikemii fosforylaza glikogenu ma tendencję przechodzenia w nieaktywną, defosforylowaną formę b.

Układ syntetazy glikogenu nie zawiera odrębnej kinazy syntetazy i syntetaza jest fosforylowana bezpośrednio przez kinazę białkową, zależną od cAMP. W syntetazie tej istnieją jednak dwa obszary: 1 i 2, ulegające fosforylacji. Jedynie fosforylacja obszaru 2 powoduje spadek aktywności syntetazy. Obszar 1 ulega bardzo powolnej fosforylacji, która nie ma wpływu na aktywność enzymu. Występują tu więc pewne podobieństwa ze zróżnicowaną fosforylacją podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$  kinazy fosforylasy i nie jest wykluczone, że obecność dwu obszarów fosforylacji w syntetazie glikogenu ma też znaczenie regulacyjne (10). Syntetaza ulega fosforylacji nie tylko pod wpływem kinazy białkowej, zależnej od cAMP. Także i odrębny enzym, niezależny od cAMP fosforyluje aktywną formę a (I), przekształcając ją w nieaktywną formę  $b_2$  ( $D_2$ ). Z kolei  $b_2$  jest odmienną formą od  $b_1$  ( $D_1$ ), różni się od niej stałą aktywacji  $K_a$  wobec glukozo-6-fosforanu, oraz współczynnikiem aktywności w obecności i nieobecności tego efektora.

Syntetaza glikogenu podlega też regulacji lokalnej, niezależnej od hormonów, lecz od warunków energetycznych, panujących w komórce. Aktywacja formy b (D) przez Glu-6-P i UDPG sprawia, że w warunkach wysokoergicznych trzeba bardzo silnego bodźca adrenaliny, by unieczynnić syntetazę glikogenu. Hamowanie formy a (I) przez AMP, ADP i UDP utrudnia działanie insuliny w warunkach ubogich w energię. Podobnie fosforylaza mięśniowa b jest aktywowana przez AMP.

Fosforylacja jest jak się wydaje bardzo powszechnym mechanizmem regulacji aktywności enzymów przemiany cukrowej i tłuszczowej. Nie tylko fosforylaza, syntetaza glikogenu i lipaza, ale i fosfofruktokinaza, kinaza pirogronianowa, dehydrogenaza pirogronianowa, syntetaza kwasów tłuszczowych, karboksylaza acetylo-CoA i inne enzymy występują w formach fosfo- i defosfo- o różnej aktywności. Kinaza białkowa, niezależna od cAMP i fosfataza białkowa wchodzi w skład kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej ssaków.

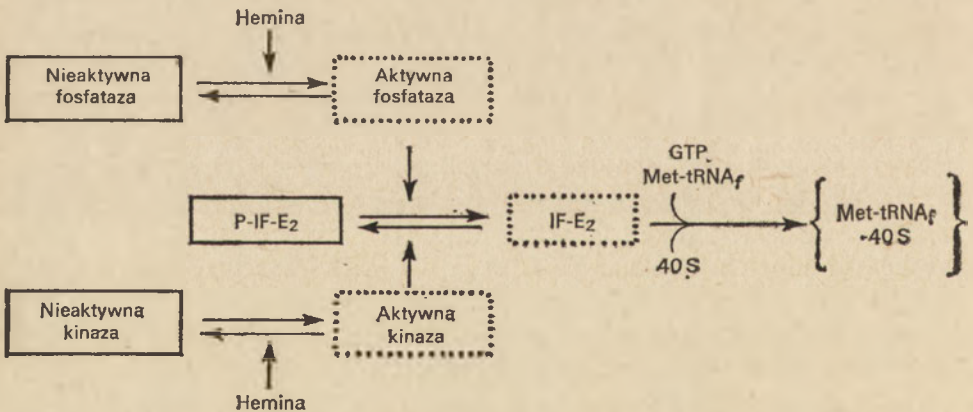
Fosforylacja jest najlepiej zbadaną modyfikacją kowalencyjną białek.

Nie ulega jednak wątpliwości, że także i metylacja i acetylacja zmieniają aktywność enzymów. Połączenie białka z RNA zmienia aktywność kinazy pirogronianowej M z mięśni ludzkich (13).

### III. Regulacja syntezy białka

#### III-1. Modyfikacja kowalencyjna

Badania prowadzone intensywnie w ciągu ostatnich lat wykazały, że modyfikacja kowalencyjna białek cytoplazmy, rybosomów i jądra jest czynnikiem regulującym różne etapy syntezy białka. Stosunkowo dobrze poznano układ aktywacji i inhibicji inicjacji syntezy globiny w retikulocytach. Białkowy czynnik inicjacji eukariotycznych organizmów — IF- $E_2$  może występować w postaci ufosforylowanej i defosforylowanej. Jedynie forma defosfo- uczestniczy aktywnie w procesie inicjacji i aktywuje go. Forma fosforylowana jest nieczynna. Wydzielono i oczyszczono kinazę białkową, niezależną od cAMP, która katalizuje fosforylację czynnika IF- $E_2$ , oraz fosfatazę, która usuwa fosforan. Obydwa enzymy znajdują się pod kontrolą heminy. Hemina aktywuje fosfatazę, a hamuje kinazę czynnika IF- $E_2$ , tym samym pobudzając syntezę globiny w retikulocytach (14). Hamowanie kinazy jest częściowo znoszone przez globinę (15). Schemat działania heminy przedstawia rycina 4:



**Ryc. 4.** Regulacja inicjacji syntezy białka przez heminę (14, 15, zmodyfikowane).

P-IF- $E_2$  — nieczynny czynnik inicjacji z organizmów eukariotycznych, (ufosforylowany);  
IF- $E_2$  — aktywny czynnik inicjacji.

Kinazę fosforylującą czynnik IF- $E_2$  wydzielono także z komórek wątroby. Wydaje się, że regulacja inicjacji przez fosforylację jest mechanizmem ogólnym, a nie tylko związanym z syntezą globiny. Aktywacja inicjacji przez heminę zachodzi w komórkach HeLa, wysiękowego raka Ehrlicha, płytkach krwi i innych komórkach (16).



Wydzielono też inną kinazę białkową, zależną od cAMP. Jest ona luźnie związana z rybosomami i katalizuje fosforylację białek podjednostki rybosomalnej 40S. Nie działa ona na czynnik IF-E<sub>2</sub>. Oddzielna fosfataza przeprowadza defosforylację białek podjednostki 40S (17). Fosforylacja białek rybosomów powoduje zmniejszenie syntezy białka. Natomiast acetylacja tych białek poprzedza i przyspiesza proces translacji (18). Nie jest wykluczone, że hamujące działanie glukagonu na elongację i terminację łańcucha polipeptydowego polega na jego wpływie na modyfikację czynników białkowych, uczestniczących w tych procesach (19).

Metylacja, acetylacja i fosforylacja białek histonowych są niezbędne dla transportu tych białek do jądra komórki oraz dla utworzenia zorganizowanej struktury chromatyny. Kowalencyjna modyfikacja histonów oraz białek niehistonowych ma związek z aktywacją i wyrażaniem genów i syntezą mRNA. W wielu przypadkach zachodzi też korelacja między działaniem hormonów na procesy transkrypcji a modyfikacją białek niehistonowych jądra (20). Kolejność procesów acetylacji i fosforylacji, kontrolowana przez aldosteron ma wpływ na aktywność polimerazy RNA. Obserwowano współzależność między fazami cyklu komórkowego i mitozą a modyfikacją białek chromatyny (18).

Współczesny stan wiedzy pozwala na stwierdzenie niewątpliwego udziału modyfikacji białek w złożonych procesach zachodzących w jądrze komórkowym, nie wyjaśnia jednak dokładnego mechanizmu regulującego to zjawisko. Na przeszkodzie stoi złożoność budowy chromatyny i różnorodność białek niehistonowych jądra, zbyt słabo dotychczas zcharakteryzowanych.

### III-2. Udział hormonów sterydowych w syntezie białka

W ciągu ostatnich lat nastąpił burzliwy rozwój nauki o mechanizmie działania hormonów sterydowych na syntezę białka (21). W zasadzie można mówić o znajomości przebiegu procesu wybiórczego wiązania cząsteczki hormonu w cytoplazmie. Znowu mamy tu do czynienia z jednolitym modelem dla wszystkich hormonów sterydowych i wszystkich komórek posiadających receptory. Nic więc dziwnego, że wykrycie receptorów estrogenu w cytoplazmie komórek macicy sprowokowało serię badań nad innymi hormonami i, że badania te zostały uwieńczone powodzeniem. Wydzielone receptory, niezależnie od ich pochodzenia tkankowego i rodzaju hormonu wykazują bardzo duże podobieństwa wzajemne pod względem budowy, właściwości, kinetyki wiązania hormonu i transformacji cząsteczki zachodzącej po przyłączeniu hormonu. Istniejące różnice nie są istotne i związane są ze specyfiką tkankową (22).



Należy podkreślić, że wobec dostępności efektora — hormonu steroidowego — dla całego organizmu, punkt ciężkości regulacji wybiórczego jego działania jest przesunięty w stronę obecności odpowiednich receptorów w komórkach. Podobnie rzecz ma się w przypadku hormonów posiadających receptory w błonach komórkowych i działających przez cAMP.

Mechanizm działania kompleksu receptor-hormon po wniknięciu do jądra jest wciąż niejasny i kontrowersyjny. W wielu przypadkach stwierdzono, że kompleks ten wiąże się wybiórczo z frakcją białek nie-histonowych, określaną jako  $AP_3$ . Przeniesienie białek tej frakcji z chromatyny komórek wrażliwych na określony hormon do chromatyny komórek niewrażliwych, nie wykazującej zdolności wiązania kompleksu receptor—hormon, nadaje tej chromatynie zdolność akceptorową względem kompleksu. Usunięcie frakcji  $AP_3$  z izolowanej chromatyny, pochodzącej z komórek wrażliwych na hormon, pozbawia ją zdolności wiązania kompleksu receptor—hormon. Stwierdzono, że kompleks receptor—hormon wnika do jądra jako dimer, w którym obie podjednostki cząsteczki białkowego receptora są związane z hormonem. Funkcja obu podjednostek jest jednak odmienna. Okazało się, że po dysocjacji dimeru podjednostka B wykazuje powinowactwo do frakcji  $AP_3$  chromatyny, a podjednostka A — do DNA pozbawionego białek. Dało to podłoże dla hipotezy, zgodnie z którą dimer łączy się z frakcją  $AP_3$  przez podjednostkę B, po czym uwalnia się podjednostka A. Łączy się ona z odcinkiem DNA, „wskazanym” przez odpowiednio zlokalizowane białko frakcji  $AP_3$ , po czym następuje wyrażenie się genu.

Także tyroksyna ma w chromatynie białko akceptorowe. Nie zostało ono jeszcze wydzielone i zcharakteryzowane, ale wiadomo, że wiąże się ono z wolną tyroksyną i jej pochodnymi, a nie z kompleksem receptorowym z cytoplazmy. Przeprowadzono interesujące badania modelowe wiązania tyroksyny z prealbuminą. Jest to jedno z dwu białek surowicy krwi, odznaczających się wysokim powinowactwem do tyroksyny. Prealbumina ma dwa obszary wiążące hormon, umieszczone wewnątrz kanału biegnącego wzdłuż cząsteczki. Inne obszary wiążące wykazują silne powinowactwo do DNA, wiążąc się z odcinkiem 10—12 par nukleotydów o określonej sekwencji. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że również akceptor jądrowy tyroksyny posiada centra wiążące tyroksynę i odcinek DNA, a przyłączenie hormonu wpływa na odsłonięcie genu (23).

Innym możliwym akceptorem wolnych hormonów lub kompleksów receptor—hormon są rybonukleinowe cząstki (RNP) jądra, zawierające prekursorzy mRNA. Wiążą one androgeny, estrony, glukokortykoidy i tyroksynę. Nie ustalono, czy hormony wiążą się alternatywnie albo z białkami chromatyny, albo z RNP, czy też najpierw z chromatyną, a następnie z RNP (24).

### III-3. Koncepcja „funkcjonalnej jednostki genetycznej”

Badania przeprowadzone w wielu pracowniach wykazują, że w organizmach eukariotycznych zachodzi równoczesna, zapewne wspólnie regulowana represja i derepresja kilku lub kilkunastu enzymów, działających w jednym cyklu przemian. Zjawiska takie mają miejsce przy adaptacji organizmu do diety i warunków środowiska, przy przejściu od życia płodowego do pozapłodowego, w regenerujących tkankach, a także w rosnących tkankach nowotworowych. Nie ulega wątpliwości, że chodzi tu o regulację syntezy białek, a nie ich aktywności. Dotyczy to zarówno oddzielnych enzymów, jak i izoenzymów. Wydaje się, że w organizmach eukariotycznych nie ma jednostek strukturalnych, odpowiadających operonom bakteryjnym. Często obserwuje się jednoczesne sterowanie syntezą kilku enzymów, których geny znajdują się w różnych chromosomach. Weber wprowadził pojęcie „funkcjonalnej jednostki genetycznej”. Jako jeden z pierwszych wykazał on, że synteza węzłowych enzymów przemiany cukrowej i nukleotydowej zachodzi równocześnie, z jednakową intensywnością, w obrębie jednego toru metabolicznego w przebiegu ontogenezy. Wszystkie enzymy glikolizy, zwłaszcza enzymy regulatorowe wykazują niskie stężenie w wątrobie płodu. Przy urodzeniu szczura poziom ich wynosi około połowę wartości występującej w wątrobie dorosłych zwierząt. Proces syntezy tych enzymów nasila się gwałtownie w wieku 18—21 dni, zawartość ich w wątrobie osiąga normę około 60 dni po urodzeniu. Odwrotnie, enzymy glukoneogenezy (karboksylaza pirogronianowa, fosfataza fruktozo-1, 6-bis-fosforanowa, fosfataza glukozo-6-fosforanowa) są energicznie syntetyzowane w wątrobie płodu, szczyt nasilenia syntezy wszystkich tych enzymów przypada na 5-ty dzień życia pozapłodowego, po czym następuje spadek syntezy. W tej jednoczesnej represji i derepresji enzymów biorą zapewne udział hormony. Po wywołaniu cukrzycy u zwierząt dorosłych następuje gwałtowny spadek ilości enzymów glikolitycznych i wzrost — glukoneogenetycznych. Podanie insuliny wywołuje odwrotny efekt. Weber obserwował też podobne regularności w syntezie enzymów rozpadu i syntezy kwasów nukleinowych podczas ontogenezy i wzrostu nowotworów (25). Spostrzeżenia Webera znalazły potwierdzenie w bardzo wielu pracach, w których badano ekspresję genów u rosnących organizmów, w różnych tkankach nowotworowych i u nosicieli guzów. Istnieje wyraźna zależność między jednoczesną represją izoenzymów całego ciągu przemian, na przykład glikolizy, charakterystycznych dla tkanki dorosłej i derepresją form płodowych, a stopniem zróżnicowania tkanki i złośliwością nowotworów (26, 27).

Jak jednak zachodzi taka regulacja, skoro nie ma mowy o dosłownym strukturalnym odpowiedniku operonu? Na ten temat istnieją jedynie mniej lub bardziej pomysłowe hipotezy, brak jednak faktycznych danych.



Koncepcja Brittena i Davidsona zakłada istnienie specjalnych odcinków DNA, tzw. obszarów sensorowych, które są pobudzane przez efektory, na przykład hormony. Po przyłączeniu efektora do sensora następuje odblokowanie innej części łańcucha DNA — integratora, na matrycy którego powstaje swoisty RNA. Ten RNA dopiero pobudza właściwy gen strukturalny. Jednoczesne działanie efektora na kilka genów strukturalnych mogłoby zachodzić dzięki wpływowi jednego sensora na kilka integratorów (28).

#### III-4. Wpływ impulsów nerwowych na syntezę białka

Nerwowa regulacja przemian znana była w fizjologii już w początkach jej rozwoju, ale molekularne mechanizmy tego procesu, zwłaszcza jeśli chodzi o regulację syntezy enzymów, są nadal bardzo mało poznane. Wiadomo, że w dorosłej tkance mięśniowej przecięcie nerwów wywołuje powrót do profilu enzymatycznego, obserwowanego w mięśniach płodów. W tkance mięśniowej płodu aktywność heksokinazy, dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej i 6-fosfoglukonianowej jest znacznie wyższa niż w mięśniach dorosłych zwierząt. Jest ona zlokalizowana u płodu głównie w cytoplazmie komórek mięśniowych, u dorosłych zaś w mitochondriach. Po przecięciu nerwów obserwuje się wzrost aktywności wymienionych enzymów głównie w frakcji cytoplazmatycznej. Efekt ten nie zachodzi po podaniu aktynomycyny D (29). Zmiana profilu enzymatycznego zachodzi też po unerwieniu mięśni „szybkich”, takich jak vastus, rectus femoris i inne nerwami mięśni „powolnych”, na przykład soleus. Mięśnie „powolne” charakteryzuje wysoka aktywność enzymów cyklu Krebsa i  $\beta$ -oksydacji kwasów tłuszczowych oraz niska — enzymów glikolizy i glikogenolizy. Mięśnie „szybkie” zawierają duże stężenia enzymów glikolitycznych, niskie zaś — utleniających. Po inervacji krzyżowej mięśnie „szybkie” wykazują wysoką aktywność enzymów cyklu Krebsa i niską — glikolitycznych, zaś mięśnie „powolne” — wzrost aktywności enzymów glikolizy i spadek — enzymów procesów tlenowych (4).

#### IV. Regulacja wzrostu komórek przez czynniki surowicze

Pomimo znacznego postępu w nauce o regulacjach metabolicznych, wiedza o kontroli procesów tak złożonych jak wzrost, podział i różnicowanie tkanek znajdują się w pierwszych etapach poznania. Nie ulega wątpliwości, że procesy te zależą w dużej mierze od hormonu wzrostu, ale wielostronność jego działania z jednej strony i brak precyzyjnych metod badania z drugiej — utrudniają wyjaśnienie mechanizmu jego czynności. Ostatnio dopiero poczyniono pewien postęp w tej dziedzinie. Wy-



kryto mianowicie czynniki peptydowe surowicy krwi, będące pośrednikami działania hormonu wzrostu. Już dawniej było wiadomo, że surowica zawiera „insulinopodobne” ciała, działające podobnie jak insulina na przemianę tkanki tłuszczowej, lecz znacznie silniej od niej pobudzające wzrost kultur tkankowych. Dodanie surowicy do kultury fibroblastów powoduje wzrost pobierania glukozy i wcielenie znakowanego uracylu w RNA, tyminy — w DNA, aminokwasów — w polipeptydy i siarczanu — w sulfoglikany, a także zwiększenie intensywności syntezy DNA. Pod wpływem surowicy następuje też spadek ilości cAMP i wzrost — cGMP w komórkach; cGMP pobudza komórki do mitozy, natomiast cAMP hamuje wzrost komórek we wczesnej fazie  $G_1$  i  $G_2$  (30).

Wydzielone peptydy nazwano somatomedynami A,  $A_1$ , B, C albo peptydami o działaniu NSILA (*nonsuppressible insulin-like activity*). Substancje te mają swoiste receptory w błonach komórkowych. Opracowana przez Halla radioreceptorowa metoda pozwala na ilościowe oznaczenie zawartości somatomedyn w surowicy. Jak się okazało, ich ilość jest niższa od prawidłowej w niedoczynności przysadki, a u osób cierpiących na akromegalię przekracza 10-krotnie poziom prawidłowy (31). Stosując do sączenia molekularnego Sephadex G-75 i Dowex 50, oraz wysokonapięciową elektroforezę oczyszczono somatomedynę A. Jest ona obojętnym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 7000 daltonów, działającym na kultury fibroblastów podobnie jak cała surowica. Somatomedyna B o masie cząsteczkowej 5000 daltonów jest kwaśnym polipeptydem (32). W innej pracowni wydzielono somatomedynę C, polipeptyd bogaty w argininę, pobudzający komórki do mitozy i wcielenie tyminy w DNA (33). Receptory somatomedyn są odmienne od receptorów insulinowych w błonach komórek. Opisane przez wielu autorów „insulinopodobne” działanie surowicy nie jest hamowane przez przeciwciała antyinsulinowe i ma związek z polipeptydami o budowie podobnej do insuliny, lecz o odmiennych receptorach błonowych. Połowa pierwszych 30 reszt aminokwasowych peptydu o działaniu NSILA, wydzielonego z surowicy jest identyczna z aminokwasami łańcucha B cząsteczki insuliny. W odróżnieniu od somatomedyn polipeptydy o działaniu NSILA nie pobudzają wbudowywania siarczanu w sulfoglikany chrząstki. To kryterium różnicowania somatomedyn i peptydów o działaniu NSILA stało się jednak mało istotne, gdyż okazało się, że oczyszczone somatomedyny okazują jedynie słaby wpływ na ten proces, a z kolei peptydy o działaniu NSILA nabywają tę cechę pod wpływem czynnika zawartego w surowicy. Jak się więc wydaje, wcielenie siarczanu zależy od innego niż somatomedyny i peptydy o działaniu NSILA, czynnika surowiczego stanowiącego zanieczyszczenie surowych preparatów. Można przypuszczać, że somatomedyny i peptydy o działaniu NSILA są ze sobą blisko spokrewnione, a może stanowią odmiany tej samej cząsteczki. Peptydy o działaniu NSILA, somatomedyny A i C mają w surowicy nośnik białkowy, z którym się wiążą. Identycz-

ność, względnie podobieństwa strukturalne somatomedyn zostaną prawdziwie poznane dopiero po oznaczeniu pełnej sekwencji aminokwasowej tych polipeptydów (34).

Odkrycie i wydzielenie tych substancji jest bez wątpienia krokiem w przód w tej dziedzinie nauki i budzi nadzieję, że ułatwi zrozumienie mechanizmów regulujących procesy wzrostu.

Artykuł otrzymano 26.11.1977; po rewizji autorskiej przyjęto 23.12.1977.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Neurath H., Walsh K., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3825—3832
2. Kahn A., Bertrand O., Cottreau D., Boivin P., Dreyfus J. C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 65—72
3. Marie J., Garreau H., Kahn A., (1977), *FEBS Letters*, **78**, 91—94
4. Pette D., Dölken G., (1974), *Adv. Enz. Regul.* **13**, 355—378
5. Katunuma N., Katsunuma T., Kaminami E., Suzuki K., Hamaguchi Y., Chichibu K., Kabayashi K., Shiotani T., (1972), *Adv. Enz. Regul.*, **11**, 37—52
6. Srere P., (1970), *Adv. Enz. Regul.*, **9**, 221—232
7. Hofmann E., Kurganov B. I., Schellenberger W., Schultz J., Sparman G., Wenzel K. W., Zimmermann G., (1974), *Adv. Enz. Regul.*, **13**, 247—277
8. Halperin M., Cheema-Dhali S., Taylor W. T., Fritz I., (1974), *Adv. Enz. Regul.*, **13**, 235—244
9. Cohen P., Rylatt D., Nimmo G., (1977), *FEBS Letters*, **76**, 182—186
10. Proud Ch. G., Rylatt D. B., Yeman S. J., Cohen P., (1977), *FEBS Letters*, **80**, 435—447
11. Kabayashi M., Kato K., (1977), *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 93—97
12. Rubin Ch., Rosen O., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 831—887
13. Baranowska B., Baranowski T., (1977), *Mol. Cell. Biochem.*, **16**, 43—48
14. Hamlyn P., (1976), *Nature*, **263**, 274—275
15. Hirsch J. D., Martello O. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 926—932
16. Delaunay J., Ranu R. S., Levin D. L., Ernst V., London J. M., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2264—2268
17. Traugh J. A., Sharp S. B., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3738—3744
18. Gornall A., Choong. Chin L., (1973), *Adv. Enz. Regul.*, **12**, 266—285
19. Ayuso-Parilla M. S., Martin-Requero A., Perez-Diaz J., Parilla R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7785—7790
20. Famulski K. S., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 379—397
21. Zakrzewski K., (1975) w *Biomolekularne podstawy interakcji hormon—kormórka*, red. A. Dawidowicz, str 7—24, PZWL, Warszawa
22. Cochet C., Job D., Dhien A., Chambaz E. M., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 1—9
23. Blake C.C.F., Oatley S. J., (1977), *Nature*, **268**, 115—120
24. Defer N., Sabatier M. M., Kruh J., (1977), *FEBS. Letters*, **76**, 320—324
25. Weber G., Queener S. F., Ferdinandus J. A., (1970), *Adv. Enz. Regul.*, **9**, 63—95
26. Dahlig E., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 527—555
27. Kwiatkowska J., (1976), *Post. Hig. Med. Dośw.*, **30**, 49—78

28. Britten R. J., Davidson E. H., (1969), *Science*, **165**, 349—357
29. Ilyin V. S., Razumovskaja N. I., Usatenko M. S., (1974), *Adv. Enz. Regul.*, **13**, 219—234
30. Pastan I., (1975), *Adv. Metabol. Disorders.*, **8**, 7—16
31. Sievertsson H., Frykland L., Uthne K., Hall K., Westmark B., (1975), *Adv. Metabol. Disorders.*, **8**, 47—60
32. Hall K., Takano K., Frykland L., Sievertsson H., (1975), *Adv. Metabol. Disorders.*, **8**, 19—46
33. van Wyk J. J., Underwood L. E., Baseman J. B., Hintz R. L., Clemmonds D. R., Marshall E., (1975), *Adv. Metabol. Disorders*, **8**, 127—148
34. Shields R., (1977), *Nature*, **267**, 308—310



## INFORMACJA W SPRAWIE STYPENDIÓW NA UDZIAŁ W XI MIĘDZYNARODOWYM KONGRESIE BIOCHEMICZNYM

Międzynarodowa Unia Biochemiczna i Komitet Organizacyjny XI Międzynarodowego Kongresu Biochemicznego (Toronto, 8—14 lipca 1979 r.) zawiadamiają, że istnieje możliwość uzyskania przez młodych biochemików częściowego pokrycia kosztów przejazdu i uczestnictwa w Kongresie. Stypendium obejmować będzie w zasadzie zwrot połowy kosztów podróży (samolot, klasa ekonomiczna) oraz pewną sumę na koszty pobytu w Toronto. Ponadto osoby, którym przyznano stypendia, zwolnione będą z wpisowego.

Podania o przyznanie stypendium należy kierować w 3 egzemplarzach nie później niż do 1 października 1978 r. na adres:

Professor S. P. Datta  
Department of Biochemistry  
University College London  
Gower Street  
London WC1 6BT  
Anglia

Podania powinny zawierać następujące informacje:

1. Imię, nazwisko i datę urodzenia
2. Narodowość
3. Miejsce pracy i pełny adres
4. Rodzaj pracy (nature of work)
5. Listę publikacji
6. Czy kandydat spodziewa się pomocy finansowej z innych źródeł (np. zwrot kosztów przejazdu)
7. Nazwiska trzech osób mogących wystawić opinię wnioskodawcy, przy czym zalecane jest, aby jedna z nich pochodziła z innego kraju.

Wnioskodawca winien we własnym zakresie skontaktować się z podanymi przez siebie referentami (patrz punkt 7) i prosić ich, by swe opinie przesłali na adres prof. Datty przed 1 października 1978 r.

JOANNA RYTKA \*)

## Genetyczna regulacja metabolizmu w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*

### Genetic Regulation of Metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Katabolizm galaktozy
  - II-1. Geny struktury
  - II-2. Genetyczna regulacja indukcji enzymów katabolizujących galaktozę
  - II-3. Funkcja genu *GAL4*
  - II-4. Funkcja genu *GAL3*
- III. Biosynteza histydyny
  - III-1. Geny struktury
  - III-2. Charakterystyka regionu *HIS4*
  - III-3. Regulacja biosyntezy histydyny
    - III-3-1. Hamowanie zwrotne
    - III-3-2. Represja syntezy enzymów biosyntezy histydyny
- IV. Genetyczna współregulacja biosyntezy aminokwasów w komórkach *S. cerevisiae*
  - IV-1. Mutanty o konstytutywnym poziomie enzymów biosyntezy histydyny, argininy, tryptofanu i lizyny
  - IV-2. Mutanty niezdolne do derepresji enzymów syntezy histydyny, argininy, tryptofanu i lizyny
  - IV-3. Model genetycznej współregulacji biosyntezy aminokwasów w komórkach *S. cerevisiae*
- V. Kataboliczna represja glukozowa
  - V-1. Pozytywna kontrola indukowalnej syntezy enzymów u bakterii
  - V-2. Genetyczna kontrola katabolicznej represji glukozowej u *S. cerevisiae*
  - V-3. Udział mitochondriów w procesie derepresji

---

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

Wykaz stosowanych skrótów: Zgodnie z zaleceniem Komisji Nomenklaturowej (von Borstel R. C. Yeast Genetics Supplement to *Microbiol. Genetics*, Bulletin Nr. 31, 1969, 25, Suppl.) w nomenklaturze genetycznej dany gen identyfikowano z allelem dzikiego typu. Allel dominujący oznaczano dużymi literami, recesywny zaś małymi literami. AIC-R-P — 5-amino-1-5''-fosforybozylo-imidazolo-4-karboksyamid; PP — pirofosforan; PRPP — 5-fosforybozylo- $\alpha$ -pirofosforan.

## Contents

- I. Introduction**
- II. Galactose catabolism**
  - II-1. Structural genes**
  - II-2. Genetic regulation of inducibility of the galactose pathway enzymes**
  - II-3. Function of *GAL4* gene**
  - II-4. Function of *GAL3* gene**
- III. Histidine biosynthesis**
  - III-1. Structural genes**
  - III-2. Characteristic of *HIS4* region**
  - III-3. Regulation of histidine biosynthesis**
    - III-3-1. Feedback inhibition**
    - III-3-2. Repression of synthesis of the histidine biosynthetic enzymes**
- IV. Genetic co-regulation of amino acids biosynthesis in *S. cerevisiae***
  - IV-1. Mutants with constitutive levels of the enzymes of histidine, arginine, tryptophan and lysine biosynthesis**
  - IV-2. Mutants unable to derepress the enzymes of histidine, arginine, tryptophan and lysine biosynthesis**
  - IV-3. Model of genetic co-regulation of the amino acid biosynthesis in *S. cerevisiae***
- V. Glucose catabolic repression**
  - V-1. Positive control of synthesis of inducible enzymes in bacteria**
  - V-2. Genetic control of glucose catabolic repression in *S. cerevisiae***
  - V-3. Role of mitochondria in derepression process**

## I. Wstęp

Badania nad kontrolą ekspresji genów u bakterii pozwoliły na dokładne wyjaśnienie niektórych mechanizmów genetycznej regulacji metabolizmu na poziomie molekularnym. Modele negatywnej regulacji operonu laktozy (1), czy też pozytywnej regulacji operonu arabinozy (2) stały się już klasyką biologii molekularnej (patrz prace przeglądowe 3, 4, 5). Mimo uniwersalności kodu genetycznego oraz powszechności schematu przekazywania z DNA przez mRNA informacji genetycznej do sekwencji aminokwasów w białkach, brak jest wystarczających danych, aby wyjaśnić mechanizmy regulacyjne występujące w organizmach wyższych na podstawie modeli opracowanych dla bakterii.

Zaawansowanie badań nad genetyczną kontrolą metabolizmu u bakterii wynika przede wszystkim z wprowadzenia do prac biochemicznych całego szeregu metod genetycznych na ogół niedostępnych badaniom organizmów wyższych. Spośród eukariontów bardzo dogodnym i ciekawym obiektem tego rodzaju badań są niższe grzyby takie, jak: *Saccharomyces*, *Neurospora* i *Aspergillus*.

Drożdże, *Saccharomyces cerevisiae*, są jednokomórkowymi organizma-



mi eukariotycznymi, ale pod względem złożoności budowy ich komórki nie różnią się od komórek wyższych organizmów (6). Podobnie zaś jak bakterie charakteryzuje je krótki czas generacji. Drożdże można hodować na podłożach płynnych i stałych o ściśle zdefiniowanym składzie, łatwo otrzymuje się ich czyste linie komórkowe. W badaniach drożdży można stosować podstawowe metody genetyczne np. mutagenezę, stemplowanie czy mikromanipulację, ich system genetyczny pozwala na stosowanie testów dominacji i komplementacji. Wszystkie te cechy czynią drożdże prawie równie dogodnym materiałem do badań genetycznych jak bakterie.

W komórkach drożdży występują dwa systemy genetyczne, jądrowy i mitochondrialny, oba stosunkowo dobrze scharakteryzowane (7, 8, 8a). Masa DNA w jądrze haploidalnej komórki drożdży wynosi  $1,2-1,3 \times 10^{10}$  daltonów, a więc wielkość genomu jądrowego w komórkach drożdży wynosi około  $1,2 \times 10^7$  par nukleotydów. Przy założeniu, że 1000 par zasad koduje łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej około 35000, obliczono, że genom *S. cerevisiae* może kodować około 12000 białek (9). W jądrze komórkowym *S. cerevisiae* jest 17 chromosomów. Badania nad skonstruowaniem mapy genetycznej chromosomów drożdży rozpoczął w roku 1949 Lindgren (10) i są one prowadzone po dzień dzisiejszy, głównie przez Mortimera i Hawthorne'a (7). Dotychczas ustalono pozycję, czyli zmapowano około 180 genów w chromosomach jądrowych. Zidentyfikowano enzymy kodowane przez ponad 60 genów, w wielu przypadkach produkty zmapowanych genów są nieznane. Opisano również wiele mutacji, których pozycja na mapie genetycznej nie została ustalona (11). Niemniej jednak na podstawie obecnie dostępnych danych widać, że funkcjonalnie pokrewne geny, poza nielicznymi wyjątkami jak np. region TRP 5 (12), HIS4 (13) czy GAL7-10-1 (14) są rozmieszczone w różnych miejscach genomu. Podobną sytuację zaobserwowano u *Neurospora crassa* i *Aspergillus nidulans* (15, 16). Pomimo występowania genów kodujących enzymy katalizujące poszczególne przemiany w różnych chromosomach, w wielu wypadkach synteza tych enzymów podlega wspólnej regulacji.

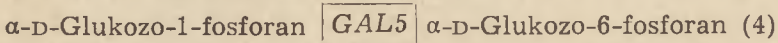
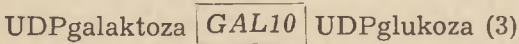
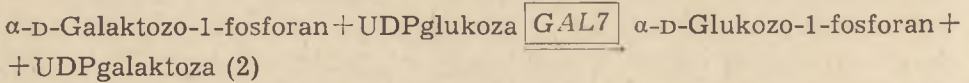
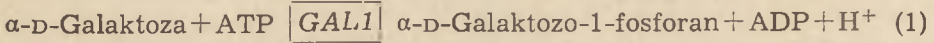
W niniejszym artykule na przykładzie dwóch przemian: katabolizmu galaktozy i biosyntezy histydyny starano się przedstawić możliwe mechanizmy genetycznej kontroli procesów indukcji i represji syntezy enzymów u *S. cerevisiae*. Omówiono również zjawisko represji glukozowej, która stanowi przykład mechanizmu współregulującego różne przemiany.

## II. Katabolizm galaktozy

Fermentacja galaktozy przez drożdże jest jedną z najlepiej scharakteryzowanych genetycznie przemian u eukariontów.

## II-1. Geny struktury

Wykorzystanie galaktozy jako źródła węgla przez komórki drożdży jest procesem indukowalnym. Poniżej przedstawiono uproszczony ciąg reakcji przemiany galaktozy do glukozy-6-fosforanu:



Reakcje te katalizowane są przez cztery enzymy: 1) galaktokinazę (fosfotransferaza ATP : galaktoza EC. 2.7.1.6.1), 2) transferazę (urydylotransferaza UTP :  $\alpha$ -D-galaktozo-1-fosforan E.C. 2.7.7.10), 3) epimerazę (4-epimeraza UDP-glukozy E.C. 5. 1.3.2) i 4) fosfoglukomutazę (urydylotransferaza UDP-glukoza:  $\alpha$ -D-galaktozo-1-fosforan E.C. 2.7.7.12). Przemiana galaktozy wymaga również współdziałania specyficznej permeazy. Syntezę trzech pierwszych enzymów oraz permeazy indukuje galaktoza dodana do środowiska, natomiast synteza fosfoglukomutazy nie zależy od obecności induktora, jest więc konstytutywna (14, 17, 18, 19).

Zidentyfikowano geny struktury wszystkich wymienionych enzymów, są to odpowiednio: *GAL1*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL5*, *GAL2*. Geny kodujące galaktokinazę *GAL1*, transferazę *GAL7* oraz epimerazę *GAL10* są ściśle sprzężone i znajdują się w chromosomie II. Na podstawie wyników analizy genetycznej ustalono następującą kolejność genów w chromosomie: *centromer*—*GAL7*—*GAL10*—*GAL1* (20). Geny kodujące permeazę *GAL2* oraz fosfoglukomutazę *GAL5* znajdują się odpowiednio w chromosomie XII oraz we fragmencie F6 (7).

## II-2. Genetyczna regulacja indukcji enzymów katabolizujących galaktozę

Regulacja ekspresji zgrupowania genów *GAL7*—*GAL10*—*GAL1* pod wieloma względami przypomina regulację indukowalnej syntezy enzymów u bakterii (2, 3, 4).

Indukcja enzymów katabolizujących galaktozę u *S. cerevisiae* jest wynikiem interakcji czterech genów regulatorowych: *GAL3*, *i<sup>+</sup>*, *c* oraz *GAL4*. Pierwszym zidentyfikowanym genem regulatorowym omawianej przemiany był *GAL3*. Mutanty w tym genie, *gal3*, zostały opisane przez Winge i Roberta w roku 1948 (22). W komórkach drożdży o niezmutowanych allelach *GAL3* indukcja syntezy enzymów galaktozowych zachodzi zaledwie w ciągu 6 minut po dodaniu galaktozy do podłoża,



podczas gdy w komórkach mutanta *gal3* aktywność tych enzymów pojawia się dopiero po 24—36 godzinach. Mutanty *gal3* nazwano zatem mutantami o przedłużonym okresie adaptacji (*long term adaptation*). Zahamowanie aktywności oddechowej komórek niosących mutację *gal3* przez wprowadzenie mutacji *rho*<sup>-</sup> (delecja w mitochondrialnym DNA) całkowicie uniemożliwia wzrost podwójnych mutantów *gal3rho*<sup>-</sup> na podłożu zawierającym galaktozę. Stosując jako szczep wyjściowy podwójny mutant *gal3rho*<sup>-</sup> poszukiwano jego rewertantów zdolnych do szybkiego wzrostu na podłożu zawierającym galaktozę, ale nie będących rewertantami mutacji *gal3* (23). Opisana wyżej metoda pozytywnej selekcji pozwoliła na otrzymanie całego szeregu mutantów, które wykazywały stały niezależny od obecności induktora, poziom enzymów kodowanych przez geny *GAL7*, *GAL10*, *GAL1*. Konstytutywna synteza tych enzymów wywołana była mutacją *i*<sup>-</sup> w genie *i*<sup>+</sup>, nazywanym tak przez analogię do genu regulatorowego *i* operonu laktozy u *E. coli* (3). Analiza genetyczna mutantów *i*<sup>-</sup> wykazała, że gen *i* nie jest sprzężony z kompleksem genów *GAL7 GAL10 GAL1*, ani też z genami *GAL2* i *GAL3*. Mutacja *i*<sup>-</sup> jest recesywna w stosunku do allelu *i*<sup>+</sup>. Wnioskowano, że tak jak w przypadku systemu laktozowego i galaktozowego u *E. coli*, gen *i*<sup>+</sup> u *S. cerevisiae* odpowiedzialny jest za syntezę represora (23) Istnienie kompleksu genów *GAL7 GAL10 GAL1*, znajdujących się pod wspólną kontrolą genu *i*<sup>+</sup>, pozwoliło na wysunięcie atrakcyjnej hipotezy, iż kompleks ten jest operonem. Logicznym następstwem tego założenia było poszukiwanie mutantów operatorowych. Przez analogię do operonów bakteryjnych Douglas i Hawthorne (21) spodziewali się znaleźć mutanty drożdży typu 0<sup>c</sup>, cis-dominujące o konstytutywnym poziomie enzymów kodowanych przez geny *GAL7*, *GAL10*, *GAL1* oraz mutanty typu 0<sup>o</sup>, w których nie powinna zachodzić synteza białek kodowanych przez hipotetyczny operon galaktozowy. Stosunkowo łatwo otrzymano mutanty niezdolne do wykorzystywania galaktozy jako źródła węgla. Pojedyncza mutacja, nazwana *gal4*, powodowała jednoczesny brak aktywności wszystkich trzech enzymów kodowanych przez geny *GAL7*, *GAL10*, *GAL1*. Jednakże nie była to mutacja typu 0<sup>o</sup> ponieważ gen *GAL4* nie jest sprzężony z genami struktury kodującymi enzymy katabolizujące galaktozę. Brak syntezy enzymów kodowanych przez geny *GAL7*, *GAL10*, *GAL1* na skutek mutacji w genie *GAL4* świadczy, że produkt tego genu jest niezbędny dla ekspresji genów kodujących enzymy galaktozowe. Douglas i Hawthorne wyizolowali również mutanty nazwane mutantami C, nie alleliczne z *i*<sup>+</sup>, o konstytutywnym poziomie galaktokinazy, transferazy i epimerazy. Mutacje C mapują się bardzo blisko *locus GAL4* lub w jego obrębie i wykazują dominację w stosunku do allelu dzikiego typu *GAL4* tylko wtedy, gdy znajdują się w pozycji *-cis*.

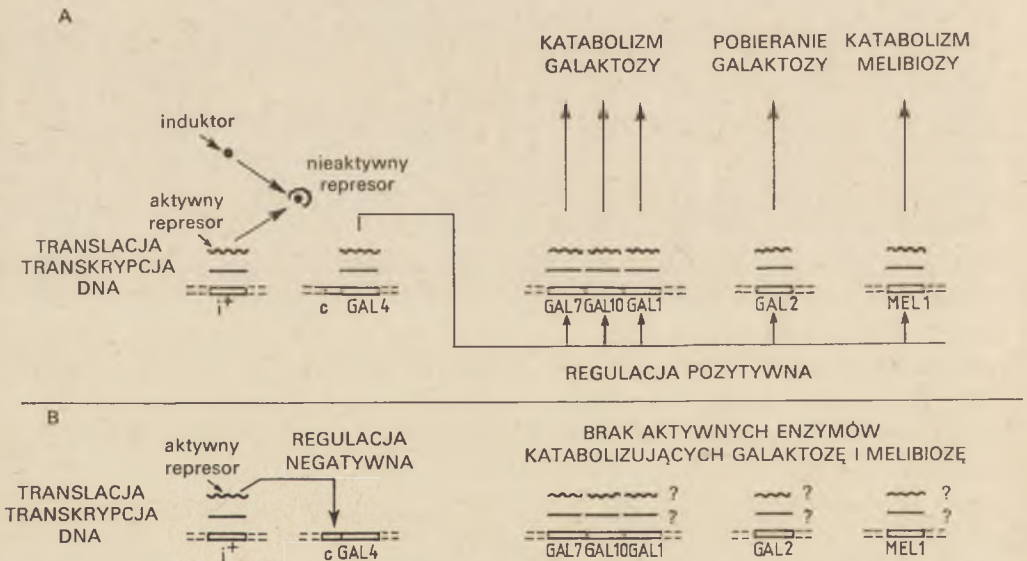
Douglas i Hawthorne (21, 24) opisali po raz pierwszy u eukariontów strukturę analogiczną do operonu bakteryjnego, w którym gen



*GAL4* koduje białko, a ekspresję tego genu reguluje miejsce operatorowe *c*. Według tych autorów operator *c* jest miejscem przyłączenia represora kodowanego przez gen  $i^+$  a operon *cGAL4* podlega negatywnej kontroli. Jeżeli zależność pomiędzy omówionymi powyżej genami  $i^+$  oraz *c* jest taka, jak to proponowano w przypadku operonów bakteryjnych, zależność typu: gen regulatorowy-operator — gen (*y*) struktury, wówczas należy oczekiwać w *locus*  $i^+$  mutacji powodujących niezdolność do indukowanej syntezy enzymów, analogicznych do mutacji regulatorowych operonu laktozy  $i^s$  (25) i galaktozy  $R^s$  (26) u *E. coli*. Mutacje typu  $i^s$  powodują syntezę zmienionego represora o zwiększonym powinowactwie do operatora. Takie mutanty drożdży wyizolowano i tak, jak u bakterii mutacja  $i^s$  jest dominująca w stosunku do alleli  $i^+$  oraz  $i^-$  (24).

### II-3. Funkcja genu *GAL4*

Mechanizm regulacji syntezy enzymów katabolizujących galaktozę przez produkt genu *GAL4* nie został dotychczas wyjaśniony. Produkt genu *GAL4* jest niezbędny dla ekspresji genów *GAL7*, *GAL10*, *GAL1* a więc działanie tych genów podlega pozytywnej kontroli (27). Nie ma jednak dotychczas żadnego dowodu, iż geny struktury *GAL7*, *GAL10*, *GAL1* stano-



**Ryc. 1.** Schemat genetycznej regulacji katabolizmu galaktozy i melibiozy w komórkach *Saccharomyces cerevisiae*.

A. W obecności induktora represor kodowany przez gen regulatorowy  $i^+$  ulega unieczynnieniu przez induktor (galaktozę). Produkt genu *GAL4* umożliwia ekspresję genów struktury katabolizmu galaktozy i melibiozy.

B. W nieobecności induktora represor kodowany przez gen regulatorowy  $i^+$  blokuje operator *c* genu regulatorowego *GAL4* i uniemożliwia jego transkrypcję. Brak produktu genu *GAL4* powoduje brak ekspresji genów struktury katabolizmu galaktozy i melibiozy. Mechanizm działania produktu *GAL4* jest nieznan.

wią jednostkę transkrypcji. Przeciwnie, fakt, że mutacje nonsensowne otrzymane w którymkolwiek z trzech loci zgrupowania genów *GAL* nie mają efektu polarnego, czyli nie powodują zablokowania syntezy enzymów przez niezmutowane geny, wydaje się świadczyć, że odcinek DNA kodujący enzymy katabolizujące galaktozę składa się z trzech niezależnie transkrybowanych genów (28). Dotychczas nie znaleziono również miejsca receptorowego dla produktu genu *GAL4*.

W komórkach drożdży, enzymy katabolizujące galaktozę występują w postaci agregatu. Według poglądów Tsuyumu i Adamsa (28) produkt genu *GAL4* może stanowić element strukturalny tego agregatu ułatwiający jego formowanie lub stabilizujący strukturę. Hipotezę tę podważają wyniki ostatnich doświadczeń Kew i Douglasa (29), którzy wykazali, że gen *GAL4* kontroluje również system fermentacji melibiozy przez komórki drożdży. Indukcja tego systemu jest niezależna od obecności genów struktury przemiany galaktozowej, zależy zaś od obecności niezmutowanego allelu genu regulatorowego dla przemiany melibiozy, *MEL1*. Być może poznanie funkcji genu *MEL1* pozwoli na wyjaśnienie mechanizmu działania produktu genu *GAL4*.

Na rycinie 1 przedstawiono model regulacji indukowalnej syntezy enzymów, opracowany na podstawie omówionych powyżej danych.

#### II-4. Funkcja genu *GAL3*

Proponowany przez Douglasa i Hawthorne'a model regulacji indukowalnej syntezy enzymów katabolizmu galaktozy nie uwzględnia udziału produktu genu *GAL3* w tym procesie.

Jak już wspomniano na początku rozdziału, mutacje w tym właśnie genie były pierwszymi opisanymi mutacjami regulatorowymi zmieniającymi kinetykę indukcji enzymów galaktozowych (22). Dotychczas jednak nie znana jest funkcja genu *GAL3*. Tsuyumu i Adams (30) zaobserwowali, że jeżeli w komórkach szczepu *gal3 rho<sup>+</sup>* zaindukowane zostaną enzymy katabolizujące galaktozę, to komórki takie są zdolne do dalszego wzrostu na pożywce z galaktozą po przeprowadzeniu ich w nieaktywną oddechowo formę *rho<sup>-</sup>*. Jak już wspomniano, komórki szczepu *gal3 rho<sup>-</sup>* nie rosną na galaktozie. Usunięcie galaktozy z podłoża i zastąpienie jej glukożą powoduje proces deindukcji i komórki niosące podwójną mutację: *gal3 rho<sup>-</sup>* tracą zdolność ponownego wzrostu na galaktozie. Autorzy ci wysunęli hipotezę, według której produkt genu *GAL3* jest niezbędny tylko do zainicjowania procesu indukcji enzymów katabolizujących galaktozę. W procesie regulacji syntezy enzymów przemiany galaktozowej obok galaktozy bierze udział endogenny koinduktor, powstający w procesie degradacji tego cukru. Takim koinduktorem może być

UDP-glukoza, która powstaje w wyniku działania epimerazy. W szczepie dzikim musi więc istnieć alternatywna droga powstawania tego związku z glukozo-1-fosforanu i UTP w reakcji katalizowanej przez urydylotransferazę specyficzną dla systemu galaktozowego a mutanty *gal3* zmieniają ten właśnie enzym. Należy przypuszczać, że indukcja enzymów katabolizujących galaktozę w mutantach *gal3* zależy od resztkowej aktywności specyficznego transferazy lub od wykorzystania UDP-glukozy powstającej w reakcjach katalizowanych przez enzymy nie związane z systemem galaktozowym. Podobne zjawisko endogennej indukcji operonu galaktozy opisane zostało u *E. coli* (31).

W proponowanym przez Tsuyumu i Adamsa wyjaśnieniu funkcji genu *GAL3* nie została uwzględniona rola mitochondriów. Ponadto autorzy ci oparli się na założeniu, że produkt genu *GAL3* jest specyficznym koinduktorem w przemianie galaktozy. Badania innych autorów wskazują, że mutacja *gal3* opóźnia fermentację nie tylko galaktozy ale również i innych cukrów np. melibiozy i maltozy. Możliwy pleiotropowy efekt mutacji *gal3* jest nadal przedmiotem dyskusji i wiąże się z nie mniej kontrowersyjnym problemem udziału mitochondriów w regulacji omawianej przemiany (32—36).

Temat ten zostanie omówiony w rozdziale poświęconym katabolicznej represji glukozywej.

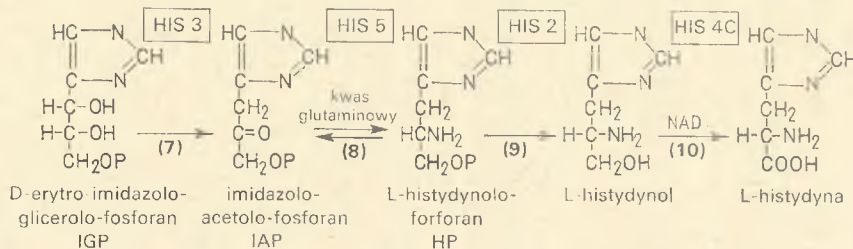
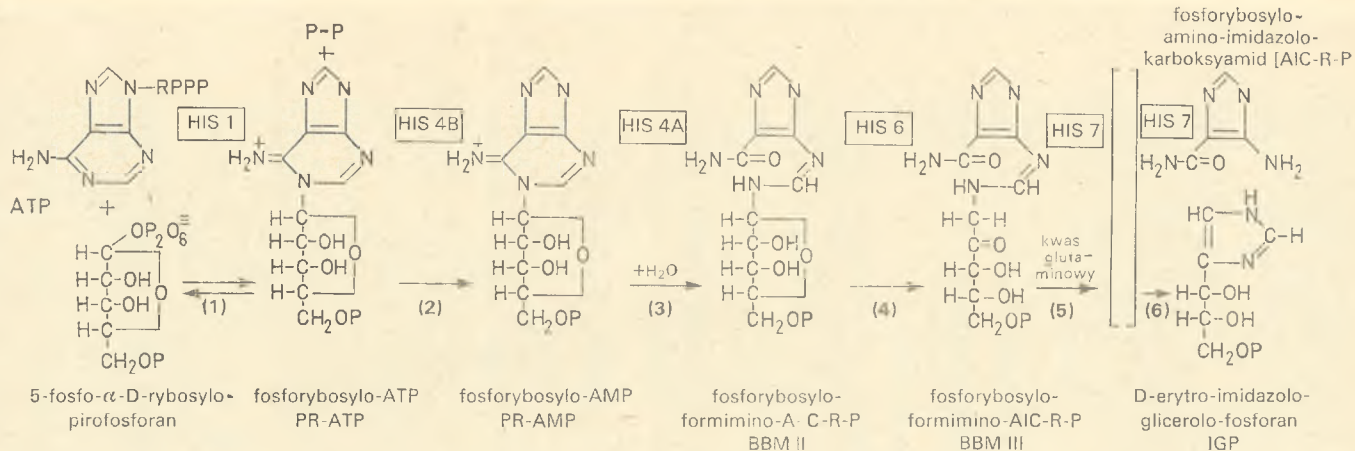
### III. Biosynteza histydyny

U grzybów *Saccharomyces*, *Neurospora* i *Aspergillus* biosynteza histydyny przebiega identycznie jak w komórkach bakterii *Salmonella typhimurium*. Histydyna powstaje z 5-fosfo- $\alpha$ -D-rybozylo-pirofosforanu i ATP w wyniku dziesięciu reakcji enzymatycznych. Schemat tej przemiany przedstawiono na rycinie 2.

#### III-1. Geny struktury

W *S. cerevisiae* zidentyfikowano i zmapowano geny struktury wszystkich enzymów szlaku biosyntezy histydyny (Ryc. 2) (13, 37). Podczas gdy w komórkach bakterii *S. typhimurium* geny te są zgrupowane w jednym odcinku chromosomu tworząc operon histydynowy (38), w drożdżach stwierdzono obecność siedmiu niezależnie segregujących genów odpowiedzialnych za biosyntezę histydyny. Reakcje 2, 3 i 10 są kontrolowane przez jeden locus zwany regionem *HIS4* (13). Podobnie w komórkach *Neurospora Crassa* (39, 40) i *Aspergillus nidulans* (41), te etapy biosyntezy histydyny kodowane są również przez jeden locus.





**Ryc. 2.** Schemat biosyntezy histydyny w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* (13).

Na rycinie w prostokątach zaznaczono geny kodujące enzymy katalizujące poszczególne etapy biosyntezy histydyny. W nawiasach podano kolejne numery reakcji.

- (1) **HIS1** — Transferaza ATP: fosforybozylo-pirofosforan E. C. 2.4.2.17
- (2) **HIS4B** — Pirofosforylaza fosforybozylo-AMP
- (3) **HIS4A** — Cyklohydrolaza fosforybozylo-AMP, E. C. 3.5.4.19
- (4) **HIS6** — Izomeraza N-5'-fosforybozylo-formimino-AIC-R-P E. C. 5.3.1.16
- (5,6) **HIS7** — enzym ( $\gamma$ ) katalizujący przemianę fosforybozylo-formimino-AIC-R-P w imidazoglicerofosforan i AIC-R-P
- (7) **HIS3** — hydrolaza D-erythroimidazolo-glicerolofosforanu E. C. 4.2.1.19
- (8) **HIS5** — aminotransferaza L-histidynolofosforan: 2 oksoglutaran E. C. 2.6.1.9
- (9) **HIS2** — fosfohydrolaza L-histidynolofosforanu E. C. 3.1.3.15
- (10) **HIS4C** — oksydoreduktaza L-histidynol: NAD E. C. 1.1.1.23

### III-2. Charakterystyka regionu *HIS4*

Region *HIS4* obejmuje odcinek 2250 par nukleotydów (15). Znajduje się on w trzecim chromosomie w pobliżu centromeru. Badania genetyczne i biochemiczne mutantów *his4* pozwoliły na skonstruowanie szczegółowej mapy genetycznej tego regionu (Ryc. 3) (13, 42, 43, 44).

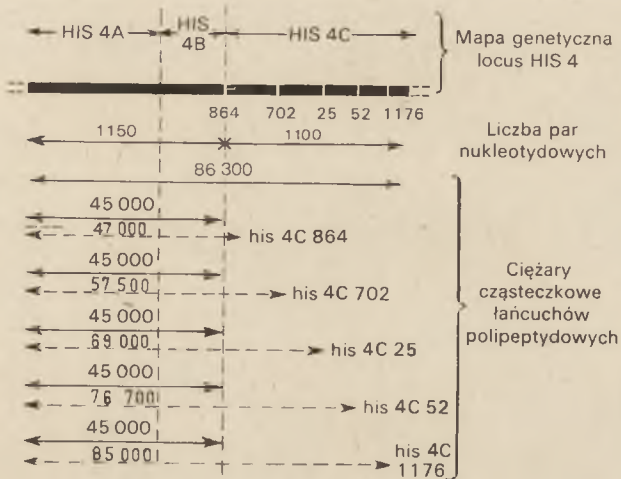
Region *HIS4* ma wiele własności wspólnych z operonami bakteryjnymi. Mutanty *his4* typu missens można podzielić na trzy klasy oznaczone symbolami *his4A*, *his4B* i *his4C*. Mutanty te komplementują między sobą tak, jakby region *HIS4* obejmował trzy sąsiadujące cistrony *HIS4A*, *HIS4B* i *HIS4C*, kodujące odpowiednio enzymy: cyklohydrolazę PR-AMP, pirofosforylazę PR-AMP i dehydrogenazę histydynolową (Ryc. 2). Mutacje *his4A*, *his4B* i *his4C* formują nieprzerwany szereg na mapie genetycznej. W locus *HIS4* wyizolowano i zmapowano ponad 50 mutacji nonsensownych (13, 15, 42). Efekty mutacji nonsensownych w regionie *HIS4A* zbliżone są do efektów mutacji  $0^{\circ}$  w operonie laktozy u *E. coli* (3). Mutacje nonsensowne *his4A* przejawiają się całkowitym brakiem aktywności wszystkich trzech enzymów kodowanych przez region *HIS4*. Mutacje te są całkowicie polarne, co oznacza, że przerwanie odczytywania kodu genetycznego w miejscu takiej mutacji blokuje syntezę enzymów kodowanych przez niezmutowane regiony *HIS4B* i *HIS4C*. Mutanty nonsensowne *his4A* nie komplementują z mutantami typu missens *his4B* i *his4C*. W mutantach nonsensownych *his4C* poziom aktywności cyklohydrolazy PR-AMP i pirofosforylazy PR-AMP jest taki sam jak w komórkach szczepu dzikiego. Mutanty nonsensowne *his4C* komplementują z missensownymi mutantami *his4A* i *his4B*. Omówione własności mutantów nonsensownych wskazują, że region *HIS4* stanowi funkcjonalną jednostkę, a kodowane przezeń enzymy są produktem policistronowego mRNA, którego translacja przebiega od regionu *HIS4A* do *HIS4C*. Mamy więc do czynienia z inną sytuacją niż w przypadku zgrupowania genów *GAL7*, *GAL10*, *GAL1*, gdzie mutacje nonsensowne w jednym z tych genów nie miały wpływu na dwa pozostałe. Polarność mutacji nonsensownych jest cechą charakterystyczną operonów bakteryjnych (3), jednakże nie jest ona całkowita, tak jak ma to miejsce w przypadku nonsensownych mutacji *his4A*.

Dotychczas w obrębie locus *HIS4* nie udało się zidentyfikować ani miejsca operatorowego ani promotorowego, których obecność świadczyłaby, że regiony *HIS4A*, *HIS4B* i *HIS4C* tworzą klasyczny operon.

Całkowitą polarność mutacji nonsensownych na całej długości odcinka obszaru *HIS4A* można wyjaśnić przy założeniu, że produktem locus *HIS4* jest mRNA nie policistronowy, lecz monocistronowy, a w procesie translacji syntetyzowany jest pojedynczy polipeptyd o trzech aktywnościach enzymatycznych.

Enzymy kodowane przez region *HIS4* tworzą trwałe kompleksy; nie udało się ich rozdzielić pomimo wielokrotnego oczyszczenia (42). Dla

sprawdzenia, czy produktem locus *HIS4* jest pojedynczy polipeptyd, zbadano wpływ mutacji nonsensownych zlokalizowanych w różnych miejscach regionu *HIS4C*, na ciężar cząsteczkowy polipeptydu o zachowanej aktywności cyklohydrolazy PR-AMP i pirofosforylasy PR-AMP (15, 42). Ciężar cząsteczkowy kompleksu trzech enzymów w szczepie dzikim wynosi 95 000. Przy założeniu, że produktem regionu *HIS4* jest jeden polipeptyd, w wyniku mutacji nonsensownych *his4C* powinny być syntetyzowane polipeptydy o różnym ciężarze cząsteczkowym, zależnym od pozycji mutacji (Ryc. 3). Oznaczone ciężary cząsteczkowe białek, o zachowanej aktywności cyklohydrolazy PR-AMP i pirofosforylasy PR-AMP



Ryc. 3. Mapa genetyczna regionu *HIS4* *Saccharomyces cerevisiae* (15, 42).

Odcinek *HIS4A* koduje cyklohydrolazę-PR-AMP, *HIS4B* — pirofosforylazę PR-AMP a *HIS4C* — dehydrogenazę histydynolową. W odcinku *HIS4C* zaznaczono numerami pozycje mutacji nonsensownych.

————— przewidywane ciężary cząsteczkowe łańcuchów polipeptydowych, które powinny być syntetyzowane przez poszczególne mutanty nonsensowne *his4C*, obliczone przy założeniu, że produktem obszaru *HIS4* jest pojedynczy łańcuch polipeptydowy.  
 - - - - - oznaczono doświadczalnie ciężary cząsteczkowe zbadanych polipeptydów.

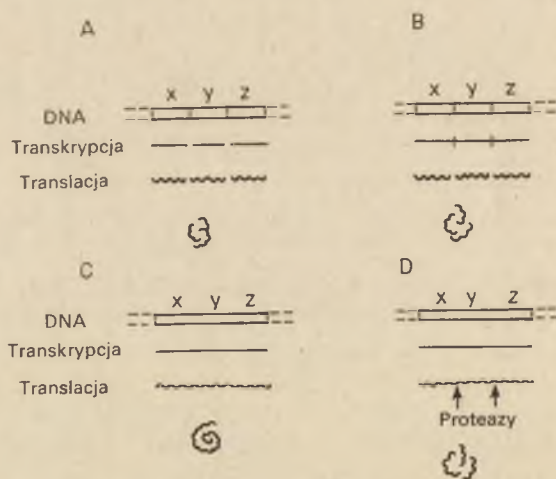
w pięciu mutantach były identyczne i wynosiły 45 000. Ten wynik jest sprzeczny z założeniem, że mamy do czynienia z pojedynczym polipeptydem. O funkcjonalnej autonomii produktów regionów *HIS4A*, *HIS4B* i *HIS4C* świadczy także fakt, iż w komórkach drożdży niosących mutację nonsensowną, znajdującą się w środku locus *HIS4* np. mutację *his4-864*, (Rys. 3), aktywność cyklohydrolazy PR-AMP i pirofosforylasy PR-AMP była identyczna, jak aktywność tych enzymów w niezmutowanych komórkach. Fakt otrzymania mutantów delecyjnych, w których zachowana została aktywność dehydrogenazy histydynolowej pomimo utraty odcinka DNA obejmującego regiony *HIS4A* i *HIS4B*, może być łatwiej wytłumaczony przy założeniu, że produktem locus *HIS4* są odrębne polipeptydy (44).



Dane doświadczalne przemawiające za hipotezą, iż produktem regionu *HIS4* jest policistronowy mRNA są równie przekonujące, jak dane świadczące, że produktem tego regionu jest monocistronowy mRNA. Obie te hipotezy można połączyć zakładając, że region *HIS4* koduje pojedynczy polipeptyd, który następnie specyficzne enzymy proteolityczne dzielą na trzy odrębne polipeptydy tworzące trwały kompleks (42) (patrz Ryc. 4D). Zjawisko takie zachodzi np. w czasie syntezy białek wirusa polio (45).

W ekstraktach z komórek drożdży wykazano obecność proteazy, która odszczepia z kompleksu omawianych enzymów polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym 35 000, co pociąga za sobą utratę aktywności cyklohydro-lazy PR-AMP i pirofosforylasy PR-AMP przy zachowanej aktywności dehydrogenazy histydynolowej, której ciężar cząsteczkowy wynosił 60 000 (15).

Ostatnie badania Finka i wsp. (Fink nieopubl.) potwierdziły hipotezę, iż produktem *locus HIS4* jest pojedynczy polipeptyd. Zastosowanie przeciwciał o wysokiej specyficzności w stosunku do produktu genu *HIS4* wydaje się wskazywać, że w komórkach dzikiego szczepu funkcjonuje on jako jedno białko o trzech aktywnościach enzymatycznych, a nie jako kompleks trzech enzymów. Niektóre fragmenty tego białka, powstałe



Ryc. 4. Modele powstawania kompleksów enzymatycznych kodowanych przez zgrupowania genów.

A. W wyniku transkrypcji genów *x*, *y*, *z* powstają trzy różne mRNA dające w procesie translacji trzy białka (np. *GAL7 GAL10 GAL1*).

B. W wyniku transkrypcji genów *x*, *y*, *z* powstaje policistronowy mRNA, który przy translacji daje trzy odrębne białka.

C. W wyniku transkrypcji genu obejmującego obszary *x*, *y*, *z* powstaje monocistronowy mRNA, dający w procesie translacji pojedynczy polipeptyd o trzech aktywnościach enzymatycznych (np. *HIS4*).

D. W wyniku transkrypcji genu obejmującego obszary *x*, *y*, *z* powstaje pojedynczy polipeptyd, który może ulegać trawieniu przez specyficzne enzymy proteolityczne co powoduje powstanie odrębnych białek.

w wyniku działania enzymów proteolitycznych lub w wyniku mutacji nonsensownej powodującej syntezę krótszego łańcucha polipeptydowego, zachowują nadal aktywność enzymatyczną: fragmenty o ciężarze cząsteczkowym 45 000 wykazują aktywność cyklohydrolazy PR-AMP i pirofosforylazy PR-AMP, natomiast o ciężarze cząsteczkowym 60 000 aktywność dehydrogenazy histydynolowej.

Występowanie trwałych kompleksów enzymatycznych jest cechą charakterystyczną niższych eukariontów. Przypuszcza się, że kompleksy te odgrywają znaczną rolę w regulacji metabolizmu (15, 16). Istnieją różne możliwości mechanizmów powstawania trwałych kompleksów enzymatycznych polipeptydy wchodzące w skład takiego kompleksu enzymatycznego mogą być kodowane w różnych miejscach genomu lub w jednym odcinku DNA (Ryc. 4). Jeżeli za syntezę kompleksu odpowiedzialny jest jeden odcinek DNA, to może być on złożony z kilku ściśle sprzężonych genów lub być tylko jednym genem. W wyniku transkrypcji zgrupowania genów mogą powstawać odrębne mRNA lub jeden, policistronowy mRNA, na którym syntetyzowane są odrębne łańcuchy polipeptydowe (model A i B, Ryc. 4). U eukariontów jednak nie udało się dotychczas wykazać obecności policistronowego mRNA. W przypadku transkrypcji pojedynczego genu powstaje jeden polipeptyd o kilku aktywnościach enzymatycznych. (model C, Ryc. 4), który dzielić mogą następnie specyficzne proteazy na krótsze polipeptydy, każdy o jednej aktywności enzymatycznej (model D, Ryc. 4).

### III-3. Regulacja biosyntezy histydyny

Biosynteza histydyny w komórkach drożdży *S. cerevisiae*, podobnie jak w komórkach bakterii *S. typhimurium* podlega kontroli na poziomie aktywności enzymatycznej — na drodze hamowania zwrotnego, oraz na poziomie syntezy enzymów — na drodze represji.

#### III-3-1. Hamowania zwrotne

W komórkach dzikiego szczepu drożdży, histydyna hamuje aktywność pierwszego enzymu szlaku swej biosyntezy (46, 47). Badania kinetyczne wykazały, że inhibicja ta ma charakter niekompetycyjny, co wskazuje na istnienie w cząsteczce tego enzymu swoistego centrum przyłączającego histydynę, odmiennego od centrum katalitycznego. Messenguy i Fink (46) otrzymali mutanty, w których nie zachodziło hamowanie zwrotne biosyntezy histydyny. Zastosowali oni metodę selekcji, polegającą na poszukiwaniu mutantów opornych na toksyczny, strukturalny analog histydyny 1,2,4-triazolo-3-alaninę. Przebadano ponad 100 mutantów zdolnych do wzrostu w obecności tego związku. Większość z nich sta-



nowiły recesywne mutanty permeazowe. W 18 mutantach stwierdzono, że cecha oporności jest dominująca. Mutanty te tworzyły jedną klasę nazwaną *TRA1*. Mutacje *TRA1* występują w locus *HIS1* (gen struktury pierwszego enzymu biosyntezy histydyny, Ryc. 2). Testy enzymatyczne wykazały, że w mutantach *TRA-1* aktywność fosforybozylu: ATP transferazy jest taka sama jak w dzikim szczepie, lecz nie ulega hamowaniu przez histydynę. Doświadczenia te wskazują, że mutacja *TRA1* powoduje zmianę miejsca regulatorowego przy zachowaniu niezmiennego centrum katalitycznego. Brak hamowania zwrotnego w mutantach *TRA-1* przy zachowanej aktywności enzymatycznej powoduje utratę zdolności do regulacji wewnątrzkomórkowej puli histydyny. W komórkach mutantów *TRA-1* wewnątrzkomórkowe stężenie histydyny było 3 do 15 razy większe aniżeli w szczepie dzikim, a niektóre z mutantów nawet wydzielały histydynę do podłoża. Ponieważ hamujące działanie 1,2,4-triazolo-3-alaniny w szczepie dzikim jest odwracane przez dodanie histydyny w niewielkich stężeniach, oporność mutantów *TRA-1* na ten analog histydyny może być wynikiem jego rozcieńczenia przez histydynę obecną w komórkach w zwiększonym stężeniu.

### III-3-2. Represja syntezy enzymów biosyntezy histydyny

W komórkach drożdży, tak jak i w komórkach bakterii, niskie wewnątrzkomórkowe stężenie histydyny jest sygnałem, który wywołuje zwiększoną produkcję enzymów syntetyzujących ten aminokwas (42, 46, 48). Wykazano, że trzykrotne zmniejszenie stężenia wewnątrzkomórkowego histydyny powoduje około dziesięciokrotną derepresję enzymów biosyntezy histydyny (46).

W badaniach nad mechanizmami regulującymi represję operonu histydynowego w *S. typhimurium* stwierdzono, że w wyniku mutacji powodującej oporność na inhibicję zwrotną ulegała zmianie również i kinetyka represji. Według K o v a c h a i wsp. (49) pierwszy enzym biosyntezy histydyny bierze udział także w regulacji syntezy enzymów kodowanych przez operon histydynowy. Ponieważ represja operonu histydynowego w tych bakteriach wymaga udziału histydylo-tRNA uważa się, że elementem kontrolującym biosyntezę histydyny jest kompleks pierwszego enzymu z histydylo-tRNA. Pierwszy enzym może spełniać funkcję aporepresora łączącego się z korepresorem — tRNA<sup>HIS</sup> (52). M e s s e n g u y i F i n k (46) stwierdzili, że w drożdżach, podobnie jak w *S. typhimurium*, mutanty *TRA1*, w których aktywność pierwszego enzymu biosyntezy histydyny nie podlega hamowaniu zwrotnemu mają zmniejszoną zdolność do derepresji enzymów biosyntezy histydyny. Obniżenie wewnątrzkomórkowego stężenia histydyny do poziomu, który w szczepie kontrolnym powodował piętnastokrotną derepresję enzymów biosyntezy histy-



dyny w mutantach *TRAI* powodował tylko dwukrotną derepresję powyższych enzymów. Dalsze badania prowadzone przez tych autorów wykazały istnienie mutacji w *locus HIS1*, które powodowały brak derepresji enzymów biosyntezy histydyny w zmutowanych komórkach. Wydaje się więc, że i w drożdżach pierwszy enzym biosyntezy histydyny może sprawować podwójną rolę w procesie hamowania zwrotnego i represji biosyntezy enzymów szlaku histydynowego.

Dotychczas nie wysunięto żadnych hipotez dotyczących możliwego mechanizmu kontroli represji enzymów biosyntezy histydyny przez produkt genu *HIS1*. W doświadczeniach analogicznych do przeprowadzonych na bakteriiach *S. typhimurium* nie wykazano udziału histydylo-tRNA w tym procesie.

#### IV. Genetyczna współregulacja biosyntezy aminokwasów w komórkach *S. cerevisiae*

W komórkach *Neurospora crassa* (53, 54) i w *Saccharomyces cerevisiae* (48, 55) zaobserwowano, że niedobór jednego z czterech aminokwasów: histydyny, argininy, tryptofanu lub lizyny prowadzi do jednoczesnej derepresji enzymów katalizujących syntezę wszystkich czterech aminokwasów. Obserwowana derepresja nie wynikała z ogólnego zaburzenia metabolizmu w komórce. Stwierdzono, że aktywność innych reprimowalnych enzymów, nie związanych z syntezą tych czterech aminokwasów pozostawała bez zmian. Zjawisko to wskazuje na istnienie nadrzędnego mechanizmu kontrolującego biosyntezę jednocześnie kilku aminokwasów. Otrzymanie szczepów drożdży, w których pojedyncze mutacje powodowały konstytutywną syntezę lub niezdolność do derepresji enzymów czterech szlaków metabolicznych w pełni potwierdza tę sugestię, (48, 55, 56, 57).

##### IV-1. Mutanty o konstytutywnym poziomie enzymów biosyntezy histydyny, argininy, tryptofanu i lizyny

Wolfner i wsp. (48) otrzymali cały szereg mutantów opornych na toksyczne działanie 1,2,4-triazolo-3-alaniny, w których enzymy biorące udział w biosyntezie histydyny, argininy, tryptofanu i lizyny posiadały stały zdereprimowany poziom aktywności. Mutanty te tworzyły dwie klasy, które oznaczono symbolami *tra3* i *tra5*. Mutacje *tra3* i *tra5* są recesywne. Geny *TRA3* i *TRA5* nie są sprzężone ze sobą ani też z żadnym ze znanych genów struktury przemian tych czterech aminokwasów. W mutantach *tra* stwierdzono zaburzenia w cyklu podziałowym komórki. Są one mutantami temperaturowrażliwymi a w temp. 37°C nie zachodzi w nich synteza DNA i związana z tym inicjacja cyklu podziałowego ko-

mórki. Cecha temperaturowrażliwości jest również recesywna. Badania genetyczne wykazały, że mutacja odpowiedzialna za temperaturowrażliwość znajduje się w genach *TRA* lub jest z nimi ściśle sprzężona.

#### IV-2. Mutanty niezdolne do derepresji enzymów biosyntezy histydyny, argininy, tryptofanu i lizyny

Wzrost niektórych szczepów drożdży można zahamować przez dodanie do podłoża 5-metylo-tryptofanu. Okazało się, że w komórkach drożdży, nadwrażliwych na działanie tego analogu aminokwasowego, nie zachodzi derepresja enzymów syntetyzujących histydynę, argininę tryptofan i lizynę (48, 56). Niezdolność do ich derepresji powodowały mutacje nazwane *aas*, w trzech genach regulatorowych oznaczonych symbolami *AAS1*, *AAS2* i *AAS3*. Mutanty *aas* otrzymano jako mutanty nadwrażliwe na działanie analogów aminokwasowych (*amino acids analog sensitivity*). Tak jak mutanty *tra3* i *tra5* mutacje *aas1*, *aas2* i *aas3* są recesywne i występują w różnych miejscach genomu (48). Otrzymano podwójne mutanty *aas1tra3*, *aas1tra5* oraz *aas2tra3* i *aas2tra5*. We wszystkich przypadkach mutacja *tra* była epistatyczna w stosunku do mutacji *aas* tzn. podwójne mutanty *aas tra* wykazywały stały, wysoki poziom enzymów, katalizujących syntezę tych czterech aminokwasów. Epistatyczny efekt mutacji *tra* w stosunku do mutacji *aas* świadczy o współdziałaniu genów *TRA* i *AAS* w regulacji syntezy aminokwasów.

#### IV-3. Model genetycznej współregulacji biosyntezy aminokwasów w komórkach *S. cerevisiae*

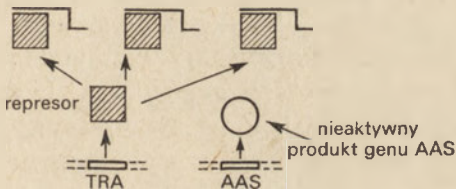
Wolfner i wsp. (48) zaproponowali model, przedstawiony na rycinie 5, wyjaśniający możliwy mechanizm współdziałania produktów genów *TRA3* i *AAS1* w regulacji biosyntezy różnych aminokwasów. Zgodnie z tym modelem produkt genu *TRA3* jest elementem kontroli negatywnej, który nie pozwala na ekspresję genów struktury enzymów katalizujących syntezę histydyny, lizyny, tryptofanu i argininy. Produkt genu *AAS1* stanowi element kontroli pozytywnej, to znaczy w warunkach niedoboru w komórce jednego z aminokwasów — argininy, histydyny, lizyny lub tryptofanu, produkt genu *AAS* może się łączyć z produktem genu *TRA* i w ten sposób go inaktywować, umożliwiając tym samym ekspresję genów znajdujących się pod kontrolą genu *TRA3*. W przypadku wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego wszystkich czterech aminokwasów produkt genu *AAS1* ulega inaktywacji przez te aminokwasy i nie może łączyć się z produktem genu *TRA3*. Zmieniony w wyniku mutacji *aas* produkt genu *AAS* występuje w formie nieaktywnej. Model ten wyjaśnia również epistatyczny charakter mutacji *tra3*. Zmieniony produkt syntetyzowany przez zmu-



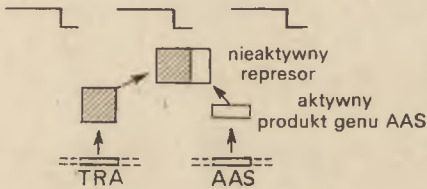
towany allel *tra3* występuje w formie nieaktywnej bez względu na obecność aktywnego lub nieaktywnego produktu genu AAS.

Nie ma żadnych danych, które mogłyby wyjaśnić, w jaki sposób pojedyncza mutacja *tra* wpływa na ekspresję co najmniej 30 genów kodujących enzymy katalizujące syntezę argininy, histydyny i tryptofanu. Większość tych genów znajduje się w różnych chromosomach. Nie wiadomo czy regulacja odbywa się na poziomie translacji czy transkrypcji. Nieznane są miejsca receptorowe wiążące produkt genów *TRA*, niewyjaśniono również współzależności pomiędzy genami *TRA3* i *TRA5* oraz trzema genami AAS. Nie wyjaśniono dotychczas w jaki sposób produkt genu *TRA* bierze udział w regulacji cyklu podziałowego komórki (porównaj rozdział IV-1).

#### A. REPRESJA



#### B. DEREPRSJA



**Ryc. 5.** Schemat współdziałania produktów genów AAS i *TRA* w regulacji biosyntezy aminokwasów (48).

A. Represja — arginina, histydyna, lizyna i tryptofan, występujące w komórce w dużych stężeniach powodują inaktywację produktu genu AAS. Aktywny produkt genu *TRA* blokuje ekspresję genów struktury enzymów biosyntezy tych aminokwasów.

B. Derepresja — na skutek niedoboru w komórce jednego z czterech aminokwasów produkt genu AAS występuje w formie aktywnej i inaktywuje produkt genu *TRA* umożliwiając tym samym jednoczesną derepresję syntezy czterech aminokwasów.

## V. Kataboliczna represja glukozowa

Jednym z ważniejszych aspektów genetycznej regulacji metabolizmu jest występowanie w komórkach nadrzędnych systemów kontroli, współregulujących wiele pozornie odległych przemian. Klasycznym przykładem tego rodzaju kontroli jest regulacja indukowalnej syntezy enzymów na drodze katabolicznej represji glukozowej i amonowej. Zjawisko represji amonowej w grzybach omówiono już na łamach *Postępów Biochemii* (57a).

Występujące w mikroorganizmach zjawisko represji glukozowej polega na hamowaniu indukcji całego szeregu enzymów katabolicznych przez egzogenną glukozę i niektóre inne cukry. Zahamowaniu ulega synteza enzymów, których obecność nie jest konieczna dla życia komórki w czasie jej wzrostu na podłożach zawierających glukozę, jako źródło węgla.

Badania nad mechanizmami genetycznej regulacji represji glukozowej



w komórkach bakterii pozwoliły na wyjaśnienie, w jaki sposób egzogenne cukry kontrolują ekspresję genów u niektórych *Enterobacteriaceae* i ułatwiły poszukiwanie mechanizmów genetycznej kontroli represji glukozowej w innych organizmach.

#### V-1. Pozytywna kontrola indukowalnej syntezy enzymów u bakterii

Punktem wyjściowym w badaniach, które doprowadziły do wyjaśnienia mechanizmu represji katabolicznej w niektórych bakteriach była obserwacja M a k m a n a i S u t h e r l a n d a (58), że egzogenna glukoza obniża stężenie cyklicznego 3, 5-adenozynomonofosforanu (cAMP) w komórkach *E. coli*. Stwierdzono, że dodanie cAMP do komórek hodowanych na podłożach z glukozą odwraca efekt represji glukozowej (59). Wyizolowano mutanty w komórkach których nie zachodziła indukowalna synteza enzymów. Efekt mutacji był pleiotropowy, co sugerowało, że zmieniony jest ogólny system regulacji niezbędny dla ekspresji genów wrażliwych na represję kataboliczną. Mutanty te można podzielić na dwie klasy:

- cya*<sup>-</sup> — nie syntetyzują cAMP na skutek mutacji w genie struktury cyklicznej adenylowej, efekt tej mutacji może być odwrócony przez dodanie egzogennej cAMP (60)
- crp*<sup>-</sup> — nie syntetyzują białka wiążącego cAMP. Produktem tego genu jest oligomeryczne białko nazwane CRP (*cAMP receptor protein*) (61) lub CAP (*catabolite activator protein*) (62). Fenotyp mutacji *crp*<sup>-</sup> nie jest odwracany przez cAMP.

Wyizolowano również mutanty bakterii, w których synteza indukowalnych enzymów nie podlegała kontroli glukozowej. Ta niewrażliwość na działanie glukozy była swoista i dotyczyła enzymów jednego tylko operonu. Testy genetyczne wykazały, że mutacje tego typu znajdują się w regionach promotorowych operonów (63, 64, 65).

Własności omówionych wyżej mutantów wskazują, że cAMP w połączeniu z białkiem wiążącym, CRP, jest w komórkach bakterii elementem kontroli pozytywnej, umożliwiającym indukowalną syntezę enzymów podlegających represji. Występowanie mutacji promotorowych o zmienionej wrażliwości na represję glukozową świadczy, że regulacja odbywa się na poziomie transkrypcji.

Wyniki badań *in vitro* nad transkrypcją operonów galaktozy i laktozy w systemach bezkomórkowych potwierdziły, iż interakcja kompleksu cAMP—białko wiążące CRP z miejscem promotorowym umożliwia inicjację transkrypcji operonów wrażliwych na represję glukozową (66, 67).

Mechanizm kontrolujący wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP przez glukozę został dokładniej poznany w ciągu ostatnich czterech lat (patrz artykuły przeglądowe 68, 69). Wykazano, że w procesach katabolicznej represji w *E. coli* i *S. typhimurium* zaangażowany jest system aktywnego

transportu cukrów do komórki po angielsku zwany *phosphoenolopyruvate: sugar phosphotransferase system*, w skrócie PTS. Stwierdzono, że efekt katabolicznej represji wywołują cukry lub ich niemetalizowane pochodne np. 2-dezoksyglukoza, które są pobierane przez komórki przy udziale układu fosfotransferaz PTS. Enzymy wchodzące w skład tego układu spełniają w komórce wiele funkcji regulatorowych, między innymi regulują one aktywność cykazy adenylowej (70, 71). Przypuszcza się, że produkt genu *crr* (będącego składnikiem układu aktywnego transportu cukrów) jest odpowiedzialny za represję enzymów katabolicznych. Mutacje w tym genie całkowicie znoszą efekt represji glukozowej (72).

Nie wydaje się jednak, aby udział cAMP w procesie regulacji syntezy enzymów miał charakter uniwersalny (73). I tak na przykład nie wykryto obecności cAMP w komórkach *Bacillus subtilis* (74), nie stwierdzono również w tych bakteriach korelacji pomiędzy aktywnym transportem cukrów przy udziale fosfotransferaz a stopniem represji katabolicznej (75). Nie ma dotychczas przekonywujących danych, które mogłyby świadczyć o udziale cAMP w regulacji represji glukozowej w drożdżach. W komórkach drożdży stwierdzono obecność cAMP, cykazy adenylowej i białka wiążącego ten nukleotyd, jednakże wyniki dotyczące możliwej korelacji pomiędzy wewnątrzkomórkowym stężeniem tego nukleotydu a stopniem represji są sprzeczne (76—79). Według Zimmernana (nieopubl.) w drożdżach nie występuje wolny cAMP i jest co najmniej pięć różnych białek specyficznie wiążących ten nukleotyd, co praktycznie uniemożliwia otrzymanie mutantów typu *crp*<sup>-</sup>.

#### V-2. Genetyczna kontrola katabolicznej represji glukozowej w *Saccharomyces cerevisiae*

Intensywne badania nad represją glukozową w *S. cerevisiae* zapoczątkowały prace Słonimskiego (80) i Ephrussiego (81), którzy opisali występowanie w drożdżach efektu przeciwnego efektowi Pasteura, zwanego też efektem *Crabtree* (82). W czasie aerobowego wzrostu drożdży na podłożu zawierającym glukozę w wysokim stężeniu katabolizm tego cukru przebiega wyłącznie na drodze fermentacji, tak jak ma to miejsce w komórkach hodowanych anaerobowo, równocześnie zahamowana zostaje aktywność oddechowa, która pojawia się dopiero po wyczerpaniu glukozy.

Omówienie represji katabolicznej enzymów biorących udział w transporcie elektronów, fosforylacji oksydacyjnej i wiążącego się z tym problemem funkcji oraz biogenezy mitochondriów wymagałoby osobnego opracowania, nie mieszczącego się w ramach niniejszego artykułu. Zainteresowanych czytelników odsyłamy do artykułów przeglądowych (83, 84).

W komórkach drożdży, poza zahamowaniem syntezy enzymów oddechowych (85, 86), podobnie jak w bakteriach, glukoza i inne szybko fer-



mentowalne cukry, jak np. mannoza i fruktoza, dodane do podłoża powodują zahamowanie indukcji enzymów biorących udział w wykorzystywaniu innych źródeł węgla np. enzymów katabolizujących galaktozę (14) lub maltozę (87, 88). W warunkach represji glukozowej obniżona jest również synteza enzymów cyklu glioksalowego, cyklu kwasów trójkarboksylowych i enzymów biorących udział w procesie glukoneogenezy (90—93).

Chociaż historia odkrycia zjawiska represji glukozowej u drożdży jest niemal równie dawna jak u bakterii, badania nad mechanizmami genetycznej regulacji katabolicznej represji są daleko mniej zaawansowane. Wynika to przede wszystkim z braku danych dotyczących specyficznej genetycznej kontroli syntezy i aktywności enzymów biorących udział w poszczególnych przemianach. Biosynteza niektórych enzymów podlegających represji wymaga współdziałania dwóch systemów genetycznych: jądrowego i mitochondrialnego. Dodatkowym utrudnieniem jest hamowanie przez glukozę i pokrewne cukry aktywności większości enzymów podlegających represji glukozowej (94).

Pomimo tych wszystkich trudności w kilku pracowniach podjęto systematyczne badania nad opracowaniem metod selekcji i poszukiwania mutantów, które mogłyby przyczynić się do wyjaśnienia genetycznego podłoża zjawiska represji katabolicznej u drożdży (95, 96, 97).

Przez analogię do bakterii należy spodziewać się następujących trzech klas mutacji powodujących zmianę wrażliwości na represję kataboliczną:

- 1) dotyczących syntezy jednego enzymu, takich jak mutacje w miejscu promotorowym operonu laktozy czy arabinozy u *E. coli*;
- 2) zmniejszających lub znoszących efekt represji glukozowej o fenotypie mutacji *err*,
- 3) powodujących niezdolność do indukcji syntezy enzymów o efektach analogicznych do mutacji *cya*<sup>-</sup> i *crp*<sup>-</sup>.

W klasie 1) otrzymano mutanty o niewrażliwej na represję glukozową syntezie maltazy (88, 98), inwertazy (78), katalazy (95) i jednego z izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej — ADH II. Tylko w jednym przypadku mutacji oznaczonej symbolem *ADR-3<sup>c</sup>*, znoszącej wrażliwość syntezy dehydrogenazy alkoholowej ADH II na represję glukozową wykazano, że jest to mutacja typu promotorowego. Należy podkreślić, że własności mutantu *ADR-3<sup>c</sup>* stanowią pierwszy bezpośredni dowód istnienia u drożdży miejsc regulatorowych zaangażowanych w katabolicznej represji glukozowej. Wyniki prac *Ciriacyego* (99—101) dotyczące genetycznej regulacji syntezy dehydrogenaz alkoholowych u drożdży wskazują, iż synteza izoenzymu ADH II podlega regulacji pozytywnej.

Do klasy 2) zaliczyć można mutanta wyizolowanego przez *Schamharta* i wsp. (79), w którym pojedyncza mutacja powodowała oporność na represję kataboliczną syntezy maltazy, alfa-metylo-glukozydazy, inwertazy i dehydrogenazy bursztynianowej. Otrzymano również mutant, który w warunkach represji glukozowej charakteryzuje się wysoką aktyw-



nością katalazy i zdeprimowanym poziomem cytochromów (Biliński, niepubl.). Prowadzone obecnie badania genetyczne i biochemiczne nad tym mutantem wydają się świadczyć, że istnieje wspólny system regulujący biosyntezę hemoproteidów.

Zimmermann i wsp. (96) oraz Ciriacy (97) poszukiwali szczepów drożdży, w których pojedyncza mutacja powodowałaby nieindukowalność syntezy enzymów w warunkach braku represji. Opracowana przez Zimmermanna metoda selekcji mutantów oparta jest na założeniu, że mutanty te nie powinny rosnać na niefermentowalnych źródłach węgla, ponieważ ich metabolizm wymaga czynnego współdziałania takich procesów jak transport elektronów, oksydacyjna fosforylacja, glukoneogeneza oraz funkcjonującego cyklu gliksalowego, a enzymy katalizujące te procesy podlegają represji katabolicznej. Brak indukcji tych enzymów powodowałby więc fenotyp mutacji oddechowej. I rzeczywiście autorzy (96) otrzymali mutantą, w którym pojedyncza mutacja nazwana *cat1-1* wywoływała brak derepresji liazy izocytrynianowej, fruktozo-1,6-dwufosfatazy i maltazy. Znacznie opóźniona była derepresja dehydrogenazy jabłczanowej, natomiast kinetyka derepresji enzymów oddechowych pozostała taka jak w szczepie wyjściowym o niezmutowanym allelu *CAT1*. Otrzymano również dwa rewertanty, w których przywrócenie zdolności do wzrostu na glicerolu spowodowane było wtórnymi mutacjami regulatorowymi. Na podstawie analizy genetycznej i biochemicznej tych szczepów zaproponowano, iż u drożdży zahamowanie syntezy enzymów w warunkach represji oraz inicjacja derepresji jest kontrolowana przez odrębne geny regulatorowe.

### V-3. Udział mitochondriów w procesie derepresji

Mutanty oddechowe drożdży, *rho*<sup>-</sup> pozbawione funkcji mitochondrialnych na skutek delecji w mitochondrialnym DNA są niezdolne do wzrostu na niefermentowalnych źródłach węgla, takich jak glicerol czy etanol, mogą one natomiast rosnać na glukozie czerpiąc energię z procesów fermentacji. Wydawałoby się, że powinny one również rosnać na innych fermentowalnych źródłach węgla takich jak galaktoza, melibioza, maltoza czy rafinoza. Wyniki licznych prac wskazują, że w wielu przypadkach mutanty oddechowe nie fermentują tych cukrów (22, 32, 33, 98, 102) np. omówione w poprzednich rozdziałach mutanty *gal3 rho*<sup>-</sup>.

Wspólną cechą przemian wyżej wymienionych cukrów w komórkach drożdży jest to, że synteza enzymów katabolizujących galaktozę, melibiozę, maltozę i rafinozę podlega podwójnej kontroli: jest indukowana przez swoje koinduktory oraz podlega represji glukozowej. Dotychczasowe badania zjawiska utraty zdolności fermentacji niektórych cukrów przez mutanty *rho*<sup>-</sup> miały na celu wyjaśnienie, które z procesów zachodzących

w mitochondriach są niezbędne dla indukcji enzymów katabolizujących wyżej wymienione cukry.

Evans i Wilkie (102) zaproponowali, że informacja zawarta w mitochondrialnym DNA odpowiedzialna jest za syntezę czynników regulujących ekspresję genów jądrowych odpowiedzialnych za metabolizm poszczególnych cukrów. Na podstawie zaś obserwacji, że erytromycyna inhibitor mitochondrialnej syntezy białek może hamować wykorzystywanie galaktozy przez mutanty *gal3*, Puglisi i Algeri (92) sugerują, że decydującym czynnikiem w procesie indukcji enzymów katabolizujących galaktozę jest synteza białek mitochondrialnych. Przeciw obu przedstawionym powyżej hipotezom świadczą następujące fakty: otrzymano mutanty w mitochondrialnym DNA, w których zachowana została synteza białek mitochondrialnych przy jednoczesnej utracie zdolności do wzrostu na galaktozie (103). Zahamowanie poszczególnych funkcji mitochondriów, takich jak transport elektronów czy fosforylacja oksydacyjna przy niezmięnionej replikacji DNA i syntezie białek mitochondrialnych, również uniemożliwia indukcję enzymów katabolizmu galaktozy w niektórych szczepach drożdży (104).

Udział mitochondriów w procesie indukcji enzymów katabolicznych jak się wydaje nie zostanie wyjaśniony jeżeli proces indukcji będzie się nadal rozpatrywać niezależnie od represji katabolicznej. Regulacja syntezy enzymów na drodze represji katabolicznej jest bowiem nadrzędna w stosunku do indukcji. Indukcja enzymów nie zachodzi w warunkach represji glukozowej. Według Zimmermanna i inn. (96) indukcję enzymów poprzedza faza derepresji, w której następuje usunięcie lub inaktywacja hipotetycznego represora (represorów) syntetyzowanego w czasie represji glukozowej.

W poprzednim podrozdziale omówiono własności mutantu *cat1-1*. Zmutowany szczep nie rósł na maltozie na skutek mutacji powodującej niezdolność derepresji niektórych enzymów katabolicznych a między innymi i maltazy. Dane przedstawione przez Zimmermanna świadczą, że w genie *CAT1* można otrzymać mutacje, które nie będą powodowały całkowitego zahamowania derepresji lecz jej opóźnienie. Fenotyp takiej mutacji przypomina więc fenotyp mutacji *gal3*. Być może przedłużony okres adaptacji poprzedzający indukcję enzymów katabolizmu galaktozy w mutantach typu *gal3* jest wynikiem opóźnienia procesu derepresji. Badania nad kinetyką derepresji katalazy A w mutantach oddechowych drożdży wskazują, że obserwowany brak syntezy niektórych enzymów podlegających represji w komórkach drożdży o zaburzonych funkcjach mitochondrialnych może być skutkiem braku źródła energii niezbędnego dla inicjacji i kontynuacji procesu derepresji (105). Na podstawie tej obserwacji można przypuszczać, że brak indukcji enzymów katabolizujących galaktozę w mutantach *gal3 rho<sup>-</sup>* również jest skutkiem braku źródła energii niezbędnej dla procesu derepresji. Wyizolowanie nowych mutantów w genach kontrolujących



nadrzędne systemy regulacyjne jest warunkiem poznania współzależności między procesami represji, derepresji i indukcji w drożdżach.

Mechanizmy regulacji genetycznej pozwalają komórkom na dostosowanie syntezy białek do aktualnych warunków środowiska. Podstawowymi elementami genetycznego systemu regulatorowego są geny struktury kodujące sekwencję aminokwasów białek o funkcjach katalitycznych lub strukturalnych oraz geny regulatorowe kodujące sekwencję aminokwasów białek regulujących ekspresję innych genów. Układ podlegający regulacji składa się z genu (genów) struktury oraz odcinków DNA o funkcji regulacyjnej będących miejscami receptorowymi dla produktów genów regulatorowych. W genotypie eukariontów w wielu przypadkach zidentyfikowano geny struktury i geny regulatorowe, natomiast w nielicznych tylko przypadkach wykazano obecność miejsc receptorowych typu promotorowego lub operatorowego.

*Artykuł otrzymano 1.10.1977; po rewizji autorskiej przyjęto 14.12.1977.*

#### PIŚMIENNICTWO

1. Jacob F., Monod J., (1961), *J. Mol. Biol.*, **3**, 318—356.
2. Englesberg E., Irr J., Power J., Lee N., (1965), *J. Bacteriol.*, **90**, 946—957.
3. Epstein W., Beckwith J., (1968), *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 411—435.
4. Beckwith J., Rossow P., (1974), *Ann. Rev. Genet.*, **8**, 1—13.
5. Englesberg E., Wilcox G., (1974), *Ann. Rev. Genet.*, **8**, 219—241.
6. Matile P., Moor H., Robinow C. F., (1969), w *The Yeast*, red. Rose A. H., Harrison J. S., t. 1, str. 219—302, Academic Press, London, New York.
7. Mortimer R. K., Hawthorne D. C., (1975), w *Methods in Cell Biology*, red. Prescott D. H., t. 11, str. 221—233, Academic Press, Inc.
8. Rytka J., (1978), *Post. Mikrobiol.*, w druku.
- 8a. Rytka J., Putrament A., (1978) *Post. Mikrobiol.*, w druku.
9. Hartwell L. H., (1970), *Ann. Rev. Genet.*, **4**, 373—396.
10. Lindegren C. C., (1949), *Hereditas, Suppl.*, 338—355.
11. Plischke M. E., von Borstel R. C., Mortimer R. K., Cohn W. E., (1976), w *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, red. Fosman G. D., t. 2, str. 551—596. CRC Press.
12. Duntze W., Manney T. R., (1968), *J. Bacteriol.*, 2085—2093.
13. Fink G. R., (1966), *Genetics*, **53**, 446—459.
14. Douglas H. C., Hawthorne D. C., (1964), *Genetics*, **49**, 837—844.
15. Fink G. R., (1971), w *Metabolic Pathways*, red. Vogel H. J., t. 5, str. 199—221, Academic Press, New York, London.
16. Davis R. H., (1975), *Ann. Rev. Genet.*, **9**, 39—65.
17. De Robichon-Szulmajster H., (1958), *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 270—272.
18. Cirillo V. P., (1968), *J. Bacteriol.*, **95**, 1727—1731.
19. Bevan P., Douglas H. C., (1969), *J. Bacteriol.* **98**, 532—535.
20. Bassel J., Mortimer R., (1971), *J. Bacteriol.*, **108**, 179—183.
21. Douglas H. C., Hawthorne D. C., (1966), *Genetics*, **54**, 911—916.



22. Winge O., Roberts C., (1948), *Compt. Rend. D. Lab. Carlsberg, Ser. Physiol.* **24**, 263—315.
23. Douglas H. C., Pelroy G., (1963), *Biochim. Biophys. Acta*, **68**, 155—156.
24. Douglas H. C., Hawthorne D. C., (1972), *J. Bacteriol.*, **109**, 1139—1143.
25. Willson C., Perrin D., Cohn M., Jacob F., Monod J., (1964), *J. Mol. Biol.*, **8**, 585—592.
26. Saedler H., Gullon A., Fiethan L., Starlinger P., (1968), *Molec. Gen. Genet.*, **102**, 79—88.
27. Klar A. J. S., Halvorson H. O., (1974), *Molec. Gen. Genet.*, **135**, 203—212.
28. Tsuyumu S., Adams B. G., (1974), *Genetics*, **77**, 491—505.
29. Kew O. M., Douglas H. C., (1976), *J. Bacteriol.*, **125**, 33—41.
30. Tsuyumu S., Adams B. G., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 919—923.
31. Wu H. C. P., Kalckar H. M., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **66**, 622—629.
32. Puglisi P. P., Algeri A., (1971), *Molec. Gen. Genet.*, **110**, 110—117.
33. Evans J. H., Wilkie D., (1976), *Genet. Res. Camb.*, **27**, 89—93.
34. Khan N. A., Greener A., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **150**, 107—108.
35. Klar A. J. S., Halvorson H. O., (1976), *J. Bacteriol.*, **125**, 379—381.
36. Adams B. G., Dalbec J. M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1348—1354.
37. Fink G. R., (1964), *Science*, **146**, 525—527.
38. Ames B. N., Hartman P. E., (1963), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 349—356.
39. Ahmed A., Case M. E., (1964), *Brookhaven Symp. Biol.* **17**, 53—65.
40. Ahmed A., (1968), *Mol. Gen. Genet.*, **103**, 185—193.
41. Berlyn M., (1967), *Genetics*, **57**, 561—564.
42. Shaffer B., Rytka J., Fink G. R., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 1198—1205.
43. Shaffer B., Fink G. R., (1969), *Genetics*, **61**, 54—59.
44. Fink G. R., Styles C. A., (1974), *Genetics*, **77**, 231—234.
45. Jacobson M. F., Baltimore D., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 77—84.
46. Messenguy F., Fink G. R., (1973), w Genes, Proteins and Evolution, red. Srb A., str. 85—94, Plenum, NY.
47. Korch G., Snow R., (1973), *Genetics*, **74**, 287—305.
48. Wolfner M., Yep D., Messenguy F., Fink G. R., (1975), *J. Mol. Biol.*, **96**, 273—290.
49. Kovach J. S., Berberich M. A., Venetianer P., Goldberger R. F., (1969), *J. Bacteriol.*, **97**, 1283—1290.
50. Kovach J. S., Phang J. M., Ference M., Goldberger R. F., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 481—488.
51. Brenner M., Ames B. N., (1971), w Metabolic Pathways, red. Vogel H. J., t. 5 str. 349—387, Academic Press Inc., New York.
52. Vogel T., Meyers H., Kovach J., Goldberger R., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 126—130.
53. Carisiotis M., Jones R. F., (1974), *J. Bacteriol.*, **119**, 888—892.
54. Carisiotis M., Jones R. F., Wesseling A. C., (1974), *J. Bacteriol.*, **119**, 893—898.
55. Greer H., Fink G. R., (1975), w Methods in Cell Biology, red. Prescott D. M., t. 11, str. 247—272, Academic Press Inc.
56. Schuerch A., Miozzari J., Hutter R., (1974), *J. Bacteriol.*, **117**, 1131—1140.
57. Delforge J., Messenguy F., Wiame J. M., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **57**, 231—239.

- 57a. Węgleński P., (1974), *Post. Biochem*, **20**, 219—243.
58. Makman R. S., Sutherland E. Q., (1965), *J. Biol. Chem.* **240**, 1303—1314.
59. Perlmann R. L., de Crombrughe B., Pastan I., (1969), *Nature*, **223**, 810—812.
60. Perlman R. L., Pastan I., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **37**, 151—157.
61. Emmer N., de Crombrughe B., Pastan I., Perlman R. L., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **66**, 480—487.
62. Zubay G., Schwartz D., Beckwith J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **66**, 104—110.
63. Arditti R., Grodzicker T., Beckwith J., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 652—655.
64. Bass R., Heffernan L., Sweander K., Englesberg E., (1976), *Arch. Microbiol.*, **110**, 135—143.
65. Colome J., Wilcox G., Englesberg E., (1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 948—958.
66. Zubay G., Gielow L., Englesberg E., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 164—165.
67. Nissley S. P., Anderson W. B., Gottesman M. E., Perlman R. L., Pastan I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4671—4678.
68. Pastan I., Adhya S., (1976), *Bacteriol. Rev.*, **40**, 527—551.
69. Postma P. W., Roseman S., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 213—257.
70. Peterkofsky A., Gazdar C., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2920—2924.
71. Saier Jr., M. H., Feucht B. U., Hofstadter L. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 883—892.
72. Saier Jr., M. H., Feucht B. U., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7078—7080.
73. Ullman A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 348—352.
74. Hanson R. S., (1975), w Spores, red. Gerhardt P., Costilow R. N., Sadoff H. L., t. 6, str. 318—326, American Soc. Microbiol., Washington D. C.
75. Lopez J. M., Thomas B., (1977), *J. Bacteriol.*, **252**, 217—224.
76. Fang M., Butow R. A., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1579—1583.
77. Sy J., Richter D., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2784—2787; 2788—2791.
78. Montenecourt B. C., Kuo S. C., Lampen J. O., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 233—238.
79. Schamhart D. H. J., den Berge A. M. A., van de Poll K. W., (1975), *J. Bacteriol.*, **121**, 747—760.
80. Słonimski P. P., (1955), La Formation des Enzymes Respiratoires chez la Levure, Masson, Paris.
81. Ephrussi B., Słonimski P. P., Yotsuyanagi Y., Tavlitzki J., (1956), *C. R. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.*, **26**, 87—99.
82. de Deken R. H., (1966), *J. Gen. Microbiol.*, **44**, 149—156.
83. Linnane A. W., Haslam J. M., (1970), *Curr. Top. Cell. Regul.*, **2**, 101—172.
84. Perlman P. S., Mahler H. R., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 248—271.
85. Strittmatter C. F., (1957), *J. Gen. Microbiol.*, **16**, 169—183.
86. Polakis E. S., Bartley W., Meek G. A., (1965), *Biochem. J.*, **97**, 298—302.
87. van Wijk R., Ouwehand J., van den Bos T., Koninsberg V. V., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 179—191.
88. Zimmermann F. K., Eaton N. R., (1974), *Molec. Gen. Genet.*, **134**, 261—272.
89. Lampen J. O., (1968), *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **34**, 1—18.
90. Polakis E. S., Bartley W., (1965), *Biochem. J.*, **97**, 284—297.

91. Witt J., Kronau R., Holzer H., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 63—73.
92. Gancedo C., Gancedo J. M., Sols A., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **26**, 528—531.
93. Foy J. J., Bhattacharjee J. K., (1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 978—982.
94. Holzer H., (1976), *Trends. Biochem. Sci.*, **1**, 178—180.
95. Rytka J., Sledziewski A., Litwińska J., Biliński T., (1976), *Molec. Gen. Genet.*, **145**, 37—42.
96. Zimmermann F. K., Kaufman J., Rasenberger H., Haussman P., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **151**, 95—104.
97. Ciriacy M., (1977), *Molec. Gen. Genet.*, **154**, 213—220.
98. Khan N. A., Eaton N. R., (1971), *Molec. Gen. Genet.*, **112**, 317—322.
99. Ciriacy M., (1976), *Molec. Gen. Genet.*, **145**, 327—333.
100. Ciriacy M., (1975), *Mutat. Res.*, **29**, 315—326.
101. Ciriacy M., (1975), *Molec. Gen. Genet.*, **138**, 157—164.
102. Evans J. H., Wilkie D., (1976), w *The Genetic Function of Mitochondrial DNA*, red. Saccone C., Kroon A. M., str. 209—217, Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
103. Rytka J., English K. J., Hall R. M., Linnane A. W., Lukins H. B., (1976), w *Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria*, red. Bucher Th., Neupert W., Sebald W., Werner S., str. 427—434, Elsevier North-Holland Biomedical Press.
104. Rytka J., w przygotowaniu.
105. Rytka J., Sledziewski A., Łukaszewicz J., Biliński T., (1978), *Molec. Gen. Genet.*, **160**, 51—57.



WANDA KRAJEWSKA <sup>\*)</sup>, LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ <sup>\*\*)</sup>

## Białka chromatyny komórek erytroidalnych ptaków

### Chromatin Proteins of Avian Erythroid Cells

#### *Spis treści*

- I. Proces erytropoezy u ptaków
- II. Histony komórek erytroidalnych ptaków
  - II-1. Niejednorodność
  - II-2. Synteza
  - II-3. Fosforylacja
  - II-4. Acetylacja
  - II-5. Metylacja
- III. Białka niehistonowe chromatyny komórek erytroidalnych ptaków
  - III-1. Niejednorodność
  - III-2. Synteza
  - III-3. Fosforylacja
- IV. Wpływ histonów i białek niehistonowych na aktywność matrycową chromatyny komórek erytroidalnych ptaków
- V. Uwagi końcowe

#### *Contents*

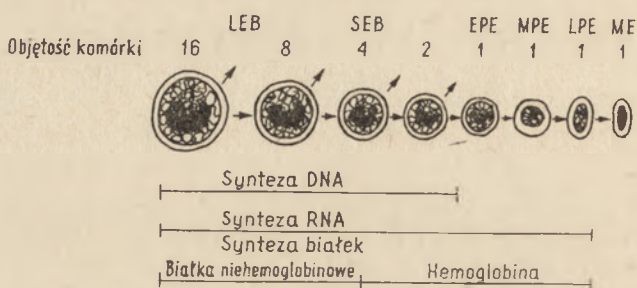
- I. Avian erythropoiesis
- II. Histones of avian erythroid cells
  - II-1. Heterogeneity
  - II-2. Synthesis
  - II-3. Phosphorylation
  - II-4. Acetylation
  - II-5. Methylation
- III. Non-histone chromatin proteins of avian erythroid cells
  - III-1. Heterogeneity
  - III-2. Synthesis
  - III-3. Phosphorylation
- IV. Effects of histones and non-histone proteins on template activity of avian erythroid cell chromatin
- V. Concluding remarks

---

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

## I. Proces erytropoezy u ptaków

Podczas dojrzewania komórek erytroidalnych ptaków następuje praktycznie całkowita inaktywacja ich genomu, przy czym nie zanika jądro komórkowe, tak jak ma to miejsce w erytropoezie u ssaków. Równocześnie w całej komórce zachodzą typowe dla poszczególnych form różnicowania komórkowego znaczne zmiany morfologiczne i biochemiczne, prowadzące do zaniku pewnych funkcji metabolicznych (Ryc. 1).



**Ryc. 1.** Schemat procesu erytropoezy u ptaków (1).

LEB — duży erytroblast; SEB — mały erytroblast; EPE — wczesny erytrocyt polichromatyczny; MPE — średni erytrocyt polichromatyczny; LPE — późny erytrocyt polichromatyczny; ME — dojrzały erytrocyt.

Tylko najmłodsze formy komórek erytroidalnych ptaków (komórki układu erytroblastycznego) mają zdolność podziału i syntezy DNA (1, 2, 3, 4). Ich komórki potomne — erytrocyty polichromatyczne — wysoce wyspecjalizowane w syntezie hemoglobiny, są już formami niedzielącymi się. Podczas różnicowania maleje zdolność komórek do syntezy RNA i białka (5, 6, 7, 8). Niemniej jednak w dojrzałych erytrocytach włączana jest jeszcze do RNA niewielka ilość [<sup>3</sup>H]jurydyny i [<sup>32</sup>P]ortofosforanu, wykazano też w tych komórkach obecność aktywnej polimerazy RNA (9, 10). Inaktywacji genomu komórkowego, wyrażającej się zahamowaniem syntezy DNA, RNA i białek, towarzyszy postępująca kondensacja chromatyny oraz zmniejszanie się objętości i suchej masy jądra komórkowego (11, 12, 13).

Skondensowana chromatyna w znacznej swej części występuje w nieaktywnej genetycznie formie już w komórkach z wczesnych stadiów erytropoezy. Różnice w suchej masie jądra erytroblastów i komórek w późniejszych stadiach rozwoju mogą wynikać częściowo przynajmniej z faktu, że większość erytroblastów znajduje się w fazach S oraz G<sub>2</sub> cyklu komórkowego, a więc charakteryzuje je wyższa średnia zawartość DNA niż późne erytrocyty polichromatyczne i dojrzałe erytrocyty, będące w fazie G<sub>1</sub> (1). Stosunek suchej masy jądra do zawartości DNA zmniejsza się jednak w komórkach erytroidalnych podczas erytropoezy nawet po utracie przez nie zdolności syntezy DNA, co można tłumaczyć przede wszystkim obniżeniem zawartości składnika białkowego tych komórek (Tabela 1).

Wydaje się, że białka aparatu genetycznego — histony i białka niehi-

stonowe — mogące regulować funkcje chromatyny poprzez oddziaływanie na jej strukturę, zdolność syntezy RNA i specyficzną transkrypcję genów, odgrywają znaczną rolę w inaktywacji genomu komórek erytroidalnych w procesie erytropoezy.

Tabela 1

Skład chemiczny jąder komórek erytroidalnych kaczki (3).

Wartości przedstawiają stosunek wagowy RNA oraz białek do DNA.

Typ komórki erytroidalnej	RNA	Białko całkowite	Histony	Białko niehistonowe
Mały i duży erytroblast oraz wczesny erytrocyt polichromatyczny	0,32	2,34	0,97	1,37
Wczesny erytrocyt polichromatyczny	0,17	1,81	0,96	0,88
Średni erytrocyt polichromatyczny	0,12	1,50	0,99	0,51
Późny erytrocyt polichromatyczny	0,08	1,30	0,90	0,40
Dojrzały erytrocyt	0,06	1,13	0,91	0,23

## II. Histony komórek erytroidalnych ptaków

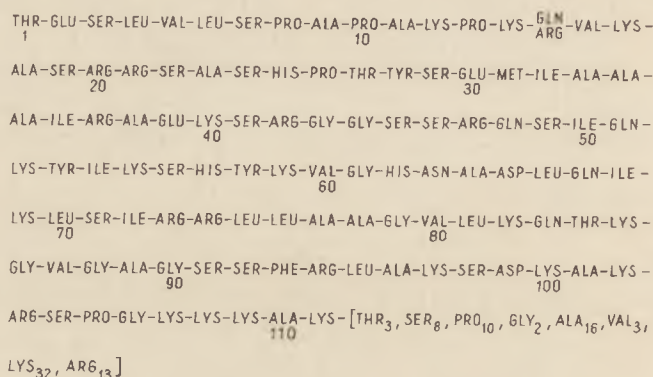
### II-1. Niejednorodność

Oprócz pięciu frakcji histonowych występujących powszechnie w komórkach eukariotycznych (H1 — histon silnie lizynowy; H2A i H2B — histony umiarkowanie lizynowe; H3 i H4 — histony argininowe) histony erytrocytów ptaków, a także płazów i ryb zawierają specyficzną frakcję H5, której obecności nie wykazano dotychczas w innych komórkach organizmów eukariotycznych (14—20, 38). Histon H5 występuje w dwóch formach izomorficznych różniących się jednym aminokwasem w pozycji 15 łańcucha polipeptydowego. W erytrocytach kaczki formy te stanowią odpowiednio 35 i 65% frakcji H5 (21—23). Badania struktury pierwszorzędowej histonu H5 wykazały, że jest to 197—aminokwasowy łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej 21 450, charakteryzujący się wysoką zawartością lizyny (24, 25). W 1976 r. Sautière i wsp. (26) podali sekwencję pierwszych 111 aminokwasów w cząsteczce histonu H5 erytrocytów kureząt (Ryc. 2).

Aminokwasem N-końcowym w tym histonie jest treonina, a C-terminalnym lizyna. W sekwencji N-końcowej części łańcucha zlokalizowane



są wszystkie reszty aminokwasów aromatycznych i większość hydrofobowych, C-terminalna część białka ma natomiast charakter zasadowy. Wśród 86 reszt aminokwasowych, których sekwencji dotychczas nie oznaczono, znajdują się 32 lizyny i 13 arginin.



**Ryc. 2.** Sekwencja aminokwasowa N-końcowego fragmentu histonu H5 erytrocytów kurczęcia (26).

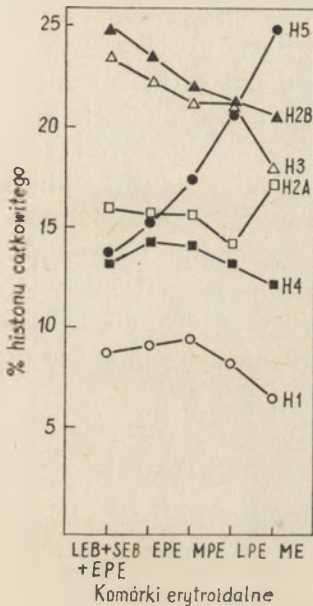
Histon H5 erytrocytów ptaków wykazuje znaczne podobieństwo do histonu H1 komórek innych tkanek pod względem składu aminokwasowego, masy cząsteczkowej, a szczególnie rozmieszczenia hydrofobowych i zasadowych reszt aminokwasowych w cząsteczkach. Znaczna homologia sekwencji aminokwasowej N-końcowej części histonu H5 oraz histonu H1 innych tkanek zwierzęcych (grasica cielęcia i królika, gruczoły jądrowe pstrąga) sugeruje, że geny odpowiadające tym frakcjom histonowym mogły ewoluować ze wspólnego przodka, a różnice w rozmiarach cząsteczek histonu H1 i H5 mogą wynikać z delekcji lub duplikacji pewnych regionów genów (27—29).

Frakcja H5, stanowiąca od 10—28% histonu całkowitego erytrocytów, zastępuje prawdopodobnie w komórkach erytroidalnych frakcję silnie lizynową H1 (3,30—36). Stwierdzono, że histon H1 nie występuje w erytrocytach żaby *Rana catesbeiana* i ryby *Caranx hippos* (18) natomiast Dick i Johns (30) zaobserwowali jego znaczny 5-krotny spadek w erytrocytach kaczki w porównaniu z zawartością H1 grasicy cielęcia.

Histon H1 komórek erytroidalnych charakteryzuje się znaczną niejednorodnością. Zarówno w żelu poliakryloamidowym, jak i w toku chromatografii jonowymiennej można go rozdzielić na 5—6 frakcji, wykazujących specyficzną tkankową i gatunkową. Zawartość histonu H1 w erytrocytach kurcząt jest mniejsza niż w chromatynie innych tkanek. Jakościowo jest on odmienny od histonu H1 innych tkanek kręgowców, pomimo niewielkich różnic w składzie aminokwasowym (23, 34, 37). Pozostałe frakcje histonowe z erytrocytów, podobnie jak w przypadku innych

tkanek, wykazują znaczną konserwatywność ewolucyjną struktury pierwszorzędowej (38).

Podczas erytropoezy całkowita ilość histonów w chromatynie komórek erytroidalnych pozostaje praktycznie stała (Tabela 1) (3, 31), zmienia się natomiast względna zawartość poszczególnych frakcji histonowych. Stwierdzono około 2-krotny wzrost ilości histonu H5 (3, 30, 31, 33, 39, 40). Kontrowersyjne są jednak dane odnośnie zawartości pozostałych frakcji histonowych (30—33). Ostatnio wykazano, że poza histonem H2A, którego ilość nieznacznie wzrasta w dojrzałych erytrocytach, zawartość pozostałych frakcji histonowych maleje podczas erytropoezy (3) (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Zmiany w udziale ilościowym poszczególnych histonów podczas erytropoezy u kaczki (3).

Wartości wyliczono jako % całkowitej gęstości optycznej przy 615 nm. Nomenklatura klejnych form komórek erytroidalnych jak na ryc. 1.

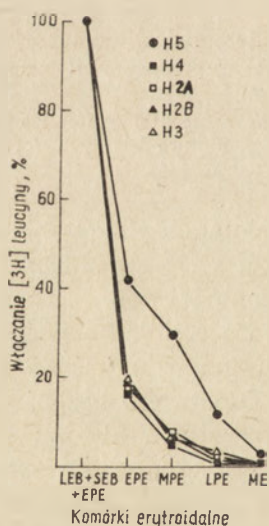
Sugerowano, że specyficzny dla komórek erytroidalnych ptaków histon H5 odpowiedzialny jest za inaktywację genomu (41—45) i kondensację chromatyny erytrocytów (12, 46—48) (nie stwierdzono występowania tej frakcji histonowej w komórkach erytroidalnych tracących jądro podczas erytropoezy (49)). Jednakże obecność tego histonu już w najmłodszych formach komórek erytroidalnych ptaków podważa hipotezę o bezpośredniej zależności między represją genomu i występowaniem histonu H5. Ponadto jakościowe i ilościowe różnice w obrębie tej frakcji, obserwowane w komórkach różnych gatunków ptaków nie dadzą się skorelować ani z metabolicznym ani strukturalnym zróżnicowaniem erytrocytów. Pozwala to przypuszczać, że za inaktywację genomu odpowiedzialna jest nie bezwzględna zawartość histonu H5, ale szybkość jego syntezy oraz zdolność do interakcji z DNA.

Mechanizmami, dzięki którym histony mogą odgrywać zasadniczą rolę

w zmianach struktury i funkcji chromatyny, mogą być modyfikacje enzymatyczne ich struktury pierwszorzędowej, zmieniające ładunek elektryczny cząsteczki, co w efekcie prowadzi do zmiany w oddziaływaniu DNA-histon. Uważa się, że modyfikacje struktury pierwszorzędowej, które obniżają dodatni ładunek histonu (fosforylacja, acetylacja) sprzyjają „rozproszczeniu” chromatyny i wzrostowi jej zaangażowania w procesach transkrypcji, podczas gdy modyfikacje, w wyniku których ulega podwyższeniu dodatni ładunek histonu (metylacja), wydają się sprzyjać kondensacji chromatyny i przeciwdziałać transkrypcji (38).

## II-2. Synteza

Erytroblasty ptaków są jedynymi krwinkami syntetyzującymi wszystkie frakcje histonowe. Już po 1-minutowej inkubacji z [ $^3\text{H}$ ]leucyną lub [ $^3\text{H}$ ]lizyną komórek erytroidalnych szpiku anemizowanych kaczek, można otrzymać z jąder komórkowych znakowane histony. Świadczy to zarówno o dużej szybkości elongacji łańcucha peptydowego, jak i o dużej szybkości transportu histonów z miejsc syntezy w cytoplazmie do jądra (50). Szybkość włączania znakowanych aminokwasów w poszczególne frakcje histonowe jest najwyższa w przypadku histonu H5 (2). W przeciwieństwie do pozostałych frakcji histonowych, synteza tego specyficznego dla komórek erytroidalnych ptaków histonu, trwa jeszcze w niedzielących się erytrocytach polichromatycznych (Ryc. 4) (23, 51—53).



Ryc. 4. Synteza histonów w procesie erytropoezy u kaczki (23).

Brak włączania [ $^3\text{H}$ ]leucyny w obecności inhibitorów syntezy DNA do wszystkich frakcji histonowych poza H5 wskazuje, że podobnie jak w innych tkankach eukariotów, synteza histonów H1, H2A, H2B, H3 i H4 komórek erytroidalnych ptaków ma związek z syntezą DNA. Fakt, że inhi-



bitory syntezy DNA (np. hydroksymocznik) blokują syntezę wszystkich histonów z wyjątkiem H5, sugeruje odrębny mechanizm regulacji transkrypcji jego matrycy (23).

### II-3. Fosforylacja

Wykazano różny stopień ufosforylowania poszczególnych frakcji histonowych komórek erytroidalnych oraz zależność ilości włączonego izotopu od stopnia zróżnicowania krwinek. Radioaktywny fosfor włączany jest w histony erytroblastów od 2 do 6 razy intensywniej niż w histony retikulocytów. Histony tych ostatnich fosforylowane są w nieznacznie tylko wyższym stopniu w porównaniu z odpowiednimi białkami erytrocytów. Sugeruje się, że fosforylacja większości frakcji histonowych komórek, niezbędna do transportu nowosyntetyzowanych peptydów z cytoplazmy do jądra, wyprzedza syntezę DNA. Wyjątek stanowią histony H2A i H5, których fosforylacja przebiega niezależnie od replikacji DNA chromatyny (2, 54, 55). Natomiast w retikulocytach (średnie i późne erytrocyty polichromatyczne) poza histonem H5 fosforylacji ulega także histon H2B (53). Wydaje się, że również histon H5 fosforylowany jest jedynie w erytroblastach (23). Natomiast fosforylacja histonu H2A przebiega intensywnie jeszcze w późniejszych stadiach dojrzewania komórek erytroidalnych.

Progresywny spadek zawartości fosforu we frakcji H5 podczas dojrzewania erytrocytów ptaków, może być przejawem jednego z mechanizmów odpowiedzialnych *in vivo* za przekształcenie chromatyny w formę transkrypcyjnie nieaktywną (2, 36, 48, 55—57). W erytroblastach około 70—80% cząsteczek histonu H5 jest ufosforylowanych, podczas gdy w erytrocytach polichromatycznych — tylko około 50%. Ilość ufosforylowanych reszt seryny w nowosyntetyzowanych cząsteczkach histonu H5 niedojrzałych form jest równa lub mniejsza od dziewięciu (36). W histonie H5 dojrzałych erytrocytów stwierdzono natomiast tylko 4 miejsca fosforylacji, są nimi: Ser 45 (lub 46), Ser 49, Ser 91 (lub 92) oraz seryna lub treonina we fragmencie łańcucha między 111 i 200 resztą aminokwasową (58). Niższa zawartość fosforu w histonach dojrzałych form może odzwierciedlać mniej aktywny proces fosforylacji lub wyższy stopień defosforylacji, bądź też być wypadkową obydwu procesów jednocześnie. Sugeruje się że defosforylacja histonu H5 podczas erytropoezy prowadzi do przekształcenia tego białka w „super—reprezor” (36, 59).

### II-4. Acetylacja

Histony komórek erytroidalnych ptaków, niezależnie od stadium zróżnicowania komórek, mają zdolność włączania radioaktywnego octanu. Acetylacja histonów w miarę postępu erytropoezy nie ma zatem związku ani

z ich syntezą ani replikacją DNA. Jednak podczas dojrzewania krwinek obserwowano 4—5-krotne zmniejszenie stopnia acetylacji histonów (3, 23), przy równoczesnym wzroście aktywności deacetylazy histonowej (60).

Podobnie jak w innych tkankach frakcjami mającymi największą zdolność włączania [ $^3\text{H}$ ] lub [ $^{14}\text{C}$ ] octanu są histony argininowe, tj. H3 i H4. W histonie H3 obok form niezacetylowanych można wyróżnić formy zawierające jedną oraz dwie reszty  $\epsilon$ -N-acetylolizyny. Histon H4 zaś, poza N-acetyloseryną zawiera jeszcze trzy reszty lizyny zdolne do acetylacji. Rozbicie cząsteczki znakowanego histonu H2B za pomocą bromocyjanu oraz termolizyny ujawnia obecność co najmniej dwóch miejsc acetylacji w obrębie zasadowej, N-końcowej części jego łańcucha polipeptydowego (60).

Niskie włączanie radioaktywnego octanu przez histony H1 i H2A wynika prawdopodobnie z acetylacji N-końcowej seryny. Acetylacja N-końcowego aminokwasu tych histonów nie byłaby zatem modyfikacją wtórną ich cząsteczek, ale związana byłaby z inicjacją syntezy łańcuchów polipeptydowych (23). W 1977 r. Sung i wsp. (53) wykazali jednak, że zablokowanie syntezy białka cykloheksomidem nie wpływa na zahamowanie acetylacji histonu H2A, podczas gdy histony H1 i H5 prawdopodobnie nie ulegają acetylacji.

Równocześnie ze zmniejszeniem stopnia acetylacji histonów podczas erytropoezy maleje aktywność matrycowa chromatyny komórek erytroidalnych w syntezie RNA *in vitro*. W doświadczeniach z użyciem inhibitorów polimerazy RNA ( $\alpha$ -amanityny, aktynomycyny D, ryfamycyny AF/013) wykazano jednak, że acetylacja histonów H3 i H4 przebiega podczas zahamowanej syntezy RNA (23). Mechanizmy kontrolujące syntezę RNA i acetylację histonów nie są zatem ściśle powiązane.

Konieczne są dalsze badania, które mogłyby wykazać czy acetylacja i deacetylacja histonów, prowadząca do zmiany ładunku w obrębie zasadowych obszarów cząsteczek białka na skutek enzymatycznej modyfikacji  $\epsilon$ -aminowych grup lizyny, a więc do zmiany w oddziaływaniu histonów z DNA, może być jednym z mechanizmów regulujących dostępność DNA dla transkrypcji podczas erytropoezy.

## II-5. Metylacja

Metylacji ulegają jedynie histony argininowe, tj. H3 i H4 w komórkach każdego ze stadiów różnicowania krwinki czerwonej (53). Stopień metylacji tych histonów jest jednak 3-krotnie wyższy w erytroblastach niż w retikulocytach. W nieaktywnych metabolicznie erytrocytach nie obserwuje się w ogóle włączania grupy metylowej [ $^{14}\text{CH}_3$ ] metioniny. Analiza aminokwasowa wykazała jednak, że histony H3 retikulocytów

i erytrocytów zawierają prawie identyczną liczbę zmetylowanych reszt lizyny, co sugeruje, że histony argininowe skondensowanej chromatyny erytrocytów podlegają metylacji.

### III. Białka niehistonowe chromatyny komórek erytroidalnych ptaków

#### III-1. Niejednorodność

Erytrocyty ptaków w porównaniu z innymi tkankami charakteryzują się wyjątkowo niską zawartością białek niehistonowych, co pozostaje prawdopodobnie w związku z niską aktywnością matrycową chromatyny tych komórek w syntezie RNA i białka. Stosunek białek niehistonowych do DNA waha się w granicach od 0,2 do 0,5 (61—64). Białka niehistonowe erytrocytów w porównaniu z analogicznymi białkami komórek innych tkanek wykazują znacznie niższą niejednorodność. Oprócz frakcji białek niehistonowych typowych tylko dla erytrocytów występują w ich chromatynie również frakcje spotykane w białkach niehistonowych innych tkanek. Być może są to enzymy katalizujące procesy metaboliczne zachodzące w jądrze komórkowym oraz białka strukturalne chromatyny. Niemniej jednak obserwuje się różnice w ilościowej zawartości tych frakcji białkowych w jądrach komórkowych tkanki erytroidalnej i nieerytroidalnej.

Analiza elektroforetyczna białek niehistonowych (rozpuszczalnych w fenolu o pH 8,4 oraz 9,4) z erytrocytów gęsi wykazała obecność około 17 frakcji w ekstrakcie o pH 8,4 i 12 frakcji w pH 9,4. W analogicznych białkach wątroby obserwowano natomiast odpowiednio 23 i 22 frakcje. Białka niehistonowe komórek erytroidalnych charakteryzują się wyższą zawartością frakcji o masach cząsteczkowych w granicach 80 000—146 000, podczas gdy w białkach niehistonowych wątroby dominują frakcje o masach w zakresie od 20 000 do 80 000 daltonów (45, 62). Według Elg i n a i B o n n e r a (65) frakcja białek niehistonowych o masie cząsteczkowej 146 000 jest charakterystyczna dla erytrocytów.

Porównano rozpuszczalne w 0,35 M roztworze chlorku sodu białka niehistonowe erytrocytów kurcząt oraz grasicy cielęcia (66). Ekstrahujące się w tych warunkach białka niehistonowe erytrocytów charakteryzowały się występowaniem frakcji o wysokich masach cząsteczkowych, których aż 95% strącało się za pomocą 2% roztworu kwasu trójchlorooctowego (w przypadku innych tkanek tylko ok. 50%). Elektroferogramy białka erytrocytów wytrąconego 10% roztworem kwasu trójchlorooctowego nie wykazywały obecności frakcji odpowiadających analogicznemu białkom grasicy cielęcia i owcy, wątroby szczura oraz komórek nowotworowych. Dominowała w nich frakcja o masie cząsteczkowej około 35 000, podczas



gdy w grasicy cielęcia pod względem ilościowym najsilniej reprezentowana była frakcja o masie 25 000 daltonów. Goodwin i wsp. (67) sugerują, że frakcja białek niehistonowych ekstrahująca się 0,35 M roztworem NaCl występuje w nukleosomach aktywnych transkrypcyjnie rejonów chromatyny.

Stosując do izolowania białek niehistonowych metody pozwalające na otrzymanie praktycznie całej puli tych białek wykazano (68), że białka niehistonowe erytrocytów i retikulocytów kaczki są białkami o charakterze kwaśnym. Stosunek aminokwasów kwaśnych do zasadowych wynosi w przypadku erytrocytów 1,53, a retikulocytów 1,46. W wyniku elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, zawierającym SDS, białka te rozdzielały się na 16—26 frakcji o masach cząsteczkowych od 12 500 do 150 000. Zależnie od metod dysocjacji chromatyny oraz izolowania z niej białek niehistonowych obserwowano w ich obrazie elektroforetycznym przewagę bądź frakcji wysokocząsteczkowych (72 000 i 150 000) (69, 70), średnicząsteczkowych (50 000, 65 000 i 70 000) (3, 72), bądź niskocząsteczkowych w zakresie 13 000—20 000 daltonów (71).

Stosowanie różnych technik izolowania białek niehistonowych z materiału biologicznego utrudnia porównanie wyników nawet w obrębie tej samej tkanki.

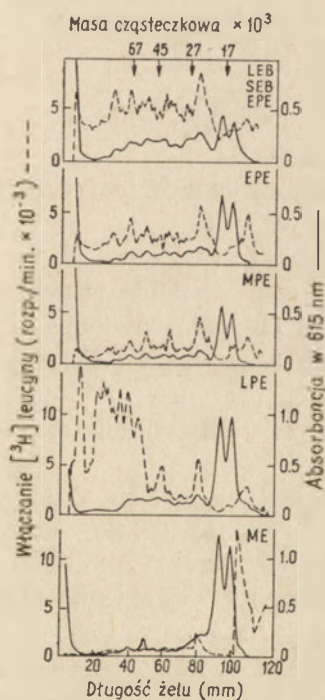
Analiza składu chemicznego zarówno jąder komórkowych jak i chromatyny ptasich komórek erytroidalnych wykazała, że podczas erytropoezy następuje progresywne zubożenie chromatyny tych komórek w białko, spowodowane znacznym obniżeniem ogólnej zawartości białek niehistonowych (3, 72, 73) (Tabela 1). Białka niehistonowe dojrzałych form są mniej niejednorodne, a zmianom podczas erytropoezy podlegają wybiórczo tylko niektóre ich frakcje. Zmiany w elektroferogramach białek niehistonowych zróżnicowanych metabolicznie komórek erytroidalnych kaczki mają charakter głównie ilościowy. Dotyczą one przede wszystkim frakcji o stosunkowo niskich masach cząsteczkowych (26 000 i 28 000 daltonów) (3). Podczas erytropoezy komórek erytroidalnych kur zaznacza się zmniejszenie zawartości frakcji białek niehistonowych o masach cząsteczkowych około 23 000 i 86 000 (73). Porównując obrazy elektroforetyczne białek niehistonowych chromatyny erytrocytów i erytroblastów gołębia wykazano przede wszystkim występowanie różnic jakościowych. Dojrzwaniu komórki erytroidalnej gołębia towarzyszy zanik frakcji o masach cząsteczkowych powyżej 68 000, z równoczesnym pojawieniem się 2—3 dodatkowych frakcji nie występujących w erytroblastach (74).

Przypuszcza się, że dające się wykazać na elektroferogramach ilościowe i jakościowe zmiany w składzie białek niehistonowych podczas erytropoezy, mogą być wynikiem zróżnicowania metabolicznego komórek erytroidalnych.

### III-2. Synteza

W komórkach erytroidalnych intensywność syntezy białek niehistonowych znacznie maleje w miarę dojrzewania komórki (3, 75). W przeciwieństwie więc do większości frakcji histonowych synteza białek niehistonowych odbywa się głównie w fazie  $G_1$ , tj. wyprzedza replikację DNA (76).

Mimo, że erytroblasty charakteryzują się wyższym tempem syntezy białek niehistonowych w porównaniu z bardziej dojrzałymi formami, to jednak te same frakcje białkowe syntetyzowane są przez erytroblasty i wczesne erytrocyty polichromatyczne (wielobarwliwe). W późnych erytrocytach polichromatycznych kaczki obserwuje się syntezę białek niehistonowych o masach w zakresie od 54 000 do 130 000 daltonów. Synteza białek tej grupy nie zachodzi w erytrocytach, a niska ich zawartość w chromatynie tych komórek świadczy, że nie są one gromadzone w dojrzałych formach krwinek (23). W niedojrzałych komórkach erytroidalnych kurcząt występuje natomiast frakcja o masie cząsteczkowej około 81 000, której syntezy nie obserwuje się w erytrocytach (75).



**Ryc. 5.** Synteza białek niehistonowych chromatyny w procesie erytropoezy u kaczki. Wykresy densytometryczne rozdzielów w żelu poliakryloamidowym białek niehistonowych rozpuszczalnych w 1% SDS o pH 8,0 (23).

Być może, te frakcje białkowe pojawiające się w chromatynie późnych erytrocytów polichromatycznych odgrywają istotną rolę w „superrepresji” aktywności jądrowej dojrzałych erytrocytów (Ryc. 5).

### III-3. Fosforylacja

Fosforylacja białek niehistonowych chromatyny komórek erytroidalnych ptaków jest różna w komórkach o różnym stopniu zróżnicowania (77, 78). Ilość znakowanego fosforu włączanego do białek jądrowych retikulocytów kaczki jest ponad 4-krotnie wyższa niż w dojrzałych komórkach. Po zahamowaniu syntezy białek komórkowych puromycyną wykazano, że włączanie fosforu polega na fosforylacji uprzednio zsyntetyzowanych łańcuchów polipeptydowych. Fosforylacja białek niehistonowych może zachodzić przy zahamowanej syntezie DNA i RNA (79). Równolegle ze zmniejszeniem stopnia ufosforylowania białek niehistonowych i ich defosforylacją następuje spadek aktywności kinazy fosfoproteidowej. Sugeruje się, że defosforylacja silnie związanych z DNA białek niehistonowych (nie ekstrahujących się 0,35 M roztworem NaCl) jest jedną z przyczyn inaktywacji genomu podczas erytropoezy (59).

Łatwość zanieczyszczenia frakcji jądrowej komórek erytroidalnych ptaków błonami cytoplazmatycznymi może spowodować błędną interpretację wyników badań nad fosforylacją białek niehistonowych chromatyny tych komórek. Chociaż białka niehistonowe erytrocytów kurcząt (rozpuszczalne w 8 M moczniku) zawierają około 12 razy więcej fosforu niż białka błon, to jednak zdolność fosforylacji tych ostatnich jest 3-krotnie wyższa (79).

### IV. Wpływ histonów i białek niehistonowych na aktywność matrycową chromatyny komórek erytroidalnych ptaków.

Aktywność matrycowa chromatyny erytroblastów gołębia w syntezie RNA stanowi około 5% aktywności matrycowej DNA pozbawionego białek. W przypadku erytrocytów jest ona 8—10 razy niższa. Aktywność matrycowa wyizolowanej chromatyny erytroblastów i erytrocytów stanowi natomiast odpowiednio 12—15% oraz 2—3% aktywności DNA (42, 80).

Niska aktywność matrycowa chromatyny dojrzałych erytrocytów w porównaniu z chromatyną młodszych form (2, 41, 42, 44, 52, 80—85), a także innymi tkankami ptaków (45, 61, 81) czy ssaków (44, 82) wynika najprawdopodobniej ze zmian jakościowych i ilościowych w obrębie białek chromatyny. Rekonstruowana chromatyna zawierająca DNA grasicy cielęcia i białka chromatynowe erytrocytów ma niższą zdolność transkrypcyjną niż chromatyna zawierająca DNA erytrocytów i białka chromatyny grasicy (44).

Badania aktywności matrycowej chromatyny erytrocytów, z której usuwano selektywnie, na drodze kwaśnej ekstrakcji, poszczególne histony wykazały, że usunięcie histonu H1 pozostaje bez wpływu na ten proces.



Usunięcie zaś histonu H5 podwyższa zdolność transkrypcyjną chromatyny o około 50% w stosunku do chromatyny pozbawionej całkowicie histonów. Usunięcie białek niehistonowych powoduje dalszy wzrost aktywności matrycowej o około 21—25% w stosunku do aktywności DNA pozbawionej białek (41, 43, 44). Chromatyna dojrzałych erytrocytów zawiera 5—6 razy mniej miejsc wiązania bromku etydyny niż DNA. Liczba miejsc wiążących barwnik wzrasta najwyraźniej po oddysocjowaniu z chromatyny histonu H5 (43, 86).

Wydaje się, że w komórkach erytroidalnych histony są w większym stopniu odpowiedzialne za ograniczenie aktywności matrycowej chromatyny niż w innych tkankach. Najwyraźniejszy wzrost aktywności matrycowej chromatyny erytrocytów obserwuje się po ekstrakcji histonów H1 i H5 (0,6 M NaCl), podczas gdy w przypadku chromatyny wątroby — po ekstrakcji białek niehistonowych (Tabela 2) (45).

Tabela 2

Zmiany właściwości chromatyny erytrocytów i wątroby kurczenia po ekstrakcji roztworem chlorku sodu (45).

Aktywność matrycową wyliczono w stosunku do aktywności matrycowej DNA, przyjętej jako 100%.

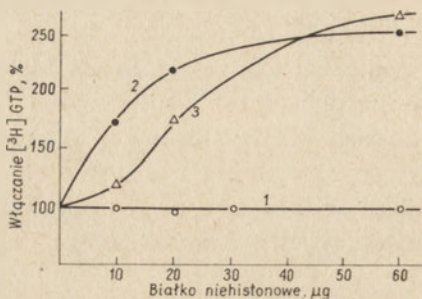
Stężenie NaCl (M)	Białko/DNA		Aktywność matrycowa	
	erytrocyty	wątroba	erytrocyty	wątroba
0,1	1,05	2,25	2,1	9,6
0,4	0,85	1,71	2,9	14,6
0,6	0,64	1,55	33,3	32,6
1,0	0,44	0,85	37,6	45,3
2,0	0,24	0,60	84,9	64,0

Wyniki badań struktury chromatyny sugerują istotny udział histonu H5 w inaktywacji genomu erytrocytów. Po przeprowadzeniu rozdzielania chromatograficznego chromatyny erytrocytów na ECTHAM-celulozie okazało się, że nie zawiera ona obszarów pozbawionych histonu H5, analogicznych do rejonów pozbawionych histonu H1 w chromatynie tkanek nieerytroidalnych (87).

Wydaje się, że nie tylko histon H5 bierze udział w „superrepresji” genomu erytrocytów. Białka niehistonowe chromatyny erytroblastów, w układzie pozakomórkowym, zwiększają około 3-krotnie aktywność matrycową chromatyny erytrocytów w syntezie RNA. Dodanie białek niehistonowych erytrocytów pozostaje bez wpływu na ten proces lub nawet

go hamuje. Syntezę RNA stymulują głównie białka niehistonowe erytroblastów rozpuszczalne w 0,35 M roztworze NaCl (Ryc. 6) (74).

Technika hybrydyzacji globinowego mRNA z komplementarnym DNA (cDNA), otrzymanym na matrycy globinowego mRNA z użyciem odwrotnej transkryptazy, pozwoliła bliżej scharakteryzować nowosyntetyzowane produkty transkrypcji hybrydów chromatynowych. W wyniku jej zasto-



**Ryc. 6.** Wpływ białek niehistonowych chromatyny erytrocytów i erytroblastów globina na aktywność matrycową chromatyny erytrocytów w obecności polimerazy RNA z *E. coli* (74).

1 — białka niehistonowe erytrocytów, 2 — białka niehistonowe erytroblastów rozpuszczalne w 0,35 M NaCl, 3 — białka niehistonowe erytroblastów nierozpuszczalne w 0,35 M NaCl.

sowania sugeruje się, że za specyficzną transkrypcję genu globiny, podstawowego białka powstającego w komórkach erytroidalnych, odpowiedzialne są właśnie białka niehistonowe. Synteza RNA analogicznego z globinowym mRNA zachodzi tylko w układzie zawierającym chromatynę otrzymaną z retikulocytów. Nie stwierdza się jej w przypadku chromatyny wątroby lub DNA retikulocytów pozbawionego białek (88). Sekwencje nukleotydowe swoiste dla globinowego mRNA syntetyzują się tylko na rekonstruowanej chromatynie retikulocytów zawierającej białka niehistonowe retikulocytów (podstawienie ich białkami niehistonowymi wątroby uniemożliwia syntezę globiny) (89). Według Chiu i wsp. (90) za rozpoznawanie sekwencji nukleotydowej genu globinowego odpowiedzialna jest frakcja białek niehistonowych o wysokim powinowactwie do DNA, podczas gdy białka niehistonowe luźno związane z DNA oraz histony tej cechy nie wykazują. Chromatyna rekonstruowana z DNA, histonów i „luźno” związanych z DNA białek niehistonowych mózgu kurczęcia oraz białek niehistonowych o wysokim powinowactwie do DNA pochodzącym z retikulocytów, syntetyzuje globinowe mRNA z taką samą efektywnością co chromatyna rekonstruowana z DNA i białek retikulocytów.

## V. Uwagi końcowe

Wydaje się, że na poziomie transkrypcji należy szukać przyczyn morfologicznych, biochemicznych i funkcjonalnych zmian fenotypu komórek erytroidalnych podczas erytropoezy. Procesowi różnicowania i dojrzewa-

nia krwinek czerwonych towarzyszą zmiany właściwości fizykochemicznych i cytochemicznych kompleksu DNA-białko w chromatynie. W miarę różnicowania się ptasich komórek erytroidalnych ich chromatyna traci zdolność wiązania barwników zasadowych, prawdopodobnie na skutek maskowania ujemnie naładowanych grup fosforanowych DNA przez białka (12). Obserwuje się wzrost odporności chromatyny na denaturację termiczną i kwaśną hydrolizę w reakcji Feulgena. Równolegle maleje w komórkach erytroidalnych aktywność polimerazy RNA (39, 80, 91), a aktywność polimerazy DNA i kinazy tymidynowej wykrywa się jedynie w komórkach najmłodszych form zachowujących zdolność podziału i syntezy DNA (92, 93).

Chociaż charakterystyczny dla komórek erytroidalnych ptaków histon H5 obecny jest w komórkach wszystkich stadiów rozwojowych, to jego zawartość w chromatynie wzrasta wraz z postępującym zróżnicowaniem komórki i kondensacją chromatyny. Przy ogromnej konserwatywności ewolucyjnej histonów pojawienie się w komórkach erytroidalnych frakcji H5 musi mieć zapewne związek z pełnieniem przez nią ściśle określonej funkcji. Zmniejszenie zawartości jak i stopnia niejednorodności białek niehistonowych chromatyny w komórkach erytroidalnych w czasie erytropoezy u ptaków, sugerują, że są one konieczne do utrzymania chromatyny w stanie rozproszonym oraz aktywnej transkrypcji genomu. Obniżenie stopnia enzymatycznych postsyntetycznych modyfikacji struktury pierwszorzędowej histonów i białek niehistonowych wpływa prawdopodobnie w konsekwencji na zmiany struktury i funkcji chromatyny.

Nie bez znaczenia są też zapewne zmiany w składzie jonowym środowiska, akumulacja hemoglobiny i obniżona zawartość wody w przestrzeni jądrowej, mogące w niespecyficzny sposób ograniczać aktywność matrycową chromatyny (2, 83, 84, 94).

Fakt, że nieczynne metabolicznie jądro erythrocytu może ulec reaktywacji (95, 96) w warunkach *in vitro* (po połączeniu go w heterokariony z aktywnymi metabolicznie komórkami przy udziale wirusa Sendai) być może przyczyni się do wyjaśnienia procesu inaktywacji genomu podczas erytropoezy.

Artykuł otrzymano 1.8.1977; po rewizji autorskiej przyjęto 19.12.1977.

## PIŚMIENNICTWO

1. Williams A. F. (1972), *J. Cell Sci.*, 10, 27—46.
2. Seligy V. L., Adams G. H. M., Neelin J. M. (1973), w *The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms*, red. Polla J. K., Wilson Lee J., str. 177—190, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland, Boston—U.S.A.
3. Ruiz-Carrillo A., Wang L. J., Littau V. C., Allfrey V. G. (1974), *J. Biol. Chem.*, 249, 7358—7368.



4. Modak S. P., Commelin D., Grosset L., Imaizumi M. - T., Monnat M., Scherrer K. (1975), *Eur. J. Biochem.*, **60**, 407—421.
5. Cameron I. L., Prescott D. M. (1963), *Exp. Cell Res.*, **30**, 609—612.
6. Sadgopal A., Kabat D. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **190**, 486—495.
7. Attardi G., Parnas H., Attardi B. (1970), *Exp. Cell Res.*, **62**, 11—31.
8. Madgwick N. J., Maclean N., Baynes J. A. (1972), *Nature New Biology*, **238**, 137—139.
9. Schechter N. M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, 129—136.
10. Scheintaub H. M., Fill R. J. (1973), *Exp. Cell Res.* **80**, 442—445.
11. Davies G. H. (1968), *J. Cell Sci.*, **3**, 129—150.
12. Kernell A. M., Bolund L., Ringertz N. R. (1971), *Exp. Cell Res.*, **65**, 1—6.
13. Dardick I., Setterfield G. (1976), *Exp. Cell Res.*, **100**, 159—171.
14. Neelin J. M., Butler G. C. (1961), *Can. J. Biochem. Physiol.*, **39**, 485—491.
15. Hnilica L. S. (1964), *Experientia*, **20**, 13—14.
16. Neelin J. M., Callahan P. X., Lamb D. C., Murray K. (1964), *Can. J. Biochem.*, **42**, 1743—1752.
17. Purkayastha R., Neelin J. M. (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 468—477.
18. Edwards L. J., Hnilica L. S. (1968), *Experientia*, **24**, 228—229.
19. Neelin J. M. (1968), *Can. J. Biochem.*, **46**, 241—247.
20. Panyim S., Bilek D., Chalkley R. (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4206—4215.
21. Greenaway P. J. (1971), *Biochem. J.*, **124**, 319—325.
22. Garel A., Burckard J., Mazen A., Champagne M. (1972), *Biochimie*, **54**, 451—455.
23. Ruiz-Carrillo A., Wangh L. J., Allfrey V. G. (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 273—290.
24. Garel A., Mazen A., Champagne M., Sautiere P., Kmiecik D., Loy O., Biserte J. (1975), *FEBS Letters*, **50**, 195—199.
25. Seligy V., Roy C., Dove M., Jaguchi M. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 196—202.
26. Sautiere P., Briand G., Kmiecik D., Loy O., Biserte G., Garel A., Champagne M. (1976), *FEBS Letters*, **63**, 164—166.
27. Sautiere P., Kmiecik D., Loy O., Briand G., Biserte G., Garel A., Champagne M. (1975), *FEBS Letters*, **50**, 200—203.
28. Strickland W. N., Schaller H., Strickland M., Von Holt C. (1976), *FEBS Letters*, **66**, 322—327.
29. Jaguchi M., Roy C., Dove M., Seligy V. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 100—106.
30. Dick C., Johns E. W. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 414—418.
31. Apples R., Wells J. R. E., Williams A. F. (1972), *J. Cell Sci.*, **10**, 47—59.
32. Mazen A., Champagne M. (1972), *Biochimie*, **54**, 1273—1279.
33. Sotirov N., Johns E. W. (1972), *Exp. Cell Res.*, **73**, 13—16.
34. Tsai Y. H., Hnilica L. S. (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 107—112.
35. Brasch K. (1976), *Exp. Cell Res.*, **101**, 396—410.
36. Sung M. T. (1977), *Biochemistry*, **16**, 286—290.
37. Kinkade J. M. Jr. (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 3375—3386.
38. Lipińska A., Kłyszajko-Stefanowicz L. (1974), *Post. Biochemii*, **20**, 145—164.
39. Billett M. A., Hindley J. (1972), *Eur. J. Biochem.* **28**, 451—462.
40. Moss B. A., Joyce W. G., Ingram V. M. (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 1025—1031.

41. Seligy V. L., Neelin J. M. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 380—390.
42. Gazaryan K. J., Andreeva N. B. (1972), *FEBS Letters*, **27**, 263—266.
43. Williams A. F., Lurquin P. F., Seligy V. L. (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 426—432.
44. Bolund L., Johns E. W. (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 591—598.
45. Seligy V. L., Miyagi M. (1974), *Eur. J. Biochem.*, **46**, 259—269.
46. Brasch K., Setterfield G., Neelin J. M. (1972), *Exp. Cell Res.* **74**, 27—41.
47. Miller G. J., Berlowitz L., Regelson W. (1972), *Exp. Cell Res.*, **71**, 409—421.
48. Brasch K., Adams G. H. M., Neelin J. M. (1974), *J. Cell Biol.*, **15**, 659—677.
49. Adams G. H. M., Neelin J. M. (1976), *Can. J. Biochem.*, **54**, 571—577.
50. Ruiz-Carrillo A., Wangh L. J., Allfrey V. G. (1975), *Science*, **190**, 117—128.
51. Appels R., Wells J. R. E. (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 425—434.
52. Appels R., Harlow R., Tolstoshev P., Wells J. R. E. (1973), w *The Biochemistry of Gene Expression in Higher Organisms*, red. Pollak J. K., Wilson Lee J., str. 191—205, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht-Holland (Boston — U.S.A).
53. Sung M. T., Harford J., Bundman M., Vidalakas G. (1977), *Biochemistry*, **16**, 279—285.
54. Seligy V. L., Neelin J. M. (1971), *Can. J. Biochem.*, **49**, 1062—1070.
55. Seligy V. L., Neelin J. M. (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 1316—1324.
56. Adams G. H. M., Vidali G., Neelin J. M. (1970), *Can. J. Biochem.*, **48**, 33—37.
57. Tobin R. S., Seligy V. L. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 358—364.
58. Kurochin S. N., Andreeva N. B., Gasaryan K. G., Severin E. S., Kurchatov I. V. (1977), *FEBS Letters*, **76**, 112—114.
59. Gazaryan K. G., Fedina A. B., Andreeva N. B., Vishnevskaya T. Yu. (1976), X<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry, Hamburg, Abstr. Commun. str. 77.
60. Sanders L. A., Schechter N. M., McCarty K. S. (1973), *Biochemistry*, **12**, 783—791.
61. Dingman C. W., Sporn M. B. (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3483—3492.
62. Shelton K. R., Neelin J. M. (1971), *Biochemistry*, **10**, 2342—2348.
63. Spelsberg T. C., Steggles A. W., O'Malley B. W. (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **254**, 129—134.
64. Wilson E. M., Spelsberg T. C. (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 145—154.
65. Elgin S. C. R., Bonner J. (1970), *Biochemistry*, **9**, 4440—4447.
66. Burckard J., Mazon A., Champagne M. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 434—441.
67. Goodwin G. H., Woodhead L., Johns E. W. (1977), *FEBS Letters*, **73**, 85—88.
68. Sanders L. A. (1974), *Biochemistry*, **13**, 527—534.
69. Graziano S. L., Huang R. C. C. (1971), *Biochemistry* **10**, 4770—4777.
70. Levy S., Simpson R. T., Sober H. A. (1972), *Biochemistry*, **11**, 1547—1554.
71. Mac Gillivray A. J., Cameron A., Krouze R. J., Rickwood D., Paul J. (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **227**, 384—402.
72. Harlow R., Wells J. R. E. (1975), *Biochemistry*, **14**, 2665—2674.
73. Krajewska W., Wierzbicki R., Kłyszajko-Stefanowicz L. (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 177—183.

74. Fedina A. B., Gazaryan K. G. (1976), *Mol. Biol.*, **10**, 593—599.
75. Jeter J. R., Knieriem K. M., Cameron I. L. (1976), *Cytobios*, **15**, 183—189.
76. Kiliańska Z., Kłyszzejko-Stefanowicz L. (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 533—558.
77. Gershey E. L., Kleinsmith L. J. (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 519—525.
78. Shelton K. R., Seligy V. L., Neelin J. M. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 375—383.
79. Cobss C. S., Shelton K. R. (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **170**, 468—475.
80. Gazaryan K. G., Ananjanc T. G., Fedina A. B., Andreeva N. B. (1973), *Mol. Biol.*, **7**, 73—83.
81. Seligy V., Miyagi M. (1969), *Exp. Cell Res.*, **58**, 27—34.
82. Hoare T. A., Johns E. W. (1970), *Biochem. J.*, **119**, 931—932.
83. Brasch K., Seligy V. L., Setterfield G. (1971), *Exp. Cell Res.*, **65**, 61—72.
84. Leake R. E., Trench M. E., Barry J. M. (1972), *Exp. Cell Res.*, **71**, 17—26.
85. Seligy V. L., Lurquin P. F. (1973), *Nature New Biology*, **243**, 20—21.
86. Lurquin P. F., Seligy V. L. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1399—1404.
87. Reeck G. (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 117—122.
88. Axel R., Cedar H., Felsenfeld G. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2029—2032.
89. Barrett T., Maryanka D., Hamlyn P. H., Gould H. J. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 5057—5061.
90. Chiu J.-F., Tsai Y.-H., Sakuma K., Hnilica L. S. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 9431—9433.
91. Appels R., Williams A. F. (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 531—534.
92. Williams A. F. (1972), *J. Cell Sci.*, **11**, 785—798.
93. Williams A. F. (1972), *J. Cell Sci.*, **11**, 777—784.
94. Kobat D., Attardi G. (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **138**, 382—399.
95. Harris H. (1967), *J. Cell Sci.*, **2**, 23—32.
96. Apples R., Tallroth E., Appels D. M., Ringertz N. R. (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 70—78.



PIOTR CHOMCZYŃSKI \*)

## Regulacja transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy

### Regulation of Transcription in Mammary Gland During Lactogenesis

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Zmiany układu transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy
  - II-1. Synteza RNA *in vivo*
  - II-2. Zmiany aktywności polimeraz RNA
  - II-3. Budowa i aktywność matrycowa chromatyny
- III. Oddziaływanie hormonów i innych związków biologicznie czynnych na transkrypcję w gruczole mlecznym
  - III-1. Insulina
  - III-2. Prolaktyna
  - III-3. Glukokortykoidy
  - III-4. Cykliczne nukleotydy
  - III-5. Spermidyna
- IV. Schemat regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy
- V. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Preface
- II. Changes in transcriptional system in mammary gland during lactogenesis
  - II-1. RNA synthesis *in vivo*
  - II-2. Changes in RNA polymerase activity
  - II-3. Structure and template activity of chromatin
- III. Effect of hormones and other biologically active compounds on transcriptions in mammary gland
  - III-1. Insulin
  - III-2. Prolactin
  - III-3. Glucocorticoids
  - III-4. Cyclic nucleotides
  - III-5. Spermidyne
- IV. Pattern of regulation of transcription in mammary gland during lactogenesis
- V. Final comments

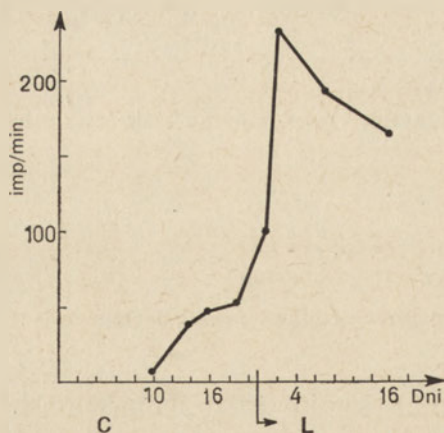
\*) Dr, Zakład Biochemii, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, PAN, Jastrzębiec 05-551 Mroków.

Podczas pierwszej ciąży zwierzęcia gruczoł mleczny ulega przemianom prowadzącym do podjęcia przez ten narząd wydzielania mleka. Dzieje się to na skutek przekształcenia komórek nabłonkowych w komórki typowo wydzielnicze o aktywnym metabolizmie. W przekształconych komórkach nabłonkowych zachodzi synteza charakteryzujących laktację białek mleka. Zespół procesów prowadzących do podjęcia syntezy białek oraz pozostałych składników mleka określa się jako laktogenezę. Już w trzydziestych latach naszego stulecia pojawiły się prace wskazujące, że procesy te są indukowane a następnie sterowane hormonalnie. Do hormonów bezpośrednio uczestniczących w regulacji laktogenezы zalicza się: insulinę, prolaktynę, hormon laktogeny z łożyska i glukokortykoidy (1, 2, 3, 4, 5, 6). Można sądzić, że kluczową rolę w laktogenezie odgrywają zmiany w odczytywaniu informacji genetycznej zawartej w matrycy chromatynowej (zmiany transkrypcji), u podłoża których leżą oddziaływania hormonów. Regulacja transkrypcji w gruczole mlecznym podobnie jak i w innych tkankach nie została dotąd szczegółowo poznana. Istnieje jednak szereg danych, na podstawie których można przedstawić schemat pokazujący przynajmniej część wzajemnie powiązanych dróg oddziaływań hormonów i innych substancji na proces transkrypcji w omawianym narządzie.

## II. Zmiany układu transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezы

### II-1. Synteza RNA *in vivo*

W okresie ciąży obserwuje się w gruczole mlecznym znaczne ożywienie procesów anabolicznych, w tym syntezy RNA (7, 8, 9). Wzrost aktywności syntezy RNA zachodzi szczególnie intensywnie w drugiej połowie

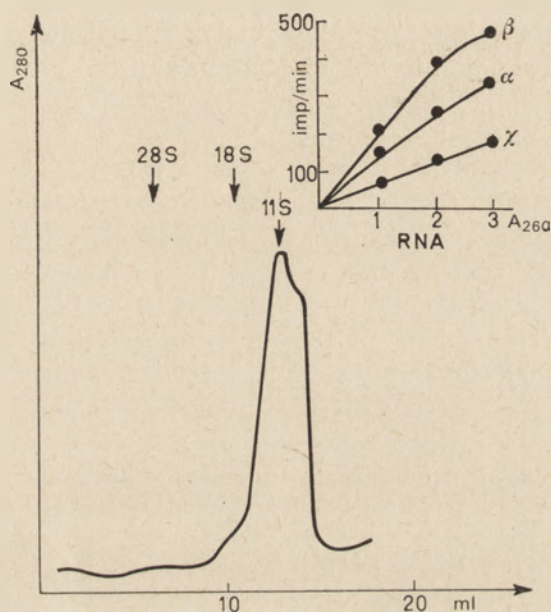


**Ryc. 1.** Włączenie [ $^{14}\text{C}$ ] urydyny do RNA w gruczole mlecznym myszy w okresie ciąży (C) i laktacji (L) (7).

Myszom wstrzykiwano  $20 \mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ] urydyny i po 1 godz. oznaczano radioaktywność włączoną do RNA. Wyniki podano w imp/min w przeliczeniu na mg tkanki gruczołu mlecznego.

ciąży i w początkowym okresie laktacji. Ilustruje to rycina 1, na której przedstawiono włączanie *in vivo* [ $^{14}\text{C}$ ] urydyny do RNA w gruczole mlecznym myszy. Podobne zależności stwierdzono również u szczura (10).

Aktywacja syntezy RNA w gruczole mlecznym poprzedzona jest wzrostem aktywności enzymów biorących udział w reutilizacji puryn, fosforybozylotransferazy purynowej (E.C. 2.4.2.7.) i nukleozydofosforylasy purynowej (E.C. 2.4.2.1.) (7). Wzrost aktywności transkarbamylazy asparaginianowej (E.C. 2.1.3.5.) — pierwszego enzymu cyklu syntezy pirymidyn — zachodzi równolegle ze wzrostem syntezy RNA (11).



**Ryc. 2.** Profil sedimentacyjny (A) i aktywność matrycowa mRNA (B) izolowanego z laktującego gruczołu mlecznego (22).

Frakcję mRNA z gruczołu mlecznego owcy użyto jako matrycę w bezkomórkowym układzie z retikulocytów królika, oznaczając metodą immunoprecypitacji ilość zsyntetyzowanych [ $^{14}\text{C}$ ] kazein —  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .

W wyniku zwiększonej aktywności syntezy RNA i spadku poziomu rybonukleaz (12, 13), w tkance gruczołu mlecznego podczas laktogenezy wzrasta zawartość RNA. Podwyższenie poziomu RNA w tym okresie rozwojowym wykazano w gruczole mlecznym myszy (14, 15), szczura (16, 17, 18) i owcy (16). Porównanie preparatów RNA izolowanych w okresie ciąży i laktacji wykazało, że w okresie laktacji następuje wzrost zawartości rybosomowego RNA. RNA ekstrahowany z gruczołu mlecznego królika, w okresie ciąży zawiera do 60% rRNA, a w okresie laktacji 70—80% rRNA, niezależnie od metody izolowania RNA (fenol-SDS, fenol) i sposobu analizy (wirowanie w gradiencie sacharozy, elektroforeza w żelu po-



liakryloamidowym, selektywne wytrącanie) (19). Wzrostowi poziomu RNA w gruczole mlecznym w czasie laktogenezy towarzyszą jakościowe zmiany RNA. Za pomocą hybrydyzacji wykazano, że w okresie tym zachodzą zmiany w populacji szybkoznakującego się RNA (20). Campbell i wsp. (21) stwierdzili w tkance gruczołu mlecznego w okresie laktacji obecność RNA o stałej sedymentacji 10—11 S i właściwościach mRNA. Wykazano następnie, że jest to grupa mRNA kodujących syntezę kazein  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  oraz laktoalbuminę i  $\beta$ -laktoglobulinę (22, 23). Masę cząsteczkową badanych mRNA ustalono na około  $3,5 \times 10^5$  daltonów, co odpowiada łańcuchowi zawierającemu 900 nukleotydów. Uzyskana wartość jest wyższa niż wynikałoby to z wyliczeń długości mRNA na podstawie mas cząsteczkowych białek mleka. Wskazuje to, że mRNA białek mleka zawiera, podobnie jak inne mRNA, sekwencje nie ulegające translacji.

## II-2. Zmiany aktywności polimeraz RNA

Zmiany syntezy RNA mierzone *in vivo* znajdują swoje odbicie w zmianach aktywności układów bezkomórkowych izolowanych z gruczołu mlecznego. Intensywność syntezy RNA w jądrach komórkowych gruczołu mlecznego królika jest około dwukrotnie wyższa w okresie laktacji w porównaniu z okresem ciąży (24). Jednocześnie w okresie ciąży około 60%, a w okresie laktacji 40% aktywności syntetycznej jąder hamowane jest

Tabela 1

Aktywność polimerazy A i polimerazy B w gruczole mlecznym królika w okresie późnej ciąży i w początkowym okresie laktacji (26).

Stan fizjologiczny	Aktywność polimerazy RNA pmoles $[^3\text{H}]$ UTP/mg tkanki		Procentowy udział polimerazy	
	A	B	A	B
ciąża — 21 dni	21	51	29	71
ciąża — 25 dni	14	41	25	75
laktacja — 4 dni	34	56	37	62
laktacja — 5 dni	91	50	65	35

przez  $\alpha$ -amanitynę. Anderson i wsp. (25) badając zależną od DNA polimerazę RNA (EC. 2.7.7.6.) stwierdzili obecność w gruczole mlecznym dwu głównych klas polimerazy RNA; polimerazę A niewrażliwą na  $\alpha$ -amanitynę, syntetyzującą rRNA i polimerazę B wrażliwą na działanie  $\alpha$ -amanityny, syntetyzującą mRNA. Stwierdzono ponadto obecność niewielkiej ilości polimerazy C. Przyrost aktywności polimerazy A w jądrach izolowanych w okresie laktacji świadczy więc o wzroście syntezy rRNA. Podobne wyniki uzyskano oznaczając aktywność preparatów polimerazy

RNA izolowanych z gruczołu mlecznego królika, przy zastosowaniu jako matrycy DNA z grasicy cięłej (26). Pomiędzy końcowym okresem ciąży i początkiem laktacji aktywność polimerazy A wzrasta około czterokrotnie, natomiast aktywność polimerazy B utrzymuje się na tym samym poziomie (Tabela 1). Wyniki te świadczą o możliwości regulacji transkrypcji poprzez zmianę aktywności polimerazy RNA w ciągu laktogenezy.

### II-3. Budowa i aktywność matrycowa chromatyny

W piśmiennictwie istnieje szereg danych na temat zmian w budowie chromatyny podczas wzrostu i różnicowania się tkanek zwierzęcych, w szczególności zaś na temat zmian w składzie białek niehistonowych (27, 28, 29). Podobne zmiany obserwowano w czasie rozwoju gruczołu mlecznego. Rozdziały elektroforetyczne w żelu poliakryloamidowym białek niehistonowych izolowanych z chromatyny komórek nabłonkowych gruczołu

Tabela 2

Zawartość histonów i białek niehistonowych w chromatynie komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego podczas laktogenezy (Chomczyński P., dane niepublikowane).

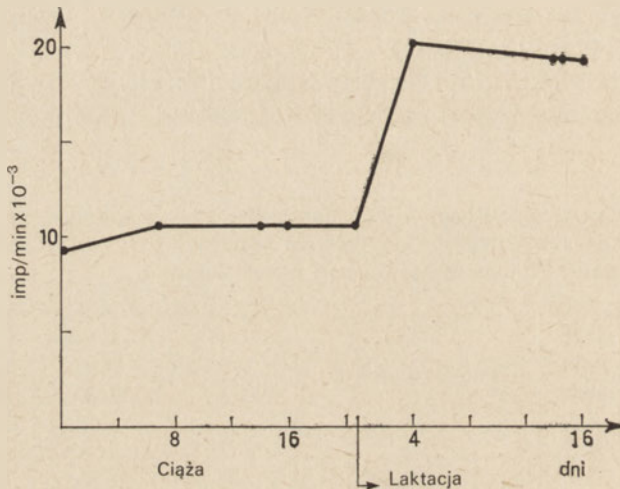
Gruczoł mleczny	Stan fizjologiczny	Białka chromatynowe mg/mg DNA	
		histony	białka niehistonowe
myszy	okres dziewiczy	0,97	0,51
	ciąża — 10 dni	1,04	0,52
	„ — 16 dni	0,95	0,72
	„ — 19 dni	1,09	0,79
	laktacja 1 dzień	1,02	1,19
	„ — 7 dni	1,07	1,27
królika	okres dziewiczy	1,18	0,69
	ciąża — 17 dni	1,22	0,78
	„ — 24 dni	1,20	0,87
	„ — 29 dni	1,20	1,03
	laktacja 1 dzień	1,15	1,09
	„ — 7 dni	1,16	1,13

mlecznego myszy i szczura wykazały, że frakcja białek niehistonowych izolowana z gruczołu w okresie laktacji różni się od frakcji izolowanej z gruczołu dziewiczego (30). W czasie laktogenezy, obok zmian jakościowych obserwuje się również wzrost zawartości białek niehistonowych w chromatynie komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego (Tabela 2).

Natomiast zawartość histonów (ogólna liczba oraz ilość histonów poszczególnych frakcji) nie ulega w tym okresie istotnym zmianom (31, 32).

Przyjmuje się, że frakcja białek niehistonowych zawiera specyficzne aktywatory genów (27, 33, 34). Można więc przypuszczać, że zmiany jakościowe i ilościowe białek niehistonowych obserwowane podczas laktogenezy mają związek z aktywnością transkrypcji genów w chromatynie gruczołu mlecznego.

Oznaczenia aktywności matrycowej chromatyny gruczołu mlecznego szczura przeprowadzone przez Barkera i Ludwicka (35) wykazały, że w okresie laktogenezy następuje około dwukrotny wzrost tej aktywności (Ryc. 3).



**Ryc. 3.** Aktywność matrycowa chromatyny gruczołu mlecznego szczura w okresie ciąży i laktacji (35).

Aktywność chromatyny oznaczano przez włączanie [<sup>14</sup>C] ATP do RNA wobec polimerazy RNA z *Escherichia coli*.

Okresem szczególnie intensywnego wzrostu aktywności matrycowej (80% przyrostu aktywności) był koniec ciąży i początek laktacji. W tym samym czasie liczba odcinków DNA w chromatynie zawierających wolne grupy fosforanowe (nie zablokowane białkami, głównie histonami), będących miejscem syntezy RNA nie zmienia się w sposób istotny. Badając białka niehistonowe chromatyny za pomocą metody elektroforezy w żelu poliakryloamidowym stwierdzono, że w okresie późnej ciąży i wczesnej laktacji skład białek niehistonowych nie ulegał zmianom. Zaobserwowano natomiast wzrost ilości tych białek o około 30%. Wydaje się, że przebudowa chromatyny wraz ze zmianami w składzie białek niehistonowych wykazanymi przez Kadohamę i Turkingtona (30), zachodzi wcześniej niż w końcowym okresie ciąży.

Interesującym faktem jest stwierdzenie obecności mRNA kazein, jak również kazein w gruczole mlecznym królika w środkowym okresie ciąży



(23, 37, 38). Świadczy to o rozpoczęciu ekspresji genów białek mleka już we wczesnym okresie rozwoju gruczołu mlecznego. Odblokowanie genów białek mleka może zachodzić w środkowym okresie ciąży podczas „krytycznej mitozy”. Terminem tym określono podział mitotyczny, po którym komórki nabłonkowe gruczołu mlecznego stają się wrażliwe na laktogenne działanie prolaktyny i wchodzą w okres intensywnych podziałów i różnicowania (38, 39). W świetle przytoczonych faktów wydaje się, że chromatywa komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego przygotowana jest do transkrypcji genów kodujących białka mleka znacznie wcześniej niż zostaje podjęta przez gruczoł mleczny funkcja wydzielania mleka. W okresie bezpośrednio poprzedzającym laktację zachodzą jedynie modyfikacje chromatyny prowadzące do zwiększenia aktywności transkrypcji uprzednio odblokowanych genów. Modyfikacje te polegać mogą na przyroście ilościowym białek niehistonowych oraz na fosforylacji lub acetylacji białek chromatynowych. Wykazano, że pod wpływem insuliny następuje w tkance gruczołu mlecznego acetylacja histonów H4 i H2A (6). Badania fosforylacji histonów i białek niehistonowych w chromatynie gruczołu mlecznego wykazały, że fosforylacji ulegają reszty seryny i treoniny. Proces ten kontrolowany jest przez hormony. Insulina dodana do hodowli tkanki gruczołu mlecznego stymuluje włączanie  $^{32}\text{P}$  do białek chromatynowych około dziesięciokrotnie. Podobny efekt wywołuje prolaktyna (5, 40).

### **III. Oddziaływanie hormonów i innych związków biologicznie czynnych na transkrypcję w gruczole mlecznym**

Przedstawione w poprzednim rozdziale wyniki wskazują, że podczas laktogenezy w gruczole mlecznym zachodzą przeobrażenia układu transkrypcji, mające na celu nie tylko pobudzenie ogólnej aktywności syntezy RNA, lecz także rozpoczęcie transkrypcji nowych genów. Jak już wspomniano na wstępie hormony odgrywają decydującą rolę sterując przebieg procesów zachodzących podczas laktogenezy. W wielu przypadkach dla zadziałania impulsu hormonalnego potrzebne jest współdziałanie innych hormonów. Jednym z przykładów jest hormonalna indukcja laktacji. Pod skoordynowanym działaniem insuliny, prolaktyny i glukokortykoidów następuje w gruczole mlecznym intensyfikacja procesów związanych z laktacją. W ostatnich latach ukazało się szereg badań dotyczących działania insuliny, prolaktyny i glukokortykoidów jako regulatorów transkrypcji w gruczole mlecznym. Badania te w większości wykonywane były przy użyciu hodowli tkanki gruczołu mlecznego i tylko w nielicznych przypadkach badano działanie hormonów na transkrypcję w układach bezkomórkowych. Poznanie niektórych mechanizmów hormonalnej regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym było możliwe dzięki znacznemu

postępowi wiedzy o działaniu hormonów, jaki dokonał się w ubiegłym dziesięcioleciu. Złożyło się na to poznanie roli cykazy adenylowej (E. C. 4.6.1.1.) i cAMP, wykrycie specyficznych receptorów hormonów białkowych w błonie komórkowej i receptorów hormonów sterydowych w cytoplazmie oraz poznanie niektórych funkcji receptorów (41).

### III-1. Insulina

Komórki nabłonkowe gruczołu mlecznego myszy dziewiczej lub szczurka są niewrażliwe na działanie insuliny. Wrażliwość komórek na ten hormon pojawia się w drugim dniu ciąży podczas przejściowego, znacznego wzrostu stężenia prolaktyny we krwi (42). Wrażliwość tę można również wywołać przez wstrzyknięcie dziewiczemu zwierzęciu prolaktyny (43). W hodowli tkanki gruczołu mlecznego myszy dziewiczej wrażliwość na insulinę pojawia się po 24 godz. niezależnie od obecności w płynie hodowlanym prolaktyny (44).

Przypuszcza się, że przyczyną omawianych zmian wrażliwości komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego na działanie insuliny są zmiany aktywności receptora znajdującego się na powierzchni komórek (45).

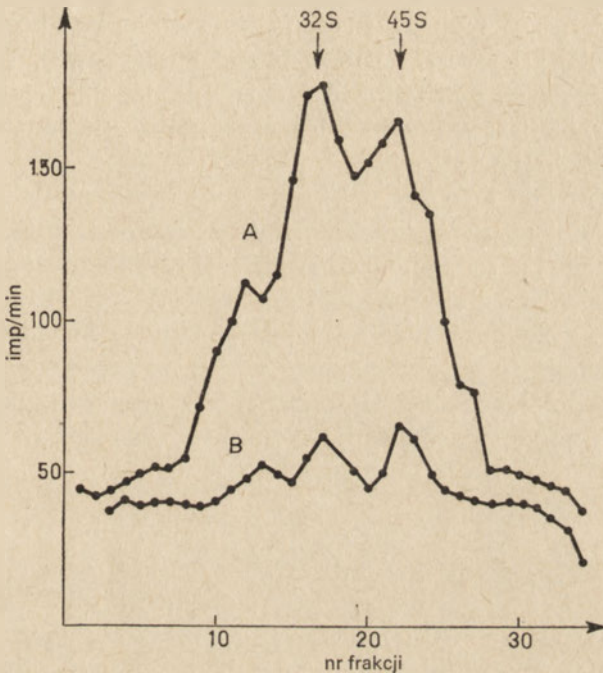
Wraz z pojawieniem się wrażliwości komórek nabłonkowych na działanie insuliny zapoczątkowany zostaje proces laktogenezy. Pod wpływem insuliny wzrasta aktywność syntezy DNA, RNA i białek i tym samym rozpoczyna się rozrost tkanki (46). Jednak pierwszym efektem oddziaływania insuliny na komórki gruczołu mlecznego jest stymulacja syntezy RNA. Inkubacja skrawków gruczołu mlecznego w obecności insuliny prowadzi bowiem do wzrostu syntezy RNA już po pół godzinie od momentu dodania hormonu (47, 48). Stwierdzono, że insulina stymuluje syntezę zarówno prerybosomowego 45S RNA jak i wysokomolekularnego, heterogennego RNA o stałej sedymentacji od 47S do 100S i składzie zasad zbliżonym do DNA (Ryc. 4). Po zahamowaniu transkrypcji przez aktynomycynę D 45S RNA ulega przemianom do 32S, 28S i 18S RNA, a heterogeny RNA ulega szybkiemu rozkładowi (48). Oddziaływanie insuliny na intensywność syntezy RNA zaznacza się najsilniej podczas pierwszych 24 godzin hodowli tkanki gruczołu mlecznego. W późniejszym okresie hodowli maksymalny efekt działania insuliny można uzyskać jedynie w obecności prolaktyny i hydrokortyzonu (49, 50).

W szeregu przypadkach oddziaływanie insuliny na intensywność procesów metabolicznych sprowadza się do zmian w szybkości pobierania przez komórki substratów danych reakcji enzymatycznych (51, 52). Również w hodowli tkanki gruczołu mlecznego stwierdzono, że insulina zwiększa tempo pobierania urydyny przez komórki (53, 54). Zjawisko to ma związek jednak ze wzmożoną fosforylacją urydyny, a nie z bezpośrednim oddziaływaniem hormonu na transport urydyny przez błonę komórkową.



Ponadto stwierdzono, że stymulujące działanie insuliny na intensywność syntezy RNA zachodzi niezależnie od wpływu hormonu na pobieranie urydyny (54).

Według schematu zaproponowanego przez Turkingtona (55) wpływ insuliny na intensywność syntezy RNA, w gruczole mlecznym zachodzi poprzez interakcję insuliny z receptorem w błonie komórkowej, bez wnikania hormonu do wnętrza komórki, zgodnie z przyjętym poglądem na mechanizm działania hormonów peptydowych (41, 56). Cząsteczki hormonu wychwytywane przez receptory działają następnie na znajdu-



**Ryc. 4.** Profil sedymentacyjny <sup>3</sup>H RNA utworzonego po 20 min. znakowania <sup>3</sup>H urydyną skrawków gruczolu mlecznego hodowanych uprzednio przez 20 godz. bez hormonów — B lub w obecności insuliny — A (48 zmodyfikowane).

RNA wirowano przez 14 godz. przy 22 000 obr/min (głowica Spinco nr 25.1.), w izokinetycznym gradiencie (gradient krzywoliniowy zapewniający stałą szybkość sedymentacji) 5–27,9% sacharozy.

jący się w błonie komórkowej układ enzymatyczny (cyklaza adenylowa) pośredniczący w przekazywaniu impulsu hormonalnego do wnętrza komórki. W przeprowadzonych doświadczeniach Turkington stosował insulinę związaną kowalencyjnie z Sepharose 2 B (średnica cząstki ok. 150 μm) co powinno zapobiec ewentualnemu wniknięciu hormonu do komórki. Stwierdził on, że insulina związana i insulina wolna posiadają tę samą



zdolność oddziaływania na syntezę RNA w hodowli komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego (około 200% stymulacji przez obie formy hormonu). Wskazywało to na możliwość wpływu insuliny na syntezę RNA bez wnikania hormonu do wnętrza komórki. Interpretacja tych wyników została jednak zakwestionowana przez Okę i Toppera (57). Badacze ci wykazali, że połączenie insuliny z Sepharose dodane do hodowli tkanki gruczołu mlecznego częściowo ulega rozkładowi i w podłożu hodowlanym znajduje się wolny hormon. Co więcej, uwolniony hormon odznaczał się zwiększoną aktywnością biologiczną (tzw. superinsulina) (58, 59, 60). Na podstawie wyników doświadczeń Okę i Toppera nie można jednak wykluczyć możliwości wpływu insuliny na metabolizm komórki poprzez działanie na układy enzymatyczne w błonie komórkowej. Wydaje się, że przynajmniej jeden z mechanizmów działania insuliny jako regulatora procesu transkrypcji w gruczole mlecznym polega na aktywacji cyklicznej adenylowej (patrz III-4).

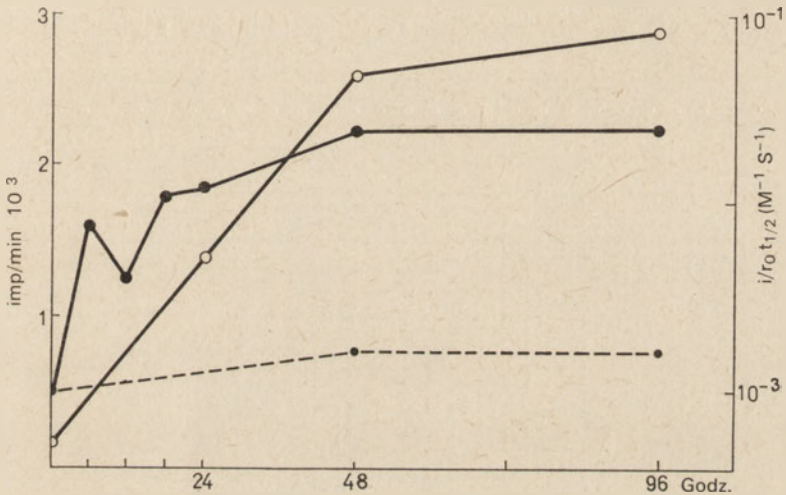
W 1976 r. Goldfine i Smith (61) wykazali, że jądra komórkowe wątroby szczura wiążą [<sup>125</sup>J] insulinę. Ilość związanego znakowanego hormonu obniżona jest przez nanogramowe ilości nieznakowanej insuliny lub proinsuliny natomiast glukagon, hormon wzrostu, prolaktyna i tyreotropina nie wpływa na ilość związanej [<sup>125</sup>J] insuliny. Świadczy to o obecności specyficznego receptora insuliny w jądrze komórkowym. Rola receptora jądrowego jest jeszcze niezbadana, lecz jego istnienie wskazuje na możliwość bezpośredniego działania na procesy zachodzące w jądrze komórkowym.

### III-2. Prolaktyna

W błonie komórek nabłonkowych gruczołu mlecznego znajduje się wspólny receptor prolaktyny i hormonu laktogennego z łożyska (62, 63, 64, 65). Podczas laktogenezy aktywność receptorowa gruczołu mlecznego wobec prolaktyny wzrasta (66, 67) i wzrost ten zależy od poziomu prolaktyny we krwi (68). Wpływ prolaktyny na intensywność syntezy RNA w gruczole mlecznym stwierdzony został w 1965 r. przez Eliasa i wsp. (2), oraz przez innych badaczy (69—73). Prolaktyno-zależny wzrost aktywności syntezy RNA jest niezbędnym warunkiem syntezy białek mleka. Takie samo działanie wykazuje fizjologiczny analog prolaktyny — hormon laktogenny z łożyska (69). W hodowli tkanki gruczołu mlecznego najwyższy wzrost intensywności syntezy RNA pod wpływem prolaktyny obserwuje się w obecności insuliny i glukokortykoidów (49). Odpowiedź gruczołu mlecznego na działanie prolaktyny jest bardzo szybka (48, 74, 75). Stymulację syntezy RNA można obserwować już po 30 min od chwili dodania prolaktyny do hodowli tkanki gruczołu mlecznego myszy (48). Prolaktyna, podobnie jak insulina, stymuluje syntezę wszystkich klas RNA (48, 74).

Specyficznym efektem prolaktyny stwierdzonym po raz pierwszy przez Houdebine i wsp. (76, 77) jest stymulacja syntezy mRNA właściwych dla białek mleka. Autorzy ci zaobserwowali, że podczas hormonalnie wzbudzonej laktogenezy w gruczole mlecznym królika prolaktyna indukuje syntezę mRNA kazein (Ryc. 5). Działanie prolaktyny ulega zahamowaniu gdy zwierzęciu wraz z prolaktyną wstrzyknięty zostanie progesteron. Mechanizm blokowania inkubacji mRNA kazein przez progesteron pozostaje nieznanym.

Dodanie prolaktyny do hodowli tkanki gruczołu mlecznego powoduje wzrost aktywności polimeraz A i B (78). Natomiast *in vivo* wstrzyknięcie prolaktyny zwierzętom z usuniętą przysadką prowadzi do wzrostu aktywności polimerazy A i spadku aktywności polimerazy B (79). W omawianych



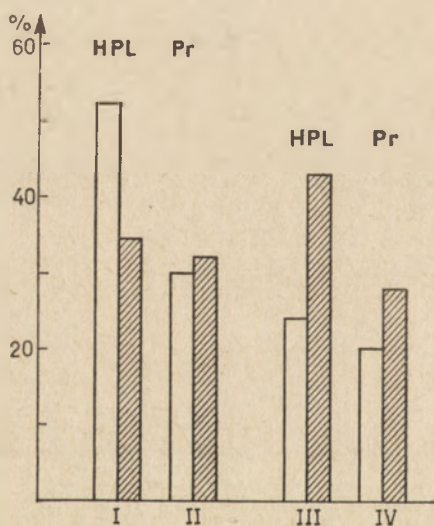
Ryc. 5. Indukcja mRNA kazeiny w gruczole mlecznym królika po wstrzyknięciu prolaktyny (76, 77).

o — synteza kazein w bezkomórkowym układzie z retikulocytów na matrycy mRNA izolowanego z polisomów gruczołu mlecznego; ● — hybrydyzacja RNA z gruczołu mlecznego z kazeinowym komplementarnym DNA, r — stężenie RNA, t — czas hybrydyzacji. — — — wstrzyknięcie prolaktyny i progesteronu.

doświadczeniach aktywność polimeraz oznaczano w izolowanych jądrach komórkowych. Uzyskane wyniki świadczą, że działanie prolaktyny w gruczole mlecznym może uwidaczniać się poprzez zmianę aktywności polimeraz RNA.

Różnorodność efektów wywoływanych przez prolaktynę wskazuje na możliwość co najmniej dwu sposobów działania tego hormonu na układ transkrypcji. Możliwe jest po pierwsze, że prolaktyna oddziałuje na metabolizm komórki bez wnikania do jej wnętrza. Mechanizm ten sugerował Turkington (55) na podstawie wyników uzyskanych w doświad-

czeniuach z prolaktyną związaną z Sepharose. Połączenie prolaktyna-Sepharose wywierało takie samo działanie na komórki nabłonkowe gruczołu mlecznego jak prolaktyna nie związana. Jednak podobnie jak w przypadku insuliny wykazano, że podczas inkubacji związku prolaktyno-Sepharose następuje uwalnianie się prolaktyny (80). Innym możliwym mechanizmem działania prolaktyny jest jej bezpośredni udział w regulacji syntezy RNA w jądrze komórkowym. Wykazano, że prolaktyna stymuluje syntezę RNA w izolowanych jądrach komórkowych gruczołu mlecznego myszy, szczura i królika (24, 81). Podobne działanie wykazuje hormon laktogenny z łożyska (81). Stymulacji ulega zarówno synteza RNA zachodząca przy udziale polimerazy A jak i przy udziale polimerazy B (Ryc. 6). W omawianych doświadczeniach stwierdzono ponadto, że hormon nie wywierał wpływu na intensywność syntezy RNA w jądrach izolowanych z wątroby i nerki, co wskazywało na specyficzność tkankową w jego działaniu. Stężenie prolaktyny (80 nM), przy którym uzyskano największą stymulację syntezy



**Ryc. 6.** Stymulacja syntezy RNA w izolowanych jądrach komórkowych gruczołu mlecznego szczura (I, II) i myszy (III, IV) przez hormon laktogenny z łożyska ludzkiego (HPL) i prolaktynę (Pr) (93).

Syntezę RNA mierzono ilością włączonego  $[^3\text{H}]$  UTP przez komórkowe jądra izolowane z gruczołu mlecznego zwierząt w okresie ciąży (I, III) i laktacji (II, IV). Wyniki podano jako procent przyrostu w odniesieniu do wartości kontrolnej (włączenie  $[^3\text{H}]$  UTP w nieobecności hormonu);

□ — aktywność polimerazy A, ▨ — aktywność polimerazy B.

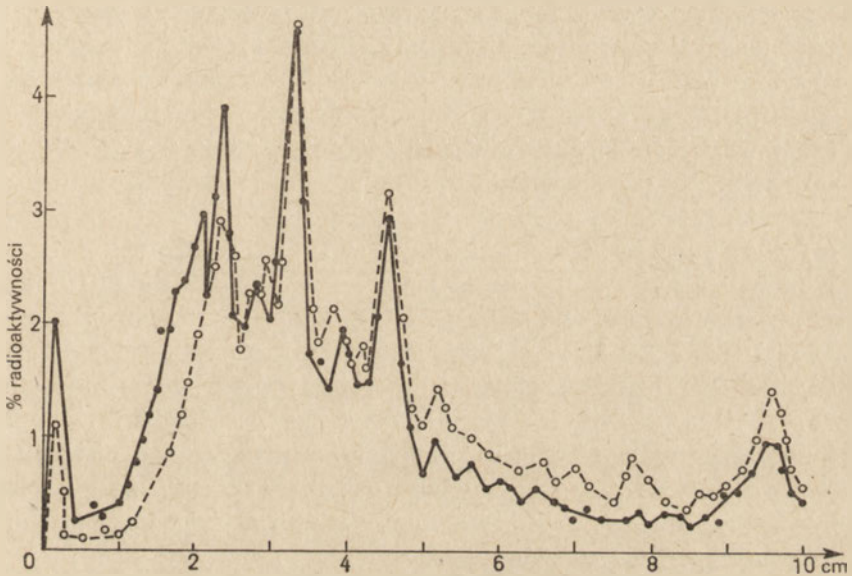
RNA w jądrach gruczołu mlecznego mieściło się w granicach stężeń fizjologicznych i było zbliżone do stężenia indukującego syntezę kazein w hodowli tkanki gruczołu mlecznego (82). Specyficzność tkankowa oraz fizjologiczne stężenie prolaktyny konieczne dla uzyskania masymalnego efektu w warunkach *in vitro* świadczą, że działanie prolaktyny obserwowane w izo-



lowanych jądrach komórkowych może odzwierciedlać proces zachodzący *in vivo*.

### III-3. Glukokortykoidy

Spadek poziomu glukokortykoidów we krwi myszy po usunięciu nadnerczy prowadzi do obniżenia intensywności syntezy RNA w gruczole mlecznym, podczas gdy wstrzyknięcie tym zwierzętom hydrokortyzonu powoduje wzrost intensywności syntezy RNA. Zmiany te są bardzo wyraźne u myszy laktującej, natomiast u myszy w ciąży wahania intensywności syntezy RNA zawierają się w granicach 20%. W badaniach radioautograficznych stwierdzono, że zmiany aktywności syntezy RNA zachodziły głównie w jąderkach (miejsce syntezy rRNA) (85).



Ryc. 7. Rozdział w żelu poliakryloamidowym [ $^3\text{H}$ ] RNA izolowanego z hodowli tkanki gruczołu mlecznego myszy po 2 godz. znakowania [ $^3\text{H}$ ] urydyną w obecności insuliny i prolaktyny (●—●) lub insuliny, prolaktyny i hydrokortyzonu (○—○) (78).

Topper i Oka (83, 84) wykazali, że podczas laktogenezy glukokortykoidy stymulują przyłączanie rybosomów do błony retikulum endoplazmatycznego (tworzenie szorstkiego retikulum endoplazmatycznego).

W hodowlach tkanki gruczołu mlecznego wykazano, że wpływ glukokortykoidów na syntezy RNA zależy od obecności innych hormonów. Podanie samego hydrokortyzonu lub hydrokortyzonu wraz z insuliną prowadziło do niewielkiego spadku aktywności syntezy RNA i obniżenia poziomu RNA w tkance gruczołu mlecznego (49, 50, 74, 86), natomiast dodanie hydrokortyzonu w obecności prolaktyny powodowało stymulację syntezy

oraz wzrost poziomu RNA (50, 87, 88). Stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym stwierdzono, że w obecności insuliny i prolaktyny hydrokortyzon powodował wzrost poziomu heterogennego, wielkocząsteczkowego RNA, m. cz. 5—10 mln., migrującego wolno, a obniżenie poziomu szybciej migrującego RNA zajmującego pozycję na elektroforogramie pomiędzy 18S i 4S RNA (Ryc. 7).

Według obecnych poglądów na mechanizm działania hormonów steroidowych wnikają one do cytoplazmy komórki docelowej łącząc się ze specyficznym receptorem białkowym. Utworzony kompleks wędruje do jądra komórkowego, gdzie po przyłączeniu do miejsc akceptorowych w chromatinie oddziałuje na proces transkrypcji (89, 90, 91, 92). Można sądzić, że działanie glukokortykoidów w gruczole mlecznym przebiega według tego samego mechanizmu. Tucker i wsp. (93) wykazali rzeczywiście obecność w komórkach nabłonkowych gruczołu mlecznego krowy czynnika wiążącego specyficznie glukokortykoidy. Charakterystyka analogicznego czynnika z gruczołu mlecznego myszy (94, 95) i szczura wykazała, że jest to typowe białko receptorowe. Kompleks receptor—glukokortykoid wiązany jest w jądrze komórkowym (97). Stężenie receptora w gruczole mlecznym zmienia się podczas laktogenezy osiągając najwyższą wartość w okresie późnej ciąży (95).

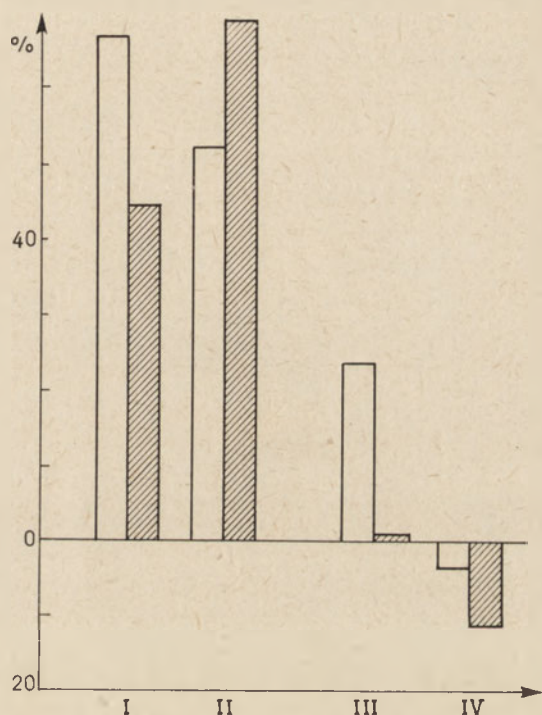
Możliwość udziału kompleksu glukokortykoid receptor w regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym zbadano w układzie *in vitro* stosując izolowane jądra komórkowe oraz deksametazon (syntetyczny glukokortykoid) (98). Utworzony *in vitro* kompleks deksametazon—receptor stymulował syntezę katalizowaną przez polimerazę B (o 40—50%) nie wpływając na syntezę katalizowaną przez polimerazę A. Działanie kompleksu można było obserwować tylko w przypadku użycia jąder o niskiej intensywności syntezy RNA. Przedstawione wyniki wskazują, że glukokortykoidy po związaniu się z receptorem mogą oddziaływać bezpośrednio na proces transkrypcji w gruczole mlecznym.

#### III-4. Cykliczne nukleotydy

Cyklicznym nukleotydom przypisuje się rolę pośredników w oddziaływaniu hormonów na metabolizm komórki (na przykład 99, 100, 101). Podczas laktogenezy cAMP bierze udział w regulacji procesów związanych z funkcją wydzielniczą gruczołu: syntezy kazein, laktozy i kwasów tłuszczowych (102, 103, 104). Poziom cAMP oraz aktywność cyklazy adenylowej w tkance gruczołu mlecznego wzrasta w ciągu laktogenezy osiągając maksimum w ostatnich dniach ciąży (86, 105, 106) lub w pierwszych dniach laktacji (107). W okresie tym równocześnie wzrasta intensywność syntezy RNA w gruczole mlecznym (patrz rozdz. II). Stosując hodowlę tkanki gruczołu mlecznego wykazano stymulację syntezy RNA przez

cAMP (w stężeniu  $5 \mu\text{M}$ ) (108). W hodowli tkanki efekt jego jest krótkotrwały (trwa około 2 godz.) ze względu na rozkład przez komórkowe fosfodwuesterazy. Przedłużenie działania cAMP (do około 24 godz.) można osiągnąć stosując dwubutyrylową pochodną cAMP (DBcAMP) odporną na działanie fosfodwuesteraz (108).

Stymulacja syntezy RNA przez cAMP zachodzi również w bezkomórkowym układzie zawierającym jądra komórkowe gruczołu mlecznego królika (109). Największe efekty działania osiągnięto dodając do układu cAMP w stężeniu  $0,1 \mu\text{M}$ — $1 \mu\text{M}$ . Wzrost syntezy RNA pod wpływem cAMP w izolowanych jądrach komórkowych jest konsekwencją stymulacji reakcji katalizowanych przez polimerazy A i B (Ryc. 8).



**Ryc. 8.** Wpływ stężenia cAMP na aktywność polimerazy A (□) i polimerazy B (▨) w izolowanych jądrach komórkowych gruczołu mlecznego królika (109).

Wyniki podano jako procent przyrostu lub hamowania w odniesieniu do kontroli bez cAMP. Stężenia cAMP: I— $0,1 \mu\text{M}$ , II— $1,0 \mu\text{M}$ , III— $10 \mu\text{M}$ , IV— $20 \mu\text{M}$ .

Użycie większych stężeń cAMP prowadziło do zaniku stymulacji i pojawienia się nieznacznego efektu hamującego syntezę RNA. Podobnie w hodowli tkanki gruczołu mlecznego użycie cAMP w wysokim stężeniu (mM) powodowało hamowanie syntezy RNA (103).

Istnieje szereg danych wskazujących, że działanie cAMP jako czynnika regulującego przebieg transkrypcji polega na aktywacji kinaz białkowych



(E.C. 2. 7. 1. 37) fosforylujących białka chromatynowe. Aktywacja tych enzymów następuje poprzez odszczepienie podjednostki wiążącej cAMP (110, 111). W cytoplazmie i jądrze komórek gruczołu mlecznego stwierdzono stosunkowo dużą zawartość dwu kinaz białkowych oraz kilka innych występujących w ilościach śladowych (112, 113). Jedna z dwu głównych kinaz białkowych aktywowana była przez cAMP. Jej aktywność oraz aktywność białka wiążącego cAMP kilkakrotnie wzrasta podczas laktogenezy. W hodowli tkanki gruczołu mlecznego myszy ciężarnej indukcja aktywowanej przez cAMP kinazy białkowej zachodziła pod wpływem insuliny i prolaktyny. Przy czym oba hormony działały synergicznie indukując kinazę białkową, natomiast indukcja białka wiążącego cAMP znajdowała się pod wyłączną kontrolą prolaktyny (5, 114). Zaktywowana przez cAMP kinaza białkowa modyfikuje następnie białka chromatynowe prowadząc do stymulacji syntezy RNA (115).

Inną drogą oddziaływania cAMP na pracę transkrypcji jest wpływ kompleksu białko receptorowe-cAMP na syntezę RNA, co wykazano w układach bakteryjnych (116). Sugerowano też działanie podobnego mechanizmu u zwierząt (47, 117). Na poparcie tej hipotezy można przytoczyć doświadczenia wykonane przez Andersona i wsp. (25). Autorzy ci przeprowadzili syntezę RNA *in vitro* stosując matrycę DNA z grasicy cielęcej i polimerazy RNA z gruczołu mlecznego szczura. W układzie tym cAMP stymulowała syntezę RNA prowadzoną przez polimerazę A i hamowała syntezę prowadzoną przez polimerazę B. Stosowane w doświadczeniach preparaty polimeraz wykazywały bowiem zdolność wiązania cAMP, natomiast nie wykrywano w nich kinaz białkowych aktywowanych przez cAMP. Świadczy to, że wpływ cAMP na syntezę RNA nie zawsze jest związany z aktywacją kinaz białkowych.

Przedstawione wyniki wskazują na aktywny udział cAMP w regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym. Dotychczasowe wyniki badań nie pozwalają jednakże stwierdzić, który z hormonów indukujących laktację działa za pośrednictwem cykazy adenylowej i cAMP. Niektórzy autorzy donosili o aktywacji przez prolaktynę i insulinę preparatu cykazy adenylowej izolowanej z gruczołu mlecznego (106). Większość autorów stwierdzała jednak, że obecność insuliny, prolaktyny lub hydrokortyzonu w układzie bezkomórkowym nie wpływała na aktywność cykazy adenylowej (86, 112, 118). Hormonalną aktywację cykazy adenylowej udawało się natomiast uzyskać w hodowli tkanki gruczołu mlecznego (86). Do aktywacji potrzeba obecności wszystkich trzech hormonów zespołu laktogenego, tj. insuliny, prolaktyny i hydrokortyzonu (Tabela 3). Wykazując stymulację cykazy adenylowej przez hormony stwierdzono jednocześnie, że nie aktywują one fosfodwuesterazy (E.C. 3. 1. 4. 17) w tkance gruczołu mlecznego. Można zatem sądzić, że w wyniku połączonego działania insuliny, prolaktyny i hydrokortyzonu dochodzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP a w konsekwencji do zmian intensywności transkrypcji. Nie jest

jasne, czy aktywacja cykazy adenylowej ma związek z wpływem hormonów na transkrypcję. Opierając się na danych z doświadczeń wykonanych przy użyciu tkanki tłuszczowej można przypuszczać, że hormonem działającym na etap transkrypcji jest hydrokortyzon. Wpływ glukokortykoidów na tkankę tłuszczową przejawia się m.in. w kontroli aktywacji cykazy adenylowej poprzez stymulację syntezy mRNA receptora adrenokortykotropiny będącego częścią układu cykazy adenylowej (119).

Tabela 3

Aktywacja cykazy adenylowej w hodowli tkanki gruczołu młecznego myszy przez zespół trzech hormonów: insulinę, prolaktynę i hydrokortyzon (86).

Warunki hodowli	Aktywność cykazy adenylowej nmole [ <sup>3</sup> H] cAMP/min	P Procent
Bez hormonów	1,95 ± 0,27	— 100
+ insulina	2,43 ± 0,24	nieistotna —
+ insulina, + prolaktyna	2,50 ± 0,21	nieistotna —
+ insulina, + hydrokortyzon	1,97 ± 0,18	nieistotna —
+ insulina, + prolaktyna, + hydrokortyzon	4,08 ± 0,42	> 0,99 209

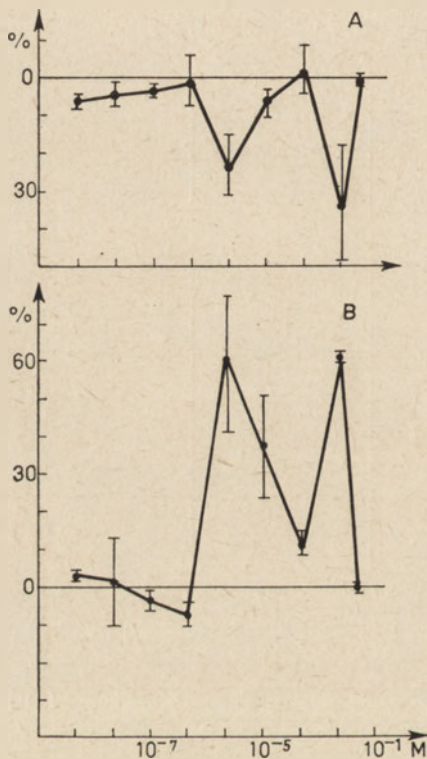
Istotność różnicy wyznaczano testem t Studenta (P)

Działanie cGMP w gruczole młecznym było przedmiotem tylko nielicznych opracowań. Wykazano, że poziom cGMP w gruczole młecznym myszy wzrasta w ciągu laktogenezy, osiągając maksimum w okresie laktacji (107). W układzie bezkomórkowym zawierającym jądra komórkowe lub preparat polimerazy RNA izolowany z gruczołu młecznego cGMP stymuluje aktywność polimerazy B (25, 109). Stwierdzono, że cGMP wywiera podobny do prolaktyny wpływ na syntezę RNA, co mogło sugerować pośredniczenie tego nukleotydu w działaniu prolaktyny (120). Dodanie do hodowli tkanki gruczołu młecznego cGMP zamiast prolaktyny nie było jednak wystarczające do osiągnięcia końcowego efektu działania prolaktyny, a mianowicie indukcji białek mleka (104).

### III-5. Spermidyna

Spermidynie i sperminie występującym w gruczole młecznym (121) przypisuje się między innymi rolę w regulacji syntezy RNA (122). Jak wykazano spermidyna stymuluje rozwój szorstkiego retikulum endoplaz-

matycznego, a wraz z insuliną stymuluje aktywność glukozy-6-fosfodehydrogenazy (E.C. 1. 1. 1. 49), wywołując tym samym efekty przypisywane glukokortykoidom (123, 124, 125). Putrescyna, spermina i jony  $Mg^{2+}$  nie wywołują tych efektów. Oka i Perry przedstawiają rolę spermidyny jako wewnątrzkomórkowego pośrednika akcji glukokortykoidów. Pod kontrolą tych hormonów sterydowych znajduje się dekarboksylaza S-adenozylometioniny (E.C. 4. 1. 1. 50), enzym katalizujący syntezę spermidyny z putrescyny i S-adenozylometioniny.



**Ryc. 9.** Stymulacja aktywności polimerazy B (B) i hamowanie przez spermidynę aktywności polimerazy A (A) w izolowanych jądrach komórkowych gruczołu mlecznego królika w okresie ciąży (129).

Syntezę RNA mierzono ilością włączonego  $[^3H]$  UTP przez jądra. Wyniki podano jako procent przyrostu lub hamowania w odniesieniu do wartości kontrolnej (włączenie  $[^3H]$  UTP w nieobecności spermidyny).

Mechanizm oddziaływania spermidyny na transkrypcję polega na stymulacji lub hamowaniu (zależnie od stężenia) aktywności polimeraz RNA (122, 126). Wpływ spermidyny na aktywność polimeraz RNA w jądrach komórkowych izolowanych z gruczołu mlecznego królika przedstawia Ryc. 9. Jak widać spermidyna w stężeniu  $1,0 \mu M$  i  $1,0 mM$  stymuluje syntezę RNA katalizowaną przez polimerazę B, natomiast hamuje syntezę katalizowaną przez polimerazę A. W świetle przytoczonych faktów można sądzić, że spermidyna pełni rolę związku wzmacniającego oddziaływanie glukokortykoidów na transkrypcję w gruczole mlecznym.

Kontrolowana przez glukokortykoidy ostatnia reakcja szlaku biosyntezy spermidyny może mieć istotne znaczenie w utrzymaniu odpowied-



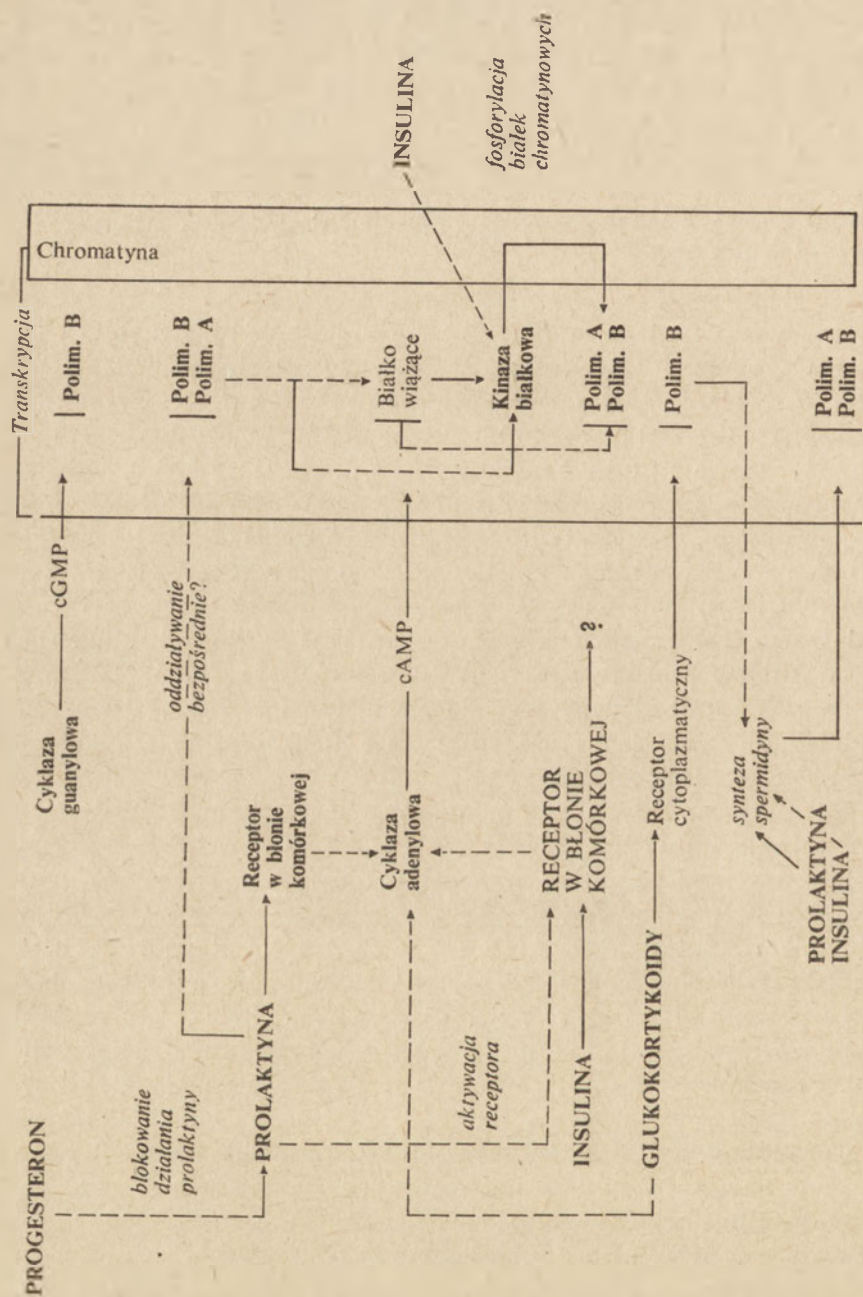
niego stężenia spermidyny podczas laktogenezy. Należy jednak zaznaczyć, że również insulina i prolaktyna mogą regulować syntezę spermidyny. Prolaktyna mianowicie stymuluje aktywność arginazy (E.C. 3. 5. 3. 1.) zwiększa przemianę argininy w ornitynę, a insulina stymuluje aktywność dekarboksylazy ornitynowej (E.C. 4. 1. 1. 17.) zwiększa przemianę ornityny w putrescynę (128, 129).

#### **IV. Schemat regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy**

Przedstawione w niniejszym przeglądzie wyniki prac wskazują na wielostopniowość regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy. W działaniu tym zaangażowane są przynajmniej trzy hormony: prolaktyna (lub zastępczo hormon laktogenowy z łożyska), insulina i hormony sterydowe z grupy glukokortykoidów. Niektóre efekty wymienionych hormonów mogą być realizowane poprzez związki pośredniczące — cAMP i spermidynę. Schematyczny przebieg przekazywania impulsów hormonalnych do układu transkrypcji w gruczole mlecznym przedstawiono na rycinie 10. Centralnym hormonem, posiadającym największe możliwości oddziaływania jest prolaktyna. Bierze ona udział w kontroli kilku elementów na drodze oddziaływania cAMP, aktywuje receptor insuliny, współdziała w kontroli syntezy spermidyny i być może posiada zdolność bezpośredniego oddziaływania na transkrypcję. Rola insuliny w regulacji transkrypcji w gruczole mlecznym jest mniej jasna. Oprócz wpływu na syntezę spermidyny, jedyny zaproponowany mechanizm działania ma związek z udziałem insuliny w aktywacji cyklazy adenyłowej i kinazy białkowej. Pod kontrolą prolaktyny i insuliny znajdują się reakcje katalizowane przez polimerazy A i B.

W odróżnieniu od hormonów białkowych pierwszym etapem oddziaływania glukokortykoidów na transkrypcję w gruczole mlecznym jest interakcja z receptorem cytoplazmatycznym. Utworzony kompleks glukokortykoid-receptor wpływa następnie na transkrypcję prowadzoną przez polimerazę B. Prawdopodobnie na tym etapie realizuje się wpływ glukokortykoidów na syntezę spermidyny. Należy podkreślić, że ich działanie na syntezę spermidyny jest drugim miejscem istotnym dla regulacji transkrypcji, obok aktywacji cyklazy adenyłowej, gdzie zbiegają się wpływy prolaktyny, insuliny i glukokortykoidów.

W omawianym schemacie nie umieszczono polimerazy C z uwagi na zupełny brak danych o możliwości jej udziału w regulacji transkrypcji. Jedynymi wzmiankami w literaturze na temat polimerazy C z gruczołu mlecznego jest jej ilościowo niewielki udział w syntezie RNA (25, 26). Również rola cGMP jako pośrednika działania hormonów oraz mecha-



Ryc. 10. Regulacja przez hormony transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy.  
 Linia przerywana oznaczono brak informacji o działaniu związków pośredniczących w wywołaniu efektu hormonalnego.

nizm działania progesteronu w gruczole mlecznym pozostają niewyjaśnione.

## V. Uwagi końcowe

Prezentowany schemat regulacji transkrypcji obejmuje tylko fragmenty oddziaływania hormonów i innych związków biologicznie czynnych w gruczole mlecznym podczas laktogenezy. Przetawienie komórek nabłonkowych gruczołu ze stanu spoczynkowego w stan aktywności wydzielniczej odbija się na całokształcie przemian metabolicznych komórki i wymaga odpowiednich zmian nie tylko na poziomie transkrypcji lecz również na poziomie translacji i replikacji. Hormonalnie indukowane zmiany syntezy RNA są wstępem do zmian w syntezie DNA i białka, a wzajemne sprzężenia tych procesów warunkują prawidłowy przebieg laktogenezy (130). Stosunkowo dobra znajomość hormonów określających przebieg omawianych przemian, specyficzny, łatwy do uchwycenia produkt końcowy jakimi są białka mleka oraz możliwość odtworzenia laktogenezy w warunkach hodowli tkanki sprawia, że gruczoł mleczny jest jednym z dogodniejszych obiektów do badań nad mechanizmem regulacji metabolizmu w komórce zwierzęcej.

Artykuł otrzymano 1.8.1977; po rewizji autorskiej przyjęto 22.12.1977.

## PIŚMIENNICTWO

1. Elias J. J., (1959), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **101**, 500—502.
2. Jurgens W. G., Stockdale F. E., Topper Y. J., Elias J. J., (1965), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **54**, 629—634.
3. Rivera E. M., Bern H. A., (1966), *Endocrinology*, **82**, 340—353.
4. Stockdale F. E., Topper Y. J., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 1283—1289.
5. Turkington R. W., Riddle M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6040—6046.
6. Marzluff W. F., McCarty K. S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 5635—5642.
7. Barankiewicz J., Jeżewska M., Chomczyński P., (1975), *FEBS Letters*, **60**, 384—387.
8. Banerjee M. R., Rogers F. M., Banerjee D. N., (1971), *J. Endocrinol.*, **50**, 281—291.
9. Sirakow L., Rychlik J., (1968), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **33**, 637—641.
10. Wang D. Y., Greenbaum A. L., (1962), *Biochem. J.*, **83**, 626—632.
11. Thibodeau P. S., Thayer S. A., (1967), *Endocrinology*, **80**, 505—512.
12. Slater T. F., (1961), *Biochem. J.*, **78**, 500—504.
13. Lin D. K., Williams G. H., Fritz P. J., (1975), *Biochem. J.*, **148**, 67—76.
14. Yanai R., Nasagawa H., (1971), *J. Dairy Sci.*, **54**, 906—911.
15. Rivera E. M., Cummins E. P., (1972), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **140**, 502—504.



16. Denamur R., Gaye P., (1967), *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, **56**, 595—615.
17. Kelly F. C., Pace N., (1968), *Amer. J. Physiol.*, **214**, 1168—1173.
18. Paape M. J., Sinha Y. N., (1971), *J. Dairy Sci.*, **54**, 1068—1074.
19. Deutsch A., Norgren A., (1970), *Acta Physiol. Scand.*, **80**, 39—40.
20. Turkington R. W., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 478—483.
21. Campbell P. N., Davey P. J., Ashby P., McIlleavy D., (1973), *Biochem. Soc. Trans.*, **1**, 565—566.
22. Gaye P., Houdebine L. M., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 707—722.
23. Rosen J. M., Woo S. L. C., Comstock J. P., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2895—2903.
24. Chomczyński P., Chomczyńska A., Żarczyńska J., (1974), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, **22**, 11—18.
25. Anderson K. M., Mendelson I. S., Guzik G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 56—66.
26. Chomczyński P., Sokół-Misiak W., Kleczkowska D., (1977), *FEBS Letters*, **76**, 191—194.
27. Kłyszajko-Stefanowicz L., Polanowska Z., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 601—629.
28. LeStrougeon W. M., Totten R., Forer A., (1974) w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron J. W., Jetter J. R. Jr., str. 159—187, Academic Press, New York.
29. Bradbury E. M., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, str. 131—155, Assoc. Sci. Publishers, Amsterdam.
30. Kadohama N., Turkington R. W., (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 1167—1176.
- 30a. Chomczyński P., praca w przygotowaniu.
31. Stellwagen R. H., Cole R. D., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 4456—4462.
32. Chomczyński P., Dragon A., Zwierzchowski L., (1978), *Acta Biochim. Polon.*, w druku.
33. Bonner J., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, str. 315—327, Assoc. Sci. Publishers, Amsterdam.
34. Rakowicz-Szulczyńska E. M., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 189—209.
35. Barker K., L., Ludwick T. M., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 1325—1328.
36. Shuster R. C., Houdebine L. M., Gaye P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 193—199.
37. McKenzie L., Fitzgerald D. K., Ebner K. E., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **230**, 526—530.
38. Owens I. S., Vonderhaar B. K., Topper Y. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 472—477.
39. Vonderhaar B. K., Topper Y. J., (1974), *J. Cell Biol.*, **63**, 707—712.
40. McCarty K. S., McCarty K. S. Jr., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 1022—1032.
41. Zakrzewski K., (1975) w *Biomolekularne podstawy interakcji hormon — komórka*, red. Dawidowicz A., str. 7—24, PZWL, Warszawa.
42. Oka T., Topper Y. J., Perry J., (1974), *J. Cell Biol.*, **62**, 550—556.
43. Oka T., Topper Y. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1693—1696.
44. Friedberg S. H., Oka T., Topper Y. J., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1493—1500.
45. Posner B. I., Kelly P. A., Shiu R. P. C., Friesen H. G., (1974), *Endocrinology*, **95**, 521—531.
46. Topper Y. J., Oka T., (1974) w *Lactation*, red. Larson B. L., Smith V. R., t. 1, str. 327—348, Academic Press, New York.

47. Palmiter R. D., (1969), *Endocrinology*, **85**, 747—751.
48. Turkington R. W., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 6690—6697.
49. Green M. R., Topper Y. J., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **204**, 441—448.
50. El-Darwish I., Rivera E. M., (1971), *J. Exp. Zool.*, **177**, 295—300.
51. Riggs T. R., (1970), w *Biochemical Actions of Hormones*, t. 1, str. 157—208, Academic Press, New York.
52. Wiśniewski K., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 347—357.
53. Rivera E. M., Cummins E. P., (1972), *J. Endocrinol.*, **52**, 205—206.
54. Rillema J. A., (1975), *Amer. J. Physiol.*, **228**, 1531—1534.
55. Turkington R. W., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1362—1367.
56. Cuatrecasas P., Hollenberg M. D., Chang K. J., Bennet V., (1975), *Rec. Progr. Horm. Res.*, **31**, 37—84.
57. Oka T., Topper Y. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1630—1633.
58. Wilchek M., Oka T., Topper Y. J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1055—1058.
59. Oka T., Topper Y. J., (1975), *Science*, **188**, 1317—1319.
60. Topper Y. J., Oka T., Vonderhaar B. K., Wilchek M., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 793—798.
61. Goldfine I. D., Smith G. J., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1428—1431.
62. Kelly P. A., Bradley C., Shiu R. P. C., Meites J., Friesen H. G., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 816—819.
63. Rajaniemi H., Oksanen H., Vanha-Perttula T., (1974), *Hormone Res.*, **5**, 6—20.
64. Shiu R. P. C., Friesen H. G., (1974), *Biochem. J.*, **140**, 301—311.
65. Posner B., (1975), *Can J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 689—703.
66. Holcomb H. H., Costlow M. E., Buschow R. A., McGuire W. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 104—112.
67. Smith R. D., Hilf R., Senior H. E., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 3726—3731.
68. Costlow M. E., Buschow R. A., McGuire W. L. (1975), *Life Sci.*, **17**, 1457—1466.
69. Anderson R. R., (1974), w *Lactation*, red. Larson B. L., Smith V. R., t. 1, str. 97—142, Academic Press, New York.
70. Lockwood D. H., Turkington R. W., Topper Y. J., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 493—501.
71. Turkington R. W., (1968), *Endocrinology*, **82**, 575—583.
72. Mayne R., Forsyth I. A., Barry J., (1968), *J. Endocrinol.*, **41**, 247—253.
73. Baldwin R. L., Martin R. J., (1968), *Endocrinology*, **82**, 1209—1216.
74. Green M. R., Bunting S. L., Peacock A. C., (1971), *Biochemistry*, **10**, 2366—2371.
75. Rillema J. A., (1973), *Endocrinology*, **92**, 1673—1679.
76. Houdebine L. M., Gaye P., (1975), *Molec. Cell. Endocrinol.*, **3**, 37—55.
77. Houdebine L. M., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **68**, 219—225.
78. Turkington R. W., Ward V. T., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **174**, 291—301.
79. Baldwin R. L., Kosrud G. O., Martin R. J., Chang W., Schober N. A., (1969), *Biol. Reprod.*, **1**, 31—39.
80. Vonderhaar B. K., Topper Y. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1323—1330.
81. Chomczyński P., Topper Y. J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 56—63.
82. Stockdale F. E., Jurgens W. G., Topper Y. J., (1966), *Develop. Biol.*, **13**, 266—281.

83. Oka T., Topper Y. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7701—7707.
84. Oka T., Topper Y. J., (1972), *J. Nat. Cancer Inst.*, **48**, 1225—1230.
85. Banerjee M. R., Banerjee D. N., (1971), *Exp. Cell Res.*, **64**, 307—316.
86. Chomczyński P., Zwierzchowski L., (1977), *Acta Biochim. Polon.*,  
wyslane do druku.
87. Mechta R. G., Banerjee M. R., (1975), *Acta Endocr.*, **80**, 501—516.
88. Banerjee M. R., Wood B. G., Washburn L. L., (1974), *J. Nat. Cancer Inst.*, **53**, 1387—1393.
89. Jensen E. V., Numata M., Brecher P. I., DeSombre E. R., (1971),  
w *Biochemistry of Steroid Hormone Action*, red. Smellie M. S., str. 133—159,  
Academic Press, London.
90. Kahl A., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 171—193.
91. O'Malley B. W., Means A. R., (1974), *Science*, **183**, 610—620.
92. Buller R. E., Schwartz R. J., Schrader W. T., O'Malley B. W.,  
(1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5178—5186.
93. Tucker H. A., Larson B. L., Gorski J., (1971), *Endocrinology*, **89**, 152—  
160.
94. Shyamala G., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3085—3090.
95. Chomczyński P., Zwierzchowski L., (1976), *Biochem. J.*, **158**, 481—  
483.
96. Gardner D. G., Wittliff J. L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 617—  
627.
97. Shyamala G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 437—444.
98. Sokół-Misiak W., Chomczyński P., dane niepublikowane
99. Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W., (1971), w *Cyclic AMP*,  
str. 17—47, Academic Press, New York.
100. Posternak T., (1974), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **14**, 23—33.
101. Grzelakowska-Sztabert B., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 423—425.
102. Sapag-Hagar M., Greenbaum A. J., Lewis D. J., Halowes R. C.,  
(1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 261—268.
103. Lazzi R. F., de Pont J. J. H. H. M., Bonting S. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **392**, 20—25.
104. Rillema J. A., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **432**, 348—352.
105. Sapag-Hagar M., Greenbaum A. L., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 982—987.
106. Louis S. L., Baldwin R. L., (1975), *J. Dairy Sci.*, **58**, 861—869.
107. Rillema J. A., (1976), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **151**, 748—751.
108. Zwierzchowski L., (1974), Praca doktorska, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN.
109. Kleczkowska D., Chomczyński P., (1967), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci., Biol.*, **24**, 189—193.
110. Rubin C. S., Rosen O. M., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 831—887.
111. Kwast-Welfeld J., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 383—405.
112. Majumder G. C., Turkington R. W., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5545—  
5554.
113. Desjardins P. R., Mendelson J. M., Anderson K. M., (1975), *Can. J. Biochem.*, **53**, 591—598.
114. Majumder G. C., Turkington R. W., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7207—  
7217.
115. Turkington R. W., Majumder G. C., Kadohama N., MacIndoe J. H., Frantz W. L., (1973), *Rec. Progr. Horm. Res.*, **29**, 417—456.
116. Nissley S. P., Anderson W. B., Gottesman M., Perlman R. L., Pastan I., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4671—4678.



117. Allfrey V. G., Inone A., Karn J., Johnson E. M., Good R. A., Hadden J. W., (1975), w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Found. Symp. 28, str. 153—181, Assoc. Sci. Publishers, Amsterdam.
118. Sapag-Hagar M., Greenbaum A. L. (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 303—312.
119. Braun T., Hechter O., (1960), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 995—1001.
120. Rillema J. A., (1975), *Horm. Metab. Res.*, **7**, 45—49.
121. Russel D. H., McVicker T. A. (1972), *Biochem. J.*, **130**, 71—76.
122. Bachrach U., (1973), w *Function of Naturally Occuring Polyamines*, str. 5—20, 90, Academic Press, New York.
123. Oka T., (1974), *Science*, **184**, 78—80.
124. Oka T., Perry J. W. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3586—3591.
125. Oka T., Perry J. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7647—7652.
126. Moruzzi G., Barbiroli B., Moruzzi M. S., Tadolini B., (1975), *Biochem. J.*, **146**, 697—703.
127. Kleczkowska D., Chomczyński P. (1977), *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, w druku.
128. Oka T., Perry J. W., (1974), *Nature*, **250**, 660—661.
129. Aisbitt R. P. G., Barry J. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 610—616.
130. Larson B. L., Smith V. R., (red.), (1974) *Lactation*, t. 1, Academic Press, New York.

## KOMUNIKAT

### **Uchwały Komisji Słownictwa Biochemicznego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego podjęte na posiedzeniu w dniu 3.IV.1978 r.**

1. Oprócz nazwy „białko” dopuszcza się stosowanie nazwy „proteina” jako synonimu. Zaleca się zaniechanie nazwy „proteid” i formy — proteid jako drugiego członu w nazwach białek złożonych. Zamiast tego zaleca się stosowanie członu — proteina, a więc: hemoproteina, nukleoproteina itd., zamiast hemoproteid, nukleoproteid. Stosowanie tej formy należy ograniczać do tych przypadków, gdy pierwszy człon nazwy ma również formę łacińską lub grecką. W pozostałych przypadkach należy używać polskiej formy białko (na przykład białka żelazowe, a nie żelazoproteiny).

Komisja uzasadnia swą decyzję tym, że forma — proteid jest pozostałością dawnej klasyfikacji białek na proteiny i proteidy, przy czym to ostatnie pojęcie oznaczało białka złożone. Wydaje się, że obecnie nie zachodzi potrzeba wyodrębniania takiej klasy białek jako całości, gdyż bardzo duża liczba typowych białek zawiera składniki nieaminokwasowe. Zarówno anglosaskie jak i niemieckie piśmiennictwo zarzuciło formę — proteid, stosując tylko formę — protein.

2. Na określenie enzymów zawierających metale można używać nazw: metalo-enzymy, cynko-enzymy, molibdeno-enzymy itp. Wartościowość metalu określa się cyframi rzymskimi w nawiasie, na przykład żelazo (II)-enzymy.

3. Nie należy dążyć do dosłownego tłumaczenia określenia „particulate enzyme”. W języku polskim określenia „cząsteczka” i „cząstka” nie są jednoznaczne, stąd też pochodzące od nich przymiotniki, mające określić nazwę „particulate” są nieprecyzyjne i mylące.

4. Określenie „liczba obrotów” jest coraz rzadziej używane. Aktywność enzymu, wyrażona na jednostkę masy nosi nazwę aktywności a wyrażona na 1 mol — aktywności molarnej.

5. Przy wprowadzaniu skrótów, wyprowadzonych z nazw angielskich zgodnie z zaleceniami Komisji Nomenklatury IUPAC-IUB, zaleca się obok podania pełnej nazwy w języku polskim, także informacji (w nawiasie) o pełnym brzmieniu angielskim danego terminu.

6. Na określenie masy cząsteczki używa się albo pojęcia „masa cząsteczkowa”, albo „ciężar cząsteczkowy”.

Masę cząsteczkową wyraża się w atomowych jednostkach masy (daltonach). Atomowa jednostka masy ( $1,66043 \pm 0,00007 \times 10^{-27}$  kg) równa się 1/12 części masy węgla [ $^{12}\text{C}$ ].

Ciężar cząsteczkowy jest to stosunek ciężaru cząsteczki do ciężaru 1/12 atomu [ $^{12}\text{C}$ ], a więc jest wielkością bezwymiarową.

ANNA KROP-WĄTOREK \*)

## Budowa i właściwości biologiczne lektyn

### Structure and Biological Properties of Lectins

#### *Spis treści*

- I. Występowanie lektyn
- II. Budowa lektyn
- III. Aktywność biologiczna lektyn
  - III-1. Aglutynacja prawidłowych i nowotworowych komórek zwierzęcych a rozmieszczenie receptorów lektynowych
  - III-2. Aglutynacja erytrocytów pod wpływem lektyn
  - III-3. Właściwości mitogenne lektyn
- IV. Rola lektyn w roślinach

#### *Contents*

- I. Distribution of lectins in plants
- II. Structure of lectins
- III. Biological properties of lectins
  - III-1. Agglutination of normal and neoplastic animal cells in relation to distribution of lectin receptors
  - III-2. Lectin induced agglutination of erythrocytes
  - III-3. Mitogenic properties of lectins
- IV. Biological role of lectins in plants

Niektóre białka cechuje zdolność swoistego wiązania cukrów lub substancji zawierających cukry. Białka o tej właściwości otrzymane z bakterii (1), bezkręgowców (2), ryb (3) i ssaków (4, 5) nazywano aglutyninami, wydzielone zaś z tkanek roślinnych — fitoaglutyninami, fitohemaglutyny-

---

\*) Dr, Zakład Biochemii, Instytut Chemii Organicznej i Fizycznej, Politechnika Wroclawska, Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław.

Wykaz stosowanych skrótów: Con A — konkanawalina A; WGA — lektyna z kiełków pszenicy; SBA — lektyna soi; PHA — lektyna fasoli; CBA — lektyna rącznika; STA — lektyna ziemniaka; Glc — glukoza; Man — mannoza; Fuk — fukoza; Ksy — ksyloza; Ara — arabinoza; Gal — galaktoza; GlcN — glukozamina; GlcNAc — N-acetyloglukozamina; SDS — siarczan dodecyłu (sól sodowa).



ninami lub lektynami (6, 7). Wprowadzenie terminu „lektyny”, służyć miało określeniu tylko tych białek roślinnych, które aglutynują swoiście erythrocyty określonych grup i podgrup krwi ludzkiej (6). Z biegiem czasu jednak, lektynami zaczęto nazywać wszystkie białka roślinne wykazujące aktywność aglutynującą i mitogenną.

## I. Występowanie lektyn

Obecność lektyn stwierdzono w glonach (8), porostach (8), grzybach (8, 9, 10) i roślinach nasiennych (8, 11—40). W poszukiwaniu lektyn swoistych wobec erythrocytów krwi ludzkiej przebadano spośród roślin niższych 24

Tabela 1

Występowanie lektyn.

Rodziny i gatunki roślin	Nazwa angielska lektyny i skrót stosowany w piśmiennictwie	Piśmiennictwo
<i>Papilionaceae</i>		
<i>Canavalia ensiformis</i>	Concanavalina A—Con A (jack bean agglutinin)	11, 12, 13, 14
<i>Glycine maxima</i>	SBA (soy bean agglutinin)	12, 13, 15—17
<i>Phaseolus limensis</i>	PHA (lima bean agglutinin)	12, 13
<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA (black kidney bean agglutinin) (red kidney bean agglutinin) (yellow kidney bean agglutinin)	12, 13, 18, 19 12, 13, 20 12, 13, 21, 22
<i>Pisum sativum</i>		13, 23—25
<i>Lens culinaris</i>		12, 13, 26
<i>Robinia pseudoaccacia</i>		13, 27, 28
<i>Ulex europeus</i>		29
<i>Lotus tetragonolobus</i>		13, 30, 31
<i>Sophora japonica</i>		32
<i>Crotolaria juncea</i>		33
<i>Euforbiaceae</i>		
<i>Ricinus communis</i>	CBA (castor bean agglutinin)	12, 13
<i>Solanaceae</i>		
<i>Solanum tuberosum</i>	STA (solanum tuberosum agglutinin)	34, 35, 36, 37
<i>Gramineae</i>		
<i>Triticum vulgare</i>	WGA (wheat germ agglutinin)	12, 13, 38, 39
<i>Oryza sativa</i>		40
<i>Agaricaceae</i>		
<i>Agaricus campestris</i>		9, 10

gatunki glonów (8), 100 gatunków porostów (8) i około 870 gatunków grzybów (8, 9, 10). Lektyny jednak roślin niższych w większości przypadków okazały się nieswoiste wobec erythrocytów krwi ludzkiej. Obecność lektyn wykazano w glonach następujących gatunków: *Lynbia majuscula* (sinice),

*Codium isthmocladum* (zielenice), *Dictyota bartayresii*, *D. Divaricata*, *D. cervicornis*, *D. deliculata*, *Padina vickersiae*, *Sargassum natans*, *S. viridulum*, *Turbinaria turbinata* (brunatnice), *Spyridia filamentosa* (krasnorosty) (8); w porostach: *Parmelia stenophylla*, *Cetraria juniperina*, *Cladonia rangiferina*, *C. furcata* i *Ramalina complanata* (8). Lektyny znaleziono też w grzybach 232 gatunków, lecz tylko nieliczne z nich zawierały lektyny o aktywności swoistej wobec erytrocytów krwi ludzkiej. Do gatunków takich należały: *Amanita solitaria*, *A. muscaria*, *Hygrophorus hypotejus*, *Psilocybe spodicea*, *Clitocybe nebularis*, *Fomes fomentarius* (8). Powszechnie występujące grzyby jak: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, nie zawierają lektyń (8). W roślinach nasiennych z przebadanych 2663 gatunków, tylko w roślinach 800 gatunków występowały lektyny, przy czym aż 600 z tych gatunków zaliczamy do rodziny motylkowatych (7, 8, 11—42). W roślinach jednoliściennych, lektyny wykazano w *Triticum vulgare* (12, 13, 38, 39) i *Oryza sativa* (40). W Tabeli 1 zestawiono gatunki roślin, z których wyizolowano najdokładniej poznane obecnie lektyny. Z roślin nasiennych lektyny wyodrębnia się głównie z nasion i organów zapasowych. W liściach bowiem, łodydze, korze, czy korzeniach zawartość lektyń jest zbyt niska (7, 12, 13).

## II. Budowa lektyń

Lektyny, poza nielicznymi wyjątkami, są glikoproteidami. Komponenta cukrowa stanowi od 5 do 50% masy cząsteczki. Cukrami najczęściej występującymi w lektynach są: mannoza, galaktoza, arabinoza, ksyloza i N-acetyloglukozamina (Tabela 2). Konkanawalina A (43), lektyny z *Triticum vulgare* (44—46) i z *Pisum sativum* (12) nie zawierają cukru.

Analiza składu aminokwasowego lektyń z *Triticum vulgare* i *Solanum tuberosum* wykazała (47) wysoką, w porównaniu z innymi lektykami, zawartość aminokwasów siarkowych. W lektyynie z *Triticum vulgare* (38, 45) cysteina stanowi 18—20%, a w lektyynie z *Solanum tuberosum* (34) 11,5% składu aminokwasowego.

Masy cząsteczkowe lektyń, składniki cukrowe oraz liczby podjednostek zestawiono w Tabeli 2.

Lektyny występujące pod postacią różnych form molekularnych nazywano izolektykami (12). Obecność izolektyń stwierdzono w nasionach *Phaseolus vulgaris* (53, 56), *Lens culinaris* (55), *Lotus tetragonolobus* (31), *Pisum sativum* (57) i *Triticum vulgare* (45).

Najdokładniej poznaną lektyką jest konkanawalina A (14, 58—60). Cząsteczka konkanawaliny A zbudowana jest z czterech jednakowych podjednostek, zwanych protomerami. Protomer ma kształt elipsoidy z jedną charakterystyczną wnęką. Wymiary protomeru wynoszą  $42 \times 40 \times 39 \text{ \AA}$ , zaś

jego masa cząsteczkowa — 25 000 (14, 49). W zależności od pH środowiska protomery tworzą di-, tri- lub tetramerowe układy asocjująco-dysocjujące (14, 61, 62). W środowisku o pH poniżej 6 konkanawalina A występuje w formie dimeru, powyżej pH 7 głównie w formie tetramery (63). Łańcuch

Tabela 2

Właściwości fizyko-chemiczne lektyn (13).

Gatunki roślin	Masa cząsteczkowa	Liczba podjednostek	Komponenta cukrowa	
			zawartość procentowa	skład chemiczny
<i>Canavalia ensiformis</i> <sup>+</sup>	100.000	4	0	
<i>Glycine maxima</i>	120.000	4	5	D-GlcNAc, D-Man
<i>Lens culinaris</i> <sup>+</sup>	I 42.000	2	2	GlcN, Glc
	II 69.000			
<i>Lotus tetragonolobus</i>	I 120.000		9,4	GlcN
	II 58.000		4,8	GlcN
	III 117.000		9,2	GlcN
<i>Phaseolus limensis</i>	269.000	8	4	GlcN, Man, Fuk
<i>Phaseolus vulgaris</i>				
( <i>black kidney bean</i> )	128.000		5,7	Man, Ksy
( <i>wax kidney bean</i> )	132.000		10,4	Man, Glc
( <i>red kidney bean</i> )				
	I 138.000	8	8,9	Man, GlcN
	II 98.000	4	4,1	Man, GlcN
<i>Pisum sativum</i> <sup>+</sup>	53.000	4	/0,3	Glc/?
<i>Robinia pseudoaccacia</i>	90.000		10,7	Man, Fuk, Ksy
<i>Ulex europeus</i>	I 170.000		5,2	GlcN, Man
	II		21,7	GlcN, Ara, Gal
<i>Ricinus communis</i> <sup>+</sup>	120.000	4	4	
<i>Triticum vulgare</i> <sup>+</sup>	26.000		/4,5	Glc, Ksy/?
<i>Oryza sativa</i>	10.400			Glc
<i>Agaricus campestris</i>	64.000	4	4	
<i>Solanum tuberosum</i>				
w/g 13,36	20.000		5,2	Ara
w/g 37	20.000		16,7	Ara
w/g 34	100.000		51	Ara, Gal, Glc, GlcNAc

<sup>+</sup> otrzymana w formie krystalicznej

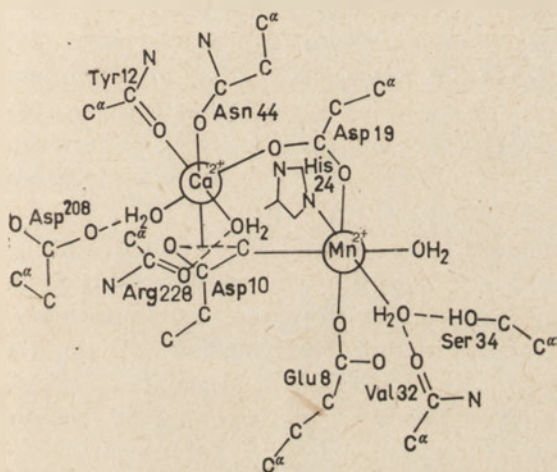
cyfry rzymskie, odnoszą się do różnych form molekularnych otrzymywanych z tego samego gatunku roślin

polipeptydowy protomeru, zbudowany jest z 237 reszt aminokwasowych o znanej sekwencji (49, 58, 59, 64, 65). Aminokwasem N-końcowym konkanawaliny A jest alanina, C-końcowym — asparagina (14, 58—60). W pobliżu N-końca łańcucha polipeptydowego znajdują się reszty aminokwasów kwaśnych, uczestniczące w wiązaniu metali w cząsteczce konkanawaliny A; w pobliżu C-końca skupione są reszty aminokwasów hydrofobowych, tworzące rdzeń protomeru (14, 58—60).

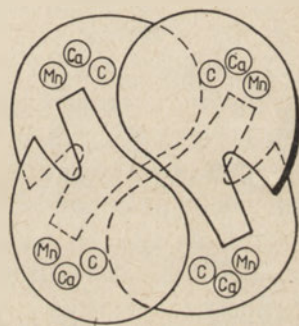


Budowę drugorzędową protomeru konkanawaliny A charakteryzują dwa duże obszary  $\beta$ -struktury (14, 58—60). Jeden obszar, tworzący wnękę protomeru, zawiera 58 reszt aminokwasowych, uszeregowanych w sześciu antyrównoległych łańcuchach oraz dziewięć reszt aminokwasowych w krótkich pętach. Drugi obszar  $\beta$ -struktury tworzy siedem antyrównoległych łańcuchów polipeptydowych zbudowanych z 57 reszt aminokwasowych. Reszty aminokwasowe od 80 do 85 stanowią jedyny fragment  $\alpha$ -spiral w protomerze konkanawaliny A (14, 66).

Każdy protomer konkanawaliny A zawiera atom manganu, atom wapnia i jedno miejsce wiążące cukier (67—69). Odległość pomiędzy atomami metali wynosi 5,4 Å, a każdy z nich związany jest z czterema resztami aminokwasowymi łańcucha polipeptydowego lektyny i dwiema cząsteczkami wody, co w rezultacie tworzy oktaedryczny układ metal—ligandy (14) (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat koordynacyjnego wiązania jonów metali w protomerze konkanawaliny A (14).



Ryc. 2. Konkanawalina A.

Początkowo przypuszczano, że miejsca wiążące cukier w cząsteczce konkanawaliny A znajdują się we wnękach protomerów w odległości 30 Å od miejsc wiążących metale (70—74). Pomiary jądrowego rezonansu magnetycznego (75—77) i analiza krystalograficzna wykazały jednak, że miejsca te znajdują się poza wnękami protomerów w odległości 10—13 Å od miejsc wiążących metale (49, 78) (Ryc. 2).

W lektynach często występującymi metalami są mangan i wapń (14, 49, 52, 67, 79, 80), rzadziej spotyka się cynk, miedź i magnez (40). Rola metali w aktywności biologicznej lektyn jest nadal niejasna. Przypuszcza się, że uczestniczą one w procesie swoistego wiązania cukrów przez cząsteczki lektyn (67, 68). Wykazano bowiem, że lektyny pozbawione metali tracą równocześnie właściwość wiązania cukrów (62, 70, 78, 80—82).

### III. Aktywność biologiczna lektyn

#### III-1. Aglutynacja prawidłowych i nowotworowych komórek zwierzęcych o rozmieszczenie receptorów lektynowych

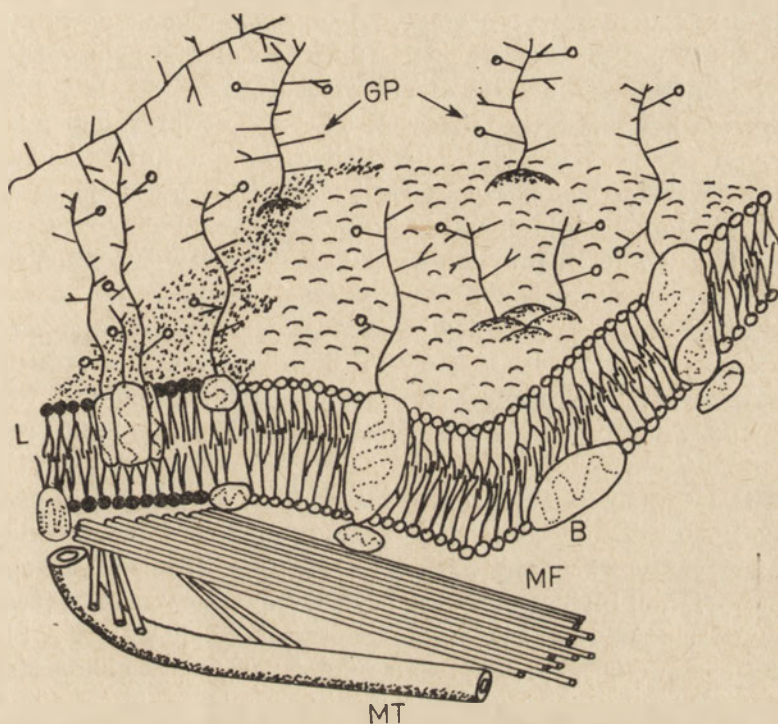
Lektyny wiążą się swoiście z cukrami błon komórek zwierzęcych, wywołując różnorodne odpowiedzi w zależności od typu komórki i rodzaju lektyny. Lektyna z *Vicia graminea* aglutynuje swoiście erythrocyty grupy N, a lektyna z *Ulex europeus* — erythrocyty grupy A<sub>2</sub> (8). W przeciwieństwie do lektyn izolowanych z roślin motylkowatych, lektyny z *Agaricus campestris*, *Triticum vulgare* i *Ricinus communis* pozbawione są właściwości mitogennych (13, 83). Lektyna z *Agaricus campestris* wyróżnia się tym spośród innych, że uwalnia insulinę z komórek trzustki (84). Oprócz erythrocytów, lektyny aglutynują także komórki embrionalne, płytki krwi i komórki stransformowane. W pewnych przypadkach obserwowano hamowanie wzrostu tkanek nowotworowych pod wpływem lektyn (53, 85—90). Lektyny wiążą się również z błonami wewnątrzkomórkowymi (12, 13). Konkanawalina A, lektyny z *Triticum vulgare* i *Ricinus communis* w stężeniu 1 µg/ml aglutynują jądra komórkowe wątroby szczura, a w stężeniu 40 µg/ml — mitochondria. Na powierzchni 1 µm<sup>2</sup> jądra komórkowego wątroby szczura wiązać się może 3,8 × 10<sup>4</sup> cząsteczek konkanawaliny A lub 8,6 × 10<sup>5</sup> cząsteczek lektyny *Ricinus communis* (91).

Według obecnie przyjętego modelu błon komórkowych (modelu płynnej mozaiki, Ryc. 3) błony komórkowe buduje dwuwarstwowa lipidowa matriks, w płaszczyźnie której przemieszczają się białka i glikoproteidy. Możliwość przemieszczania się białek i glikoproteidów zależy od stopnia powiązania tych składników z wewnątrzkomórkowymi elementami szkieletowymi — mikrofilamentami i mikrotubulami, jak również od składu chemicznego i struktury warstwy lipidowej (92—97). Receptorami komórkowymi lektyn są cukry glikoproteidów, znajdujących się po zewnętrznej, hydrofilowej stronie błony komórkowej (92). Rozmieszczenie receptorów lektynowych na powierzchni błon zależy od mikrofilamentów i mikrotubul (83, 92, 93, 98, 103—106). Cytochalazyna B, kolchicyna i winblastyna, obniżają podatność komórek na aglutynację, ponieważ zaburzają wewnątrzkomórkowy system elementów szkieletowych (107—109).

Aby prawidłowe komórki zwierzęce mogły ulec aglutynacji potrzeba znacznie wyższych stężeń lektyny niż w przypadku ich stransformowanych odpowiedników (93, 110—116). Lektyna z *Ricinus communis* w stężeniu 1 µg/ml aglutynuje mysie fibroblasty 3T3 i komórki BHK chomika, podczas gdy te same komórki po transformacji nowotworowej aglutynują przy niższym o rząd stężeniu lektyny (117). Odmienny stopień aglutynacji komórek nowotworowych, nie wynika ze wzrostu liczby receptorów lecz z odmiennego ich rozmieszczenia na powierzchni błon komórek prawidłowo-



wych i nowotworowych (86, 118—126). Receptory prawidłowych fibroblastów mysich 3T3 po związaniu z konkanawaliną A pozostają równomiernie rozmieszczone na powierzchni błon. Receptory fibroblastów stransformowanych w początkowej fazie działania lektyny tworzą drobne skupiska tzw. „clusters”, przechodzące w większe „patches” a w końcu w biegunowe zagęszczenia „cups” (92, 93, 127—130). Zjawisko przemieszczania



**Ryc. 3.** Model mozaikowej struktury błon komórkowych (92).

GP — glikoproteidy; B — białka; L — lipidy; MT — mikrotubule; MF — mikrofilamenty.

się receptorów w błonach komórek stransformowanych opisano również w fibroblastach chomika (131, 132), myszy (122, 113, 130, 133), szczura (134) i kurczęcia (135). Wzmoczoną ruchliwość receptorów lektynowych większość autorów tłumaczy zwiększoną płynnością błon komórek stransformowanych (93, 112—116, 124, 136—144), nie we wszystkich jednak przypadkach obserwowano wzrost płynności błon po transformacji nowotworowej. W prawidłowych i stransformowanych wirusami fibroblastach mysich 3T3 nie wykazano różnic w płynności błon (145—147). W przypadku fibroblastów kurczęcia obserwowano nawet obniżenie płynności błon komórek stransformowanych wirusowo w porównaniu z płynnością błon komórek macierzystych (148).

Zwiększona ruchliwość receptorów lektynowych jest tylko jednym



z objawów towarzyszących łatwiejszej aglutynacji komórek nowotworowych. Na stopień aglutynacji ma również istotny wpływ ilość nukleotydów cyklicznych w komórkach aglutynowanych (95, 149—151).

Istotnym warunkiem wywoływania aglutynacji komórek zwierzęcych jest wielwartościowość lektyn, wynikająca z ich podjednostkowej budowy. Dysocjacja natywnej, czteropodjednostkowej cząsteczki konkanawaliny A zachodzi w niskich temperaturach albo w wyniku modyfikacji bezwodnikiem kwasu bursztynowego. Zdysocjowana konkanawalina A nie aglutynuje komórek nowotworowych, 10-krotnie słabiej aglutynuje limfocyty myszy, a 500-krotnie słabiej erythrocyty owcy (120, 149, 152—156). Polimeryzacja kompletnych cząsteczek lektyn z utworzeniem wielkocząsteczkowych kompleksów zwiększa właściwości aglutynujące lektyn (157).

Ostatnio wiele uwagi poświęca się izolacji i oczyszczaniu receptorów lektynowych. Porównanie struktury oczyszczonych receptorów wyizolowanych z błon komórek prawidłowych i nowotworowych umożliwia śledzenie zmian zachodzących w błonach w czasie transformacji nowotworowej. Metodą chromatografii powinowactwa wydzielono receptory konkanawaliny A z błon limfocytów T królika (158), nowotworowych limfocytów myszy (159), erythrocytów szczura (160). Za pomocą tej samej techniki wyizolowano również z komórek białaczki mysiej L1210 receptory lektyny z *Triticum vulgare* (161, 162). Receptory lektynowe erythrocytów ludzkich izolowano przez ekstrakcję białek błon do buforów o niskiej sile jonowej, a następnie rozdzielano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS (96, 163, 164). Okazało się, że wśród uzyskanych frakcji białkowych błon erythrocytów, komponenta [zwana też komponentą III (165, 166)] zawierała receptory konkanawaliny A i lektyny z *Ricinus communis*, a główny sjałoglikoproteid, tzw. glikoproteid MN (167—170) zawierał receptory lektyn *Triticum vulgare*, *Phaseolus vulgare* i *Lens culinaris*. Wszystkie wyizolowane dotychczas receptory lektynowe są glikoproteidami.

### III-2. Aglutynacja erythrocytów pod wpływem lektyn

Agulutynację erythrocytów ludzkich i zwierzęcych wywołaną lektynami zaobserwowano już w roku 1888. Późniejsze badania wykazały odmienną swoistość lektyn wobec erythrocytów różnych gatunków zwierząt. Na przykład lektyna ziemniaka aglutynuje erythrocyty szczura 2000 razy silniej niż erythrocyty konia (36). Wykryto także lektyny o wysokiej swoistości wobec głównych substancji grupowych i podgrupowych erythrocytów ludzkich (100—102, 171) (Tabela 3). Warto wspomnieć, że lektyny z roślin różnych gatunków tego samego rodzaju może cechować odmienna swoistość wobec erythrocytów: lektyna z nasion *Vicia craca* jest swoista wobec determinanty krwinek grupy A, lektyna z *Vicia graminea* aglutynuje tylko

Tabela 3

Swoistość lektyn wobec erytrocytów niektórych grup krwi  
(8, 12, 13, 172, 173).

Gatunek roślin	Grupa krwi
<i>Lathyrus silvestris</i> <i>Crotalaria aegyptica</i> , <i>C. mucronata</i> <i>Phaseolus limensis</i> , <i>Ph. calcaratus</i> <i>Vicia cracca</i> , <i>V. villosa</i> , <i>V. dumetorum</i> , <i>V. hirsuta</i> , <i>V. peregrina</i> <i>Bauchinia purpurea</i> <i>Hibiscus aesculentus</i> <i>Urena lobata</i> <i>Amphicarpaea bracteata</i> <i>Astragalus onobrychis</i> <i>Caragana brevispina</i> , <i>C. decorticans</i> <i>Pueraria lobata</i> <i>Trapeolum majus</i> <i>Evonymus alatus</i> , <i>E. atropurpureus</i> <i>Tecoma stans</i> <i>Hyptis suaveolens</i> <i>Musa textilis</i> <i>Amorphophallus variabilis</i>	A
<i>Dolichos biflorus</i>	A <sub>1</sub>
<i>Ulex europeus</i> <i>Pinangua kuhli</i>	A <sub>2</sub>
<i>Marasmius oreades</i> <i>Aristolochia galeata</i> <i>Bixa orellana</i> <i>Bandeireae simplicifolia</i> <i>Alysicarpus vaginalis</i> <i>Crotalaria intermedia</i> <i>Phaseolus ricciardiarus</i> <i>Vitis aestivalis</i> <i>Cytharexylum spinosum</i> <i>Holmskiodia sanguinea</i> <i>Phaeomeria speciosa</i> <i>Evonymus planipes</i> , <i>E. alatus</i> , <i>E. bungaena</i> , <i>E. japonica</i> , <i>E. latifolia</i> , <i>E. mackii</i> , <i>E. sachalinensis</i> , <i>E. sacrosancta</i> , <i>E. sieboldiana</i> , <i>E. verrucosa</i>	B
<i>Phlomis fruticosa</i> <i>Sophora japonica</i> <i>Coronilla varia</i> <i>Phyllanthus dibiculatus</i> <i>Bandeireae simplicifolia</i> <i>Cassia fistula</i> <i>Calpurina aurea</i> <i>Crotalaria composita</i> , <i>C. intermedia</i> , <i>C. sattania</i> , <i>C. striata</i> , <i>C. usarmoensis</i> , <i>Dolichos lablab</i> <i>Lathyrus pratensis</i> , <i>L. silvestris</i> <i>Phaseolus lunatus</i> , <i>Ph. phaseoloides</i> <i>Vicia catjang</i> <i>Swetenia candollei</i> <i>Maliphigia puniceifolia</i> <i>Cryptostegia madagascarensis</i> <i>Tabernaemontana coronaria</i>	A+B
<i>Cytisus sessilifolius</i> <i>Laburnum alpinum</i> <i>Lotus tetragonolobus</i> <i>Ehretia buxifolia</i>	H(O)

<i>Brownea hybrida</i> <i>Bauchinia monandra</i> <i>Cochlospermum gossypium</i>	
<i>Cerastium tomentosum</i> <i>Acalypha balfourii</i> , <i>A. hispida</i> , <i>A. macrostachys</i> <i>Caesalpinia mimosoides</i> <i>Cytisus albus</i> , <i>C. benehoacensis</i> , <i>C. canariensis</i> , <i>C. causicus</i> , <i>C. hirsutans</i> , <i>C. lusitanicus</i> , <i>C. nigricans</i> , <i>C. osmarensis</i> , <i>C. praecox</i> , <i>C. ratisbonensis</i> , <i>C. biflorus</i> , <i>C. sessilifolius</i> <i>Galactia aneistocarpa</i> , <i>G. anglica</i> , <i>G. aristata</i> , <i>G. clavata</i> , <i>G. germanica</i> , <i>G. horrida</i> , <i>G. monosperma</i> , <i>G. radiata</i> , <i>G. triacanthos</i> , <i>G. umbellata</i> <i>Genistella sagittalis</i> <i>Laburnum falcobergense</i> , <i>L. waterei</i> <i>Lens nigricans</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>Lespedeza bicolor</i> , <i>L.</i> <i>Lonchocarpus discolor</i> <i>Lotus biflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> <i>Ononis spinosa</i> <i>Petteria ramentacea</i> <i>Tetragonolobus palestinus</i> <i>Ulex densus</i> , <i>U. galli</i> , <i>U. jussiaci</i> , <i>U. nanus</i> , <i>U. velursiani</i> <i>Vigna divaricata</i> , <i>V. oroboides</i> <i>Evonymus europaeus</i> , <i>E. latifolia</i> , <i>E. phellomana</i> , <i>E. yedonensis</i>	H
<i>Iberis gibraltaria</i> <i>Bauchinia bonantiana</i> , <i>B. candicans</i> , <i>B. purpurea</i> , <i>B. variegata</i> , <i>Vicia graminea</i>	N
<i>Iberis amara</i> , <i>I. sempervivens</i> , <i>I. umbellata</i> <i>Vicia leganyana</i>	M
<i>Arachis hypogea</i> <i>Tephrosia hookeriana</i> <i>Termophis caroliniana</i> , <i>T. montana</i>	T
<i>Salvia sclarea</i>	T <sub>n</sub>

krwinki grupy N, natomiast lektyna z *Vicia faba* ma charakter nieswoisty (12).

Aglutynacja erytrocytów, podobnie jak i innych komórek zwierzęcych jest następstwem wiązania się lektyn z receptorami błon komórkowych. Obliczono, że na powierzchni erytrocytu zmieścić się może około 100 000 cząsteczek konkanawaliny A (174). Poliwalentny charakter lektyn umożliwia wiązanie się ich z receptorami wielu komórek (98). Wiązanie się lektyn z receptorami błon zależy od rozmieszczenia i aktualnej dostępności receptorów, konformacji cukrów receptorowych oraz rodzaju substancji bezpośrednio związanych z receptorami. Wpływ konformacji cukrów receptorowych na wystąpienie aglutynacji erytrocytów wykazano na przykładzie lektyny z grzyba *Fomes fomentarius*. Lektyna ta aglutynuje erytrocyty grupy B, charakteryzujące się obecnością reszt  $\alpha$ -galaktozylowych. Erytrocyty innych grup krwi, obfitujące w ugrupowania  $\beta$ -galaktozylowe nie ulegają aglutynacji w obecności tej lektyny.

Cukry lub polipeptydy, związane bezpośrednio z cukrem receptorowym mają również wpływ na przebieg reakcji aglutynacji. Lektyna z *Glycine*



*maxima* swoiście wiąże  $\alpha$ -N-acetylogalaktozaminę. Związek ten jest determinantą grupową erytrocytów grupy A oraz występuje w ścianach komórkowych bakterii rodzaju *Streptococcus*. W erytrocytach  $\alpha$ -N-galaktozamina łączy się z galaktozą, w *Streptococcus* — z ramnozą. Bezpośrednie sąsiedztwo ramnozy pozwala na aglutynację bakterii, podczas gdy krwinki grupy A, w których cukier receptorowy lektyny z *Glycine maxima* łączy się z galaktozą nie ulegają aglutynacji (173).

Rozmieszczenie i dostępność receptorów lektynowych na powierzchni błon ma także istotne znaczenie dla przebiegu aglutynacji. Wykazano, że traktowanie erytrocytów neuraminidazą, powoduje zmiany w stopniu wiązania różnych lektyn. Erytrocyty poddane uprzednio działaniu neuraminidazy wiążą więcej cząsteczek lektyny z *Glycine maxima*, mniej cząsteczek lektyny z *Triticum vulgare* i niezmienną ilość cząsteczek konkanawailny A. Wzrost intensywności wiązania lektyny z *Glycine maxima*, po odszczepieniu kwasu sjałowego, wiążącego się z cukrami receptorowymi tej lektyny wskazuje, że cząsteczka lektyny łatwiej reaguje z cukrami receptorowymi wówczas, gdy zajmują one końcowe pozycje w łańcuchach polipeptydowych błon erytrocytów (175, 176).

Lektyny pozbawione swoistości grupowej nazwano panaglutyninami (12). Do panaglutynin należą lektyny wydzielone z nasion *Canavalia ensi-*

Tabela 4

Cukry hamujące aktywność aglutynującą lektyn (103).

Rodzaj cukru	Źródło lektyn	Enzymy inaktywujące receptory komórkowe lektyn
N-acetylo- $\alpha$ -D-galaktozamina	<i>Bauchinia purpurea</i> <i>Phaseolus limensis</i> <i>Vicia cracca</i> <i>Dolichos biflorus</i>	N-acetylo- $\alpha$ -D-galaktozaminidaza oksydaza galaktozowa
$\alpha$ -L-fukoza	<i>Ulex europeus</i> <i>Lotus tetragonolobus</i>	$\alpha$ -L-fukozydaza
D-galaktoza, D-fukoza, N-acetylo-D-galaktozamina	<i>Ricinus communis</i> <i>Soja hospida</i> <i>Viscum album</i>	oksydaza galaktozowa
$\alpha$ -D-mannopyranoza $\alpha$ -N-acetyloglukozamina	<i>Lens culinaris</i> <i>Canavalis ensiformis</i> <i>Pisum sativum</i>	L-D-mannozydaza N-acetylo-L-glukozaminidaza
N-acetylo- $\beta$ -D-glukozamina	<i>Solanum tuberosum</i> <i>Triticum vulgare</i> <i>Datura stramonium</i>	N-acetylo- $\beta$ -D-glukozaminidaza

*formis*, *Ricinus communis*, *Lens culinaris*, *Vicia faba*, *Triticum vulgare*, *Glycine maxima* oraz z bulw *Solanum tuberosum*. Panaglutyniny wiążą się również z cukrowymi receptorami erytrocytów, odmiennymi jednak od determinant grupowych krwi (100).

Tabela 5

Czynne biologicznie substancje oczyszczone techniką chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem unieruchomionej konkanawaliny A (7, 32, 182—191).

Typ substancji	Nazwa substancji
Enzymy	lizosomalna arylosulfataza mózgu $\alpha$ -glutamylotransferaza nerki szczura $\beta$ -hydrolaza dopaminy syntetaza glikogenu egzonukleaza z jadu węża kwaśna hydrolaza łożyska $\beta$ -galaktozydaza wątroby ludzkiej hialuronidaza spermy byka
Hormony	ludzka gonadotropina kosmówkowa ludzki hormon luteinizujący hormon pęcherzykowy
Lektyny	lektyna fasoli (wax bean)
Białka surowicy	$\alpha_1$ -antytrypsyna immunoglobuliny
Receptory błon komórkowych z:	L-komórek myszy komórek rakowych wątroby szczura limfocytów kurczęcia prawidłowych i stransformowanych fibroblastów myszy erytrocytów ludzkich płytek krwi ludzkiej mikrosomalnych błon wątroby
Inne	interferon kwas teichojowy z <i>Bacillus subtilis</i> polisacharydy mykobakteryjne

Aglutynację erytrocytów wywoływaną lektynami hamują cukry. Na podstawie hamowania aglutynacji erytrocytów grupy H/0/ i A  $\alpha$ -L-fukoza i N-acetylo-D-galaktozaminą określono immunodeterminanty H/0/ i A (161, 177). Aktywność aglutynującą lektyn z *Triticum vulgare* i *Solanum tuberosum* hamują oligosacharydy zawierające N-acetylo-D-glukozaminę, przy czym stopień hamowania zależy od liczby reszt cukrowych łańcucha oligosacharydowego (34, 46). Monomeryczne cząsteczki N-acetylo-D-glukozami-

ny 3000 razy słabiej hamują aglutynację erytrocytów wywołaną lektyną z *Triticum vulgare* niż trójsacharyd zbudowany z reszt N-acetylo-D-glukozaminy. Aglutynację erytrocytów wywołaną konkanawalina A hamują  $\alpha$ -D-glukoza,  $\alpha$ -mannopiranoza i  $\alpha$ -N-acetylo-D-glukozamina (71) (Tabela 4).

Bardziej skutecznie niż cukry hamują aktywność erytroaglutynującą receptory lektynowe izolowane z błon erytrocytów. Tak np. oczyszczone receptory lektyny z *Lens culinaris* 60 000 razy silniej hamują aglutynację erytrocytów niż cukier uważany za swoisty dla tej lektyny (117, 162, 178, 179, 180).

Właściwość swoistego wiązania cukrów przez lektyny wykorzystuje się z powodzeniem w chromatografii powinowactwa. Konkanawalina A, swoista wobec reszt  $\alpha$ - i  $\beta$ -D-fruktofuranosylowych,  $\alpha$ -D-arabinofuranosylowych i  $\alpha$ -D-mannopiranosylowych (181) znajduje szerokie zastosowanie w badaniach struktury cukrów, glikoproteidów i błon komórkowych (Tabela 5).

### III-3. Właściwości mitogenne lektyn

Lektyny o właściwościach mitogennych stwierdzono tylko w roślinach motylkowych jak na przykład w *Canavalia ensiformis* (192), *Phaseolus limensis* (177), *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean), *Lens culinaris* i *Pisum sativum* (190).

Ze względu na swoiste wiązanie cukrów rozróżnia się lektyny mitogenne wiążące  $\alpha$ -D-glukozę i  $\alpha$ -D-mannozę oraz wiążące N-acetylo-D-galaktozaminę. Do pierwszej grupy lektyn zalicza się konkanawalina A, lektyny z *Lens culinaris* i *Pisum sativum* (193) — z drugiej zaś lektyny z *Phaseolus vulgaris* i *Ph. limensis* (194).

Lektyny mitogenne przekształcają limfocyty krwi obwodowej w duże komórki blastoidalne (192, 193, 195—198). Stopień tego przekształcania (stymulacji) limfocytów zależy od rodzaju lektyny i jej stężenia. Lektyna z *Phaseolus vulgaris* przejawia maksymalny efekt stymulacji w stężeniu 1—10  $\mu$ g/ml, konkanawalina A — 5  $\mu$ g/ml, lektyna z *Lens culinaris* — 50  $\mu$ g/ml (12). Stymulacja limfocytów, podobnie jak i inne efekty wywoływane lektynami w komórkach zwierzęcych, wynika z powierzchniowego oddziaływania lektyn z błonami, bez wnikania do wnętrza komórki. Konkanawalina A i lektyna z *Phaseolus vulgaris*, unieruchomione na nośnikach stałych stymulowały limfocyty w takim samym stopniu jak wolne (199, 200). Usunięcie lektyny z zawiesiny stymulowanych limfocytów, cofało natychmiast wszystkie efekty, natomiast ponowne jej dodanie przywracało stymulację (201). Limfocyty stymulowane lektynami różnią się od wyjściowych kształtem komórek, wzrostem zasadowości cytoplazmy, pojawieniem się licznych wakuoli, luźną strukturą jądra (202, 203). Zmiany morfologiczne limfocytów są wyrazem wzmożonego metabolizmu ob-



serwowanego w krótkim czasie po podaniu mitogennej lektyny. W pierwszej kolejności wzrasta pobieranie jonów potasu, wapnia i nukleozydów (204), cukrów (205) i fosforanów nieorganicznych (206). Następstwem tych procesów jest wzmożenie syntezy kwasów nukleinowych (195, 197, 207—209), białek (195, 207—210), węglowodanów (211) i fosfolipidów (212). Synteza DNA rozpoczyna się po około 24 godzinach inkubacji limfocytów z lektynami i osiąga maksymalną szybkość po upływie 50—60 godzin, po czym spada i ponownie wzrasta po 70 godzinach inkubacji (213). Znacznie wcześniej, bo już po dwóch godzinach od podania lektyny do hodowli limfocytów wzrasta synteza rybosomowego RNA, po 20 godzinach zaś przewyższa 50—100-krotnie poziom syntezy w limfocytach niestymulowanych (214—216). Równocześnie obserwuje się nagromadzenie nowo syntetyzowanych rybosomów (217). Synteza DNA w limfocytach stymulowanych lektynami przebiega cyklicznie (213), podczas gdy synteza RNA i białek zanika jedynie w czasie mitozy komórek. W metabolizmie węglowodanów obserwowano wzrost poziomu glikogenu w pierwszych 24 godzinach stymulacji a następnie powolny, aż do zaniku, spadek zawartości glikogenu (220). Obserwowano również wzmożenie cyklu pentozowego, związane z intensywniejszą przemianą kwasów nukleinowych (211). Niezwykle szybko, bo już po 10 minutowej inkubacji limfocytów z lektynami mitogennymi, obserwuje się trzykrotnie intensywniejsze w stosunku do kontroli wbudowywanie znakowanych oleinianów w lecytyny (91). W procesie stymulacji obserwuje się również wzmożenie aktywności fosfolipazy A, polimerazy DNA i RNA, fosforylasy i kinazy urydylowej (91, 221).

#### IV. Rola lektyn w roślinach

Jak dotąd nie wiele wiadomo na temat roli lektyn w roślinach. Lektyny występują głównie w organach generatywnych i zapasowych roślin oraz w znacznie mniejszych ilościach w liściach, łodygach, korzeniach i korze (13, 71). Zaobserwowano korelację pomiędzy spadkiem poziomu lektyn w liściach a równoczesnym wzrostem ich ilości w nasionach. Przypuszcza się więc, że synteza lektyn przebiega w liściach a gromadzenie w cytoplazmie zarodków i liścieni (222, 223). W czasie kiełkowania nasion równocześnie z wyczerpywaniem się białek zapasowych obniża się również poziom lektyn (224, 225). Obserwacje te, jak i wysokie powinowactwo lektyn względem cukrów, nasuwają przypuszczenia o możliwości udziału lektyn w magazynowaniu węglowodanów w nasionach i organach zapasowych roślin.

Inna hipoteza przypisuje lektynom właściwości grzybobójcze. Zaobserwowano, że zawarta w kielkach *Triticum vulgare* lektyna hamowała wzrost zarodników grzyba *Trichoderma viridae*. W tym przypadku rola lektyn

polegała być może na ochronie kiełkujących nasion przed grzybami i bakteriami gnilnymi (226).

Lektynom przypisuje się także istotne znaczenie w symbiozie bakterii brodawkowych z rodzaju *Rhizobium* z korzeniami roślin motylkowatych (227—229). Analiza zawartości lektyn w różnych fragmentach korzeni wykazała, że prawie całą lektynę korzeni wykrywa się w brodawkach korzeniowych i krótkich odcinkach włóśników, tuż pod brodawkami. Równocześnie wiadomo, że aglutynację bakterii brodawkowych może wywołać tylko taka lektyna, która pochodzi z rośliny żyjącej w symbiozie z danym szczepem bakterii. Lektyna wyizolowana z *Glycine maxima* aglutynuje tylko *Rhizobium japonicum*, z *Pisum sativum* — *Rh. leguminosarum*, z *Phaseolus vulgaris* — *Rh. phaseoli* (230). Zjawisko to wynika prawdopodobnie z właściwości swoistego wiązania antygenów 0 określonych szczepów *Rhizobium* przez lektyny wyizolowane z roślin, żyjących w symbiozie z danym szczepem bakteryjnym (229).

*Autorka wyraża wdzięczność prof. dr hab. Bronisławie Morawieckiej za krytyczną dyskusję w trakcie przygotowywania niniejszego artykułu.*

*Artykuł otrzymano 10.4.1976; po rewizji autorskiej przyjęto 23.11.1977.*

## PIŚMIENICTWO

1. Gilboa-Garber N., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **273**, 165—173.
2. Scott M. T., (1972), *J. Invest. Pathol.*, **19**, 66—71.
3. Kothbauer H., Schenkel-Brunner H., (1975), *Comp. Biochem. Physiol. A*, **50**, 27—29.
4. Roberts T. K., Boursnell J. C., (1974), *J. Reprod. Fertil.*, **41**, 489—492.
5. Stockert R. J., Morell A. G., Scheinberg I. H., (1974), *Science*, **186**, 365—366.
6. Boyd W. C., Sharpleigh E., (1954), *Science*, **119**, 419—421.
7. Liener I. E., (1976), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 291—319.
8. Gold E. R., Balding P., (1975), *Receptor Specific Proteins*, str. 117—236, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
9. Sage H. J., Vazquez J. J., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 120—125.
10. Sage H. J., Connetti S. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4713—4719.
11. McPherson A., Rich J., Rich A., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 155—160.
12. Lis H., Scharon N., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 541—574.
13. Sharon N., Lis H., (1972), *Science*, **177**, 949—958.
14. Reeke G. N., Becker W. J., Cunningham B. A., Gunther G. R., Wang J. L., Edelman G. M. (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 369—382.
15. Liener I. E., Wada S., (1956), *J. Biol. Chem.*, **222**, 695—704.
16. Wada S., Pallansch M. J., Liener I. E., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 395—400.
17. Liener I. E., (1958), *J. Biol. Chem.*, **233**, 401—405.
18. Jaffé W. G., Gaade K., (1959), *Nature*, **183**, 1329—1330.
19. Jaffé W. G., Hannig K., (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 80—91.
20. Allan D., Crumpton N. J., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1143—1148.



21. Takahashi T., Ramachandramurthy P., Liener I. E., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 123—133.
22. Takahashi T., Liener I. E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 560—564.
23. Entlicher G., Kostir J. V., Kocourek J., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 272—281.
24. Paulová M., Entlicher G., Tichá M., Kostir J. V., Kocourek J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **237**, 513—518.
25. Marik T., Entlicher G., Kocourek J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 53—61.
26. Young N. M., Leon M. A., Takahashi T., Howard I. K., Sarge H. J., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1596—1601.
27. Bourrillon R., Fout J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **154**, 28—39.
28. Fout J., Bourrillon R., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 111—116.
29. Matsumoto I., Osawa T., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **194**, 180—189.
30. Yariv J., Kalb A. J., Katchalski E., (1967), *Nature*, **215**, 890—891.
31. Kalb A. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 532—536.
32. Terao T., Osawa T., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 199—201.
33. Ersson B., Asperg K., Porath J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 446—452.
34. Allen A. K., Neuberger A., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 307—314.
35. Delmotte F., Kieda C., Mousigmy M., (1975), *FEBS Letters*, **53**, 324—330.
36. Marinkovich V. A., (1964), *J. Immunol.*, **93**, 732—741.
37. Morawiecka B., (1969), XX Monografia Biochemiczna, PWN, Warszawa.
38. Nagata Y., Burger M. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2248—2250.
39. Le Vine D., Kaplan M. J., Greenway P. J., (1972), *Biochem. J.*, **129**, 847—856.
40. Takahashi T., Yamada N., Iwamoto K., Shimabayashi Y., Izutsu K., (1973), *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 29—36.
41. Allen N. K., Brilliantine L., (1969), *J. Immunol.*, **102**, 1295—1299.
42. Nowakova N., Kocourek J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **359**, 320—333.
43. Agraval B. B. L., Goldstein I. J., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 376—379.
44. Lotan R., Gussin A. E. S., Lis H., Sharon N., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 656—662.
45. Allen A. K., Neuberger A., Sharon N., (1973), *Biochem. J.*, **131**, 155—162.
46. Privat J. P., Delmotte F., Mialonier G., Bouchard P., Monsigmy M., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 5—14.
47. Miller J. B., Hsu R., Henrikson R., Yachnin S., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 1388—1391.
48. Sumner J. B., (1919), *J. Biol. Chem.*, **37**, 137—142.
49. Hardman K. D., (1973), *Adv. Exp. Med. Biol.*, **40**, 103—123.
50. Wang J. L., Becker J. W., Reeke G. N., Edelman G. M., (1974), *J. Mol. Biol.*, **88**, 259—262.
51. Bryzgunov V. A., Lutsik M. D., Melick-Adamyán V. R., Mokulski M. A., (1976), *J. Mol. Biol.*, **101**, 435—437.
52. Takahashi T., Yagi T., Oda T., Liener I. E., (1974), *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 865—867.
53. Sela B., Lis H., Sharon N., Sachs L., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 273—277.



54. Olsenes E., Refsnes K., Pihl A., (1974), *Nature*, **294**, 627—631.
55. Fliegerová O., Salvetová A., Tichá M., Kocourek J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **351**, 416—426.
56. Pusztai A., Watt W. B., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 57—71.
57. Entlicher G., Kocourek J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 165—169.
58. Wang L. J., Cunningham B. A., Waxdal M. J., Edelman G. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1490—1502.
59. Cunningham B. A., Wang J. L., Waxdal M. J., Edelman G. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1503—1512.
60. Reeke G. N., Becker J. W., Edelman G. M., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1525—1547.
61. McKenzie G. H., Sawyer W. H., Nichol L. W., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 283—293.
62. Barber B. H., Carver J. P., (1975), *Can J. Biochem.*, **53**, 371—379.
63. Kalb A. J., Lustig A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **168**, 366—367.
64. Edelman G. M., Cunningham B. A., Reeke G. N., Becker J. W. Jr., Waxdal M. G., Wang J. L., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 2280—2284.
65. Cunningham B. A., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 219—227.
66. Becker J. W., Reeke G. N. Jr., Wang J. L., Cunningham B. A., Edelman G. M., (1975), **250**, 1513—1524.
67. Kalb J., Levitzky, (1968), *Biochem. J.*, **109**, 669—672.
68. Yariv J., Kalb A. J., Levitzky A., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 303—305.
69. So L. L., Goldstein I. J., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 398—404.
70. Lewis S. D., Shafer J. A., Goldstein I. J., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 689—695.
71. Kornfeld R., Ferris C., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2614—2620.
72. Hardman K. D., Ainsworth C. F., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1120—1127.
73. Doyle R. J., Thomason D. L., Gray R. D., Glew R. H., (1975), *FEBS-Letters*, **52**, 185—187.
74. Grimaldi J. J., Sykes B. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 1618—1624.
75. Brewer C. F., Sterhlicht H., Marcus D. M., Grolman A. P., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4448—4457.
76. Villafranca J. J., Viola R. E., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 465—468.
77. Alter G. M., Magnuson J. A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4038—4045.
78. Becker J. W., Reeke G. N. Jr., Cunningham B. A., Edelman G. M., (1976), *Nature*, **259**, 406—409.
79. Karlstam B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **329**, 295—304.
80. Shoham M., Kalb A. J., Pecht I., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1914—1917.
81. Sherry A. D., Newman A. D., Gutz C. G., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2191—2196.
82. Richardson C. E., Behnke W. D., (1976), *J. Mol. Biol.*, **102**, 441—451.
83. Kornfeld R., Kornfeld S., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 276—282.
84. Lockhart R. B., Kornfeld S., Kipnis D. M., (1973) *Clin. Res.*, **21**, 622—628.
85. Marx J. L., (1974), *Science*, **183**, 1279—1282.
86. Shoham J., Inbar M., Sachs L., (1970), *Nature*, **277**, 1244—1246.
87. Mayerus P. W., Brodie G. N., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4253—4257.
88. Inbar M., Shinitzky M., Sachs L., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 245—253.
89. Glimelius B., Nilsson K., Pontén J., (1975), *Int. J. Cancer*, **15**, 888—896.

90. Grzelakowska-Sztabert B., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 3—22.
91. Wallach D. F. H., (1975), *Membrane Molecular Biology of Neoplastic Cells*, str. 435—481, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York.
92. Nicolson G. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **457**, 57—108.
93. Nicolson G. L., (1974), *Int. Rev. Cytol.*, **39**, 89—190.
94. Weeks C., Weeks G., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 372—382.
95. Nicolson G. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **458**, 1—72.
96. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, 720—731.
97. Singer S. J., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 805—833.
98. Yahara J., Edelman G. M., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **253**, 455—469.
99. Albertini D. F., Clark J. I., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 4976—4980.
100. Van Wauwe J. P., Loontjies F. G., De Bruyne C. K., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 456—461.
101. Dean R. D., Homer R. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 141—144.
102. Ruddon R. W., Weisenthal L. M., Lundean D. E., Bessler W., Goldstein I. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1848—1851.
103. Pardoe G. I., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 239—259.
104. Kornfeld R., Kornfeld S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2536—2545.
105. Watkins M. W., (1966), *Glycoproteins*, red. Gottschalk A., t. 5, str. 475—483, Elsevier, Amsterdam.
106. Paspisilová J., Entlicher G., Kocourek J., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **362**, 593—597.
107. Roberson M., Oppenheimer S. B., (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 263—268.
108. Ryan G. B., Borysenko J. Z., Karnovsky M. J., (1974), *J. Cell Biol.*, **62**, 351—356).
109. Poste G., Papahadjopoulos D., Nicolson G. L., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4430—4434.
110. Rapin A. M. C., Burger M. M., (1974), *Adv. Cancer Res.*, **20**, 1—91.
111. Burger M. M., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 91—101.
112. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., Huet Ch., Oseroff A. R., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 594—599.
113. Comoglio P. M., Guglielmone R., (1972), *FEBS Letters*, **27**, 256—258.
114. Garrido J., (1975), *Exp. Cell Res.*, **94**, 159—175.
115. Garrido J., Burglen M.-J., Samolyk D., Wicker R., Bernhard W., (1974), *Cancer Res.*, **34**, 230—243.
116. Huet Ch., Bernhard W., (1974), *Int. J. Cancer*, **13**, 227—239.
117. Nicolson G. L., Blaustein J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **266**, 543—547.
118. Berlin R. D., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **253**, 445—454.
119. Marquardt M. D., Gordon J. A., (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 310—316.
120. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2748—2751.
121. Arndt D. J., Berg P., (1971), *J. Virol.* **8**, 716—721.
122. Nicolson G. L., (1973), *J. Nat. Cancer Inst.*, **50**, 1443—1451.
123. Nicolson G. L., Lacorbiere M., Hunter T. R., (1975), *Cancer Res.* **35**, 144—155.
124. Nicolson G. L., Lacorbiere M., Eckhart W., (1975), *Biochemistry*, **14**, 172—179.
125. Ahern T., Kay J. E., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 91—101.
126. Trowbridge J. S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 6004—6012.
127. de Petris S., Raff M. C., (1974), *Eur. J. Immunol.*, **4**, 130—137.

128. Unanue E. R., Karnovsky M. J., (1973), *Transplantat. Rev.*, **14**, 184—210.
129. Cunningham B. A., Wang J. L., Pflomm M. M., Edelman G. M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3233—3239.
130. Nicolson G. L., (1971), *Nature, New Biology*, **233**, 244—246.
131. Martinez-Palomo A., Wicker R., Bernhard W., (1972), *Int. J. Cancer*, **9**, 676—683.
132. Bretton R., Wicker R., Bernhard W., (1972), *Int. J. Cancer*, **10**, 397—409.
133. Inbar M., Ben-Bassat H., Fibach E., Sachs L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2577—2581.
134. Roth J., (1974), *Int. J. Cancer*, **14**, 762—770.
135. Barbarese E., Sauerwein H., Simkins H., (1973), *J. Memb. Biol.* **13**, 129—142.
136. Rosenblith J. Z., Ukena T. E., Yin H. H., Berlin R. D., Karnovsky M. J., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1625—1629.
137. Noonon K. D., Burger M. M., (1973), *J. Cell Biol.*, **59**, 134—142.
138. Inbar M., Sachs L., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 124—128.
139. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1973), *Int. J. Cancer*, **12**, 93—99.
140. Roth J., Neupert G., Bloch F., (1975), *Exp. Path.*, **10**, 143—155.
141. Rowlatt C., Wicker R., Bernhard W., (1973), *Int. J. Cancer*, **11**, 314—326.
142. de Petris S., Raff M. C., Mallucci L., (1973), *Nature, New Biology*, **244**, 275—278.
143. Roth J., Mayer H. W., Neupert H., Bloch F., (1973), *Exp. Pathol.*, **8**, 19—30.
144. Barnett R. E., Furcht L. T., Scott R. E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1992—1994.
145. Gaffney J. B., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 664—668.
146. Albrecht-Buhler G., (1973), *Exp. Cell Res.*, **78**, 67—70.
147. Albrecht-Buhler G., Soloman F., (1974), *Exp. Cell Res.*, **85**, 225—233.
148. Nicolson G. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **458**, 1—72.
149. Inoue M., Utsumi K., Seno S., (1975), *Nature*, **255**, 556—557.
150. Oliver J. M., Zurier R. B., Berlin R. D., (1975), *Nature*, **253**, 471—473.
151. Grzelakowska-Sztabert B., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 423—445.
152. Gunther G. R., Wang J. L., Yahara I., Cunningham B. A., Edelman G. M., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1012—1016.
153. Huet Ch., Lonchamp M., Huet M., Bernadac A., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **365**, 28—39.
154. Gordon J. A., Marquardt M. D., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **332**, 136—144.
155. Noonon K. D., Burger M. M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4286—4292.
156. Rittenhouse H. G., Williams R. E., Winieski B., Fox C. F., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 222—228.
157. Lotan R., Lis H., Rosenwasser A., Novogrodsky A., Sharon N., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 1347—1355.
158. Loor F. L., (1973), *Exp. Cell Res.*, **82**, 415—417.
159. Hourani B. T., Chace N. M., Pincus J. H., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 520—532.
160. Akedo H., Mori Y., Tanigaki Y., Shinkoi K., Morita K., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **281**, 378—385.
161. Jansons V. K., Burger M. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 127—135.



162. Jansons V. K., Sakamoto C. K., Burger M. M., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **291**, 136—143.
163. Clarke M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 1063—1070.
164. Fuller G. M., Boughter J. M., Morazzani M., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3036—3041.
165. Findley J. B. C., (1974), *J. Biol. Chem.* **249**, 4398—4403.
166. Adair W. L., Kornfeld S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4696—4704.
167. Winzler R. J., (1969), *The Red Cell Membrane: Structure and Function*, wyd. Jamieson G. A., Greenwalt T. J., str. 157—171, Lippincott Co, Philadelphia.
168. Uhlenbruck G., (1964), *Vox Sang.*, **9**, 377—384.
169. Marchesi V. T., Andrews E. P., (1971), *Science*, **174**, 1247—1248.
170. Marchesi V. T., Tillack T. W., Jackson R. L., Segrest J. P., Scott R. E., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1445—1449.
171. So L. L., Goldstein I. J., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1617—1622.
172. Zabłocki B., (1973), *Podstawy współczesnej immunologii*, str. 171—173, PWN, Warszawa.
173. Bird G. W. G., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 129—138.
174. Bachi A., Schnebli M. O., (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 285—295.
175. Maca R. D., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 1218—1221.
176. Vlodavsky I., Sachs L., (1975), *Exp. Cell Res.*, **93**, 111—119.
177. Kornacka L., (1971), *Acta Haemat. Pol.*, **2**, 91—96.
178. Turner R. S., Burger M. M., (1974), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **234**, 332—347.
179. Juliano R. L., Stamp D., (1975), *Nature*, **261**, 235—237.
180. Tanner M. J. A., Anstee D. J., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 265—270.
181. Goldstein I. J., Hollerman C. E., Merrick J. M., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, 68—76.
182. Dufau M. I., Tsuruhara T., Catt K. J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **278**, 281—292.
183. Besançon F., Bourgeade M-F., (1974), *J. Immunol.*, **113**, 1061—1063.
184. Dorner F., Skriba M., Weil R., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1981—1985.
185. Hayman M. J., Skehel J. J., Crumpton M. J., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 185—188.
186. Bishayee S., Faroogui A. A., Bachhawat B. K., (1973), *Indian J. Biochem. Biophys.*, **10**, 1—2.
187. Shaper J. K., Barker R., Hill R. L., (1973), *Anal. Biochem.*, **53**, 564—570.
188. Gordon J. A., Blumberg S., Lis H., Sharon N., (1972), *FEBS Letters*, **24**, 193—196.
189. Allen A. K., Neuberger A., (1975), *FEBS Letters*, **50**, 362—364.
190. Tomita M., Kurokawa T., Onozaki K., Ichiki N., Osawa T., (1971), *Experientia*, **28**, 84—85.
191. Bessler W., Goldstein I. J., (1973), *FEBS Letters*, **34**, 58—63.
192. Novogrodsky A., Katchalski E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 291—296.
193. Inbar M., Ben-Bassat H., Sachs L., (1972), *Int. J. Cancer*, **9**, 143—149.
194. Donnelly E. H., Goldstein I. J., (1970), *Biochem. J.*, **118**, 679—680.
195. Novogrodsky A., Katchalski E., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **215**, 291—296.
196. Trowbridge I. S., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3650—3654.
197. Politis G., Plassara M. G., Thomou-Politis H., (1975), *Nature*, **257**, 485—485.
198. Burleson D. G., Sage H. J., (1976), *J. Immunol.*, **116**, 696—703.
199. Greaves M., Janossy G., (1972), *Transplant. Rev.*, **11**, 87—130.

200. Anderson J., Edelman G. M., Möller G., Sjöberg O., (1972), *Eur. J. Immunol.* **2**, 233—235.
201. Cooper H. L., Rubin A. D., (1966), *Science*, **152**, 516—518.
202. Novell I. C., (1961), *Cancer Res.*, **21**, 1518—1520.
203. Robbins G. H., (1964), *Science*, **146**, 1648—1650.
204. Peters J. H., Hansen P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 509—513.
205. Peters J. H., Hansen P., (1971), *Eur. J. Biochem.*, **19**, 502—508.
206. Cross M. E., Ord M. G., (1971), *Biochem J.*, **124**, 241—245.
207. Roguet R., Bourrillon R., (1975), *Biochem J.*, **152**, 421—423.
208. Barlow S. D., Ord M. G., (1975), *Biochem. J.*, **148**, 295—302.
209. Kristiansen T., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **338**, 246—253.
210. Ahern T., Kay J. E., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 513—515.
211. Ferguson R. M., Schmidtke J. R., Simmons R. L., (1975), *Nature*, **256**, 744—745.
212. Fisher D. B., Mueller G. C., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 316—323.
213. Monjardino J. P. P. V., Mac Gillivray A. J., (1970), *Exp. Cell Res.*, **60**, 1—5.
214. Cooper H. L., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1946—1952.
215. Rubin A. D., (1968), *Nature*, **220**, 196—198.
216. Torelli U. L., Henry P. H., Weissmann S. M., (1968), *J. Clin. Invest.*, **47**, 1083—1087.
217. Inman D. R., Cooper E. H., (1963), *J. Cell Biol.*, **19**, 441—444.
218. Crippa M., (1966), *Exp. Cell Res.*, **42**, 371—374.
219. Bullough W. S., (1965), *Cancer Res.*, **25**, 1683—1685.
220. Rozensajn L., Fisher D., (1969), *Acta Haemat.*, **42**, 138—140.
221. Tyrsted G., (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 429—440.
222. Mialonier G., Privat J.-P., Monsigny M., Kahlen G., Durand R., (1973), *Physiol. Veg.*, **11**, 519—537.
223. Howard I. K., Sage H. J., Horton C. B., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **149**, 323—326.
224. Rougé P., (1974), *C. R. Acad. Sci. D.*, **278**, 449—452.
225. Rougé P., (1974), *C. R. Acad. Sci. D.*, **278**, 3083—3087.
226. Mirelman D., Galun E., Sharon N., Lotan R., (1975), *Nature*, **256**, 414—416.
227. Hemblin J., Kent S. P., (1973), *Nature*, **245**, 28—30.
228. Lotan R., Sharon N., Mirelman D., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 257—262.
229. Wolpert J. S., Albersheim P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 729—737.
230. Bohlool B. B., Schmidt E. L., (1974), *Science*, **185**, 269—271.

## K O M U N I K A T

W ramach Polskiego Towarzystwa Histochemików i Cytochemików powstała Sekcja Tkanki Łącznej.

Celem Sekcji jest między innymi 1) zbieranie informacji na temat badań prowadzonych w kraju w zakresie biologii i patologii tkanki łącznej 2) inspirowanie tych badań, 3) organizowanie sympozjum naukowych, 4) współpraca z odpowiednimi organizacjami i ośrodkami zagranicznymi.

Sekcja Tkanki łącznej P:T.H.C. planuje zorganizowanie wiosną 1979 r. Sympozjum na temat biologii i patologii tkanki kostnej z udziałem uczestników z CSRS i NRD.

Ośrodki i osoby zajmujące się w kraju problematyką tkanki łącznej proszone są o łaskawe przesłanie informacji zawierających nazwisk kierowników i nazwiska wykonawców prac oraz ich tematów. W/w. informacje umożliwią sporządzenie ewidencji badań nad tkanką łączną.

Wspomniane informacje prosimy przesyłać na adres:

Prof. dr hab. med. **Eugeniusz Małyk**  
**Instytut Reumatologiczny**  
**02-623 Warszawa**  
**ul. Spartańska 1**



ANDRZEJ STANKIEWICZ \*)

## Dezaminaza AMP

### AMP-deaminase

#### Spis treści

- I. Wstęp
- II. Ogólne właściwości dezaminazy mięśniowej AMP
- III. Regulacja aktywności dezaminazy AMP
- IV. Metale dwuwartościowe a aktywność dezaminazy AMP
- V. Specyficzność substratowa i mechanizm reakcji dezaminazy AMP
- VI. Uwagi końcowe

#### Contents

- I. Introduction
- II. General properties of muscle AMP-deaminase
- III. Regulation of the activity of AMP-deaminase
- IV. Divalent metals and activity of AMP-deaminase
- V. Substrate specificity and the mechanism of the reaction catalysed by AMP-deaminase
- VI. Concluding remarks

\*) Dr, Zakład Biochemii, Instytut Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 1, 80—211 Gdańsk.

Wykaz stosowanych skrótów: EDTA — sól sodowa kwasu etyleno-dwuaminoczworocowego; 5'-formycyna — 9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-6-N-amino-pirazolopirymidyno-5'-fosforan; N<sup>6</sup>OHNH-AMP — 6-N-hydroksy-9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-a-denino-5'-fosforan; Ara-AMP — 9-(1'-β-D-arabinopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforan; NH<sub>2</sub>-AMP — 2-amino-9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforan; N<sup>6</sup>-metylo-AMP — 6-N-metylo-9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforan; N<sup>1</sup>-metylo-AMP — 1-N-metylo-9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforan; 3-izo-AMP — 9-(3'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforan; Adenozyno-5'-monosiarczan — 9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-siarczan; Adenozyno-5'-fosforamid — 9-(1'-β-D-rybopentafuranozylo)-adenino-5'-fosforamid; fruktozo-1,6-P<sub>2</sub> — fruktozo-1,6-dwufosforan; Kwas 2P-glicerynowy — kwas 2-fosfoglicerynowy; Kwas 3P-glicerynowy — kwas 3-fosfoglicerynowy; Kwas 2,3P<sub>2</sub>-glicerynowy — kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy.

Tabela 1

Stopień oczyszczenia i aktywność właściwa dezaminazy AMP z różnych źródeł.

Źródło enzymu	Oczyszczenie ( $\times$ )	Aktywność właściwa ( $\mu\text{mole AMP}/\text{min} \times \text{mg białka}$ )	Środowisko pomiaru	Piśmiennictwo
Mięśnie	170	2,6	50 mM imidazol/HCl pH 6,5	20
	745	92	150 mM KCl, 10 mM AMP	20
	870	65	50 mM imidazol/HCl pH 6,5	20
	2160	121	150 mM KCl, 70 $\mu\text{M}$ AMP	20
	1100	150	j.w.	19
Erytrocyty	240	92	j.w.	13
	500	5,7	{ 100 mM K/bursztynian pH 6,5 50 $\mu\text{M}$ AMP	21
Łożysko	540	30,6	{ 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 75 mM KCl, 2,5 mM ATP, 2,5 mM AMP	22
			50 mM K/bursztynian pH 6,5	

## I. Wstęp

W roku 1928 Gerard Schmidt z pracowni Embdena wykazał, że uwalnianie amoniaku w mięśniu katalizuje przede wszystkim enzym specyficzny wobec 5'-AMP, nazwany wówczas dezaminazą adenylową (1, 2). Jego obecna nazwa według obowiązującej klasyfikacji i nomenklatury enzymów brzmi dezaminaza AMP (B.C. 3.5.4.6). Katalizuje ona reakcję hydrolitycznego odszczepienia amoniaku od cząsteczki AMP ulegatury enzymów brzmi dezaminaza AMP (E.C. 3.5.4.6). Katalizuje ona reakcja ta jest nieodwracalna. Od czasu odkrycia Schmidta wielu badaczy podejmowało trud oczyszczenia i badania właściwości dezaminazy AMP z różnych źródeł. Obszerne wcześniejsze piśmiennictwo tego przedmiotu zebrano w kilku pracach przeglądowych (3—9).

Dezaminaza AMP jest enzymem bardzo rozpowszechnionym; występuje ona nie tylko w tkankach wyższych zwierząt (10—14), lecz również w tkankach bezkręgowców (15), roślin (16, 17) i w bakteriach (18). Tkanką najbogatszą w enzym są mięśnie szkieletowe, przy czym preparaty enzymu izolowane z mięśni wyższych zwierząt odznaczają się zdecydowanie wyższą aktywnością właściwą dającą się mierzyć w niskich stężeniach substratu, w porównaniu z preparatami enzymu izolowanego z mięśni raka i tkanek pozamięśniowych wyższych zwierząt (Tabela 1), w przypadku których aktywność enzymu można zmierzyć jedynie w wysokich, niekiedy wysycających, stężeniach AMP.

## II. Ogólne właściwości mięśniowej dezaminazy AMP

Uzyskanie jednorodnych preparatów dezaminazy AMP z mięśni szkieletowych kilku gatunków zwierząt pozwoliło na szczegółowe zbadanie właściwości cząsteczki enzymu, a także przeprowadzenie badań porównawczych dotyczących mechanizmów regulacji enzymu. Skład aminokwasowy dezaminazy z mięśni kruczęcia, królika i szczura wykazuje daleko idące podobieństwo (Tabela 2). Także masy cząsteczkowe preparatów enzymu mięśniowego różnych gatunków zwierząt są zbliżone, podobnie jak struktura podjednostkowa enzymu (Tabela 3).

Przyjmuje się obecnie, że dezaminaza mięśniowa jest tetramerem o masie cząsteczkowej około 280 000. Warto przy tym zwrócić uwagę, że dezaminaza izolowana z mięśni kury jest jednym z nielicznych enzymów uzyskanych w postaci dwóch jednorodnych form enzymu, różniących się stałą sedymentacji i odpowiadających zapewne formie teramerycznej i mono-, lub dimerycznej enzymu (Tabela 3).

W tkankach szczura znaleziono kilka molekularnych form enzymu różniących się m.in. cechami immunologicznymi, kinetyką reakcji, powi-



nowactwem wobec substratu, odpornością na denaturację cieplną i optimum pH (14, 31—34). Forma A enzymu znaleziona została w mięśniach szkieletowych, forma B w nerce i w wątrobie, forma C zaś w mięśniu sercowym. W mózgu szczura występuje pięć izoenzymów B i C oraz trzy będące hybrydami B i C. W dotychczasowych badaniach dezaminazy mięśniowej izolowano ją najczęściej z mięśni czerwonych ograniczając się do

**Tabela 2**

Skład aminokwasowy dezaminazy AMP z mięśni szkieletowych  
(mole/mol enzymu).

Aminokwas	Źródło		
	Szczur <sup>a</sup>	Królik <sup>b</sup>	Kurczę <sup>b</sup>
Lizyna	184	162	164
Histydyna	76	57	88
Arginina	112	87	132
Kw. asparagi- nowy	252	261	248
Treonina	120	112	108
Seryna	164	178	152
Kw. glutamino- wy	260	306	268
Prolina	132	158	124
Glicyna	112	142	116
Alanina	152	195	168
1/2 Cysteina	32	32	32
Walina	116	120	136
Metionina	76	82	64
Izoleucyna	108	133	96
Leucyna	224	268	216
Tyrozyna	120	125	132
Fenylalanina	132	127	120
Tryptofan	20	16	24

<sup>a</sup> Cytowane wg. 23,

<sup>b</sup> Cytowane wg. 24.

stwierdzenia, że źródłem enzymu był mięsień szkieletowy. Ostatnio opublikowano jednak doniesienie wskazujące na występowanie różnych molekularnych form dezaminazy AMP w mięśniach czerwonych i białych królika (35). Wskazuje to na konieczność określania typu mięśnia z jakiego izoluje się dezaminazę.

Dezaminazy AMP z różnych źródeł cechuje różne optimum pH (4,0—8,4); zakres optimum pH enzymów mięśniowych okazał się jednak znacznie węższy (6,4—7,0). Punkty izoelektryczne dezaminaz AMP nie zostały dotychczas oznaczone.

Reakcję katalizowaną przez dezaminazę AMP hamują związki bloku-

jące grupy sulfhydrylowe (SH) (19, 28, 52, 66, 67, 72). Systematyczne badania dotyczące tego zagadnienia przeprowadzono stosując jednorodny preparat dezaminazy AMP z mięśni królika (23, 74, 75). Wykazano występowanie kilku „rodzajów” grup SH o różnej dostępności i różnym znaczeniu dla aktywności enzymatycznej. I tak 12 grup SH/mol można było podstawić przez kwas 5,5'ditiobis (2-nitrobenzoesowy (DTNB) bez utraty aktywności enzymatycznej. Tak zmodyfikowany preparat odznaczał się jednak

Tabela 3

Masa cząsteczkowa, stała sedymentacji i struktura podjednostkowa dezaminazy AMP.

Źródło enzymu		masa cząsteczkowa	m. cząst. podjednostki	st. sedymentacji $\times 10^{-13}$	Piśmienictwo
mięśnie	sandacza	259 000		10,2 S	20
	żaby			9,8 S	20
	kury <sup>a</sup>			10,2 S	20
				5,2 S	
	kurczęcia	276 000	69 000		24
	kurczęcia	278 000	69—73 000		27
	królika	320 000		12,3 S	25
	królika	280 000	73—81 000		26
	królika			12,5 S	13
	królika	270 000		11,1 S <sup>b</sup>	28
	szczura	290 000		12,2 S	23
	szczura	238 000	59 500		29
limfocyty	człowieka	248 000		9,5 S	20
	człowieka	340 000			30

<sup>a</sup> W czasie ultrawierowania oczyszczonej dezaminazy AMP z mięśni kury uzyskuje się rozdział na dwa jednorodne białka różniące się stałą sedymentacji, prawdopodobnie odpowiadają one formom tetramerycznej i dimerycznej, lub monomerycznej enzymu.

<sup>b</sup> Współczynnik dyfuzji w czasie ultrawierowania ma wartość  $3,75 \times 10^{-7}$ .

zmienioną wrażliwością na regulacyjne działanie KCl. Krzywa zależności szybkości reakcji od stężenia substratu przy niskim 15 mM stężeniu KCl przybierała charakter hiperboliczny, podczas gdy w przypadku enzymu natywnego przy tym stężeniu KCl miała przebieg sigmoidalny. Następne 16—18 grup SH przyłączało cząsteczki DTNB dopiero po usunięciu z enzymu jonów metali dwuwartościowych drogą chelatowania. W przypadku zablokowania tych grup SH w cząsteczce apoenzymu jego reaktywacja przez cynk była znacznie upośledzona. Wreszcie, traktowanie DTNB dezaminazy zdenaturowanej podczas dializy wobec mocznika 6.9 M ujawniło w jej cząsteczce ogółem 30—32 grup SH. Można przypuszczać, że rolą wolnych grup SH jest modyfikowanie regulacyjnego wpływu jonów potasu na enzym, a także wiązanie jonów cynku, a być może również udział w stabilizacji struktury czwartorzędowej cząsteczki dezaminazy.

Na udział mostków dwusiarczkowych w strukturze dezaminazy wska-

zuje hamowanie jej aktywności przez związki redukujące. Merkaptoetanol i ditioerytritol w stężeniu 1 mM oraz 10 mM cysteina nie wywierają wprawdzie wpływu na aktywność enzymu w obecności KCl, jednakże 40 mM merkaptoetanol w obecności KCl i 1 mM merkaptoetanol oraz ditioerytritol w nieobecności KCl silnie hamują szybkość reakcji katalizowanej przez dezaminazę AMP (5, 76).

Dezaminaza AMP jest dogodnym modelem pozwalającym na badanie wpływu temperatury na kinetykę reakcji enzymatycznej. Enzym izolowany z mięśni człowieka odznacza się największym powinowactwem wobec substratu w temperaturze 25° C, a szybkość maksymalna reakcji wzrasta około 14-krotnie przy wzroście temperatury środowiska od 10° C do 45° C. Stała szybkości reakcji I-go rzędu osiąga maksymalną wartość w temperaturze 35° C (44). Regulacyjny wpływ temperatury na powinowactwo enzymu do substratu i szybkość maksymalną reakcji jest większy w przypadku dezaminaz izolowanych z mięśni zwierząt stałocieplnych (36—39). Wpływ temperatury na kinetykę reakcji katalizowanej przez dezaminazy mięśniowe izolowane z tkanek płodów kurczęcia (40) i szczura (41) oraz z mięśni dorosłych osobników zmiennocieplnych jest podobny. Cechy charakteryzujące enzym zwierzęcia stałocieplnego pojawiają się dopiero w czasie rozwoju postnatalnego. Sugeruje to występowanie odrębnych form enzymu w tkankach płodowych i w tkankach osobników dorosłych. Wniosek ten wspierają obserwacje dotyczące aktywności dezaminazy AMP w mięśniach szkieletowych kończyn królika i w sercu kurczęcia w rozwoju płodowym i postnatalnym. Aktywność dezaminazy w mięśniach kończyn królika jest niska bezpośrednio po urodzeniu i wzrasta gwałtownie między 5, a 15 dniem życia do wartości obserwowanych w mięśniach kończyn zwierząt dorosłych. Aktywność dezaminazy w mięśniu przepony jest niska w okresie płodowym i wzrasta na 4—5 dni przed urodzeniem, osiągając wartość maksymalną bezpośrednio po urodzeniu (42). Może to wskazywać na przystosowanie się mięśnia przepony, jeszcze pod koniec życia płodowego, do podjęcia pracy oddechowej oraz na stopniowe przystosowywanie się mięśni kończyn do zwiększającej się po urodzeniu ruchliwości zwierząt. Wniosek ten wydaje się prawidłowy, nie należy jednak zapominać, że bezpośredni związek dezaminazy AMP ze skurczem mięśnia uważa się na ogół za wątpliwy. Wysoka początkowo aktywność dezaminazy AMP w sercu zarodka kurczęcia maleje po wykluciu się pisklęcia do około 1/3 poprzedniej wartości, osiągając minimum w 18 dniu życia kurczęcia, po czym ponownie powoli wzrasta osiągając w mięśniu serca kury dorosłej wartości zbliżone do wartości cechujących mięsień zarodkowy (43). Próba interpretacji tych badań, poprzez wiązanie otrzymanych wyników z fizjologicznym obciążeniem pracą mięśnia sercowego kurczęcia w różnych okresach życia płodowego i postnatalnego wymagałaby jednak szczegółowych informacji fizjologicznych na ten temat, co przekracza ramy artykułu.



### III. Regulacja aktywności dezaminazy AMP

Wykazano, że dezaminaza AMP posiada właściwości białka allosterycznego i poznano szereg efektorów allosterycznych, które regulują aktywność enzymu. Wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu ma przebieg sigmoidalny, co oznacza, że wysokie stężenia substratu aktywują enzym. Wartość stałej Michaelisa enzymu mięśniowego jest bliska wartości stałej substratowej. Wydaje się, że powinowactwo dezaminazy z mięśni wyższych zwierząt do substratu jest wyższe niż powinowactwo enzymu z mięśni raka i tkanek pozamięśniowych (Tabela 4).

Sugeruje się występowanie *in vivo* form nieaktywnej i aktywnej enzymu, przy czym aktywacja odbywa się przypuszczalnie pod wpływem substratu (46). Wykazano również, że produkty reakcji, IMP i amoniak, hamują aktywność preparatu z mięśni królika, hamowanie przez IMP ma charakter kompetycyjny w stosunku do AMP, a hamowanie przez amoniak ma charakter mieszany — kompetycyjny i niekompetycyjny (45).

Efektorami allosterycznymi dezaminazy są jony potasu, ATP i ADP (10, 21, 23, 47—49), fosforan nieorganiczny (21, 53), GTP (23, 49, 54, 55), fosfokreatyna (23), oraz izo-AMP (5). Aktywatorami są także kationy innych metali jednowartościowych (10, 23, 36, 48, 50—52). Z punktu widzenia fizjologicznych mechanizmów regulacji aktywności dezaminazy interesujące jest spostrzeżenie, że jej aktywność hamuje alanina (64, 65).

Przykładowe dane z piśmiennictwa ilustrujące aktywację dezaminazy AMP przez kationy jednowartościowe przedstawiono w Tabeli 5, uszeregowując je według malejącego wpływu na aktywność enzymatyczną.

Najbardziej efektywnym w aktywowaniu enzymu mięśniowego jest jon potasowy, podczas gdy jony litu najsukuteczniej aktywują preparaty dezaminazy izolowanej z tkanek pozamięśniowych.

Zjawiska aktywacji i inhibicji dezaminazy AMP przez nukleotydy purynowe i pirymidynowe ilustruje Tabela 6.

Niektóre z nich są efektorami allosterycznymi enzymu i rozważany jest ich udział w regulacji enzymu *in vivo*. ATP w stężeniach milimolowych aktywuje enzym z mięśni szczura, natomiast w stężeniach mikromolowych hamuje szybkość reakcji, przy czym efekt ten zależy od stężenia obecnego w środowisku reakcji KCl. W środowiskach o niższym stężeniu KCl hamujący efekt ATP jest większy (23, 47, 55, 62). GTP z kolei silnie hamujący aktywność enzymu z oczyszczonych preparatów dezaminazy AMP, aktywuje enzym badany w nieoczyszczonych ekstraktach (49). Badając szybkość reakcji mięśniowych dezaminaz AMP w obecności dwóch podstawowych aktywatorów enzymu: ATP i KCl stwierdzono, że w optymalnym stężeniu jednego z nich dodanie do środowiska inkubacji drugiego nie ma wpływu na szybkość reakcji. Odmiennie zachowuje się dezaminaza oczyszczona z serca świni. W obecności optymalnego stężenia chlorku potasu zależność szybkości reakcji katalizowanej przez ten enzym

Tabela 4

Wartości stałej Michaelisa  $K_m$  preparatów dezaminazy AMP z różnych źródeł.

Źródło enzymu	$K_m$ (AMP $M \times 10^{-3}$ )	Środowisko	Piśmiennictwo
mięśnie	8,0	50 mM imidazol/HCl pH 6,5, KCl 150 mM	20
	4,0	j.w.	20
	2,4	j.w.	20
	0,65	0,1 M bursztynian/KOH pH 6,5, KCl 150 mM	13
	3,0	20 mM bufor fosforanowy pH 7,0, NaCl 50 mM	14
serce	1,0	50 mM imidazol/HCl pH 6,5, KCl 150 mM	10
	1,0	20 mM bufor fosforanowy pH 7,0, NaCl 50 mM, ATP 5 mM	14
	7,5	j.w.	14
	9,0	j.w.	14
nerka	7,0	j.w.	14
	7,0	j.w.	14
	6,0	j.w.	14
wątroba			
śledziona			
płuca			

Tabela 5

Wpływ kationów jednowartościowych na aktywność dezaminazy AMP.

Źródło enzymu	Aktywacja	Stężenie AMP	Uwagi	Pismienictwo
Mięśnie { żaby kury królika szczura człowieka }	$K > Na > NH_4 > Li > Rb > Cs$	70 $\mu$ M	$(CH_3)_4N$ bez wpływu $K_a$ dla potasu 12,5 mM $Cs$ bez wpływu, $K_a$ dla potasu 20 mM	20
	$K > Li > NH_4 > Na > Rb$	70 $\mu$ M		20
	$K = Na > Li > Rb > NH_4 > Cs > (CH_3)_4N$	50 $\mu$ M	$K_a$ dla potasu 0,2 mM	13,48
	$K \geq Na > Li > NH_4 > (CH_3)_4N$ $K = Na > NH_4 > Li$	100 $\mu$ M 70 $\mu$ M	$K_a$ dla potasu 6 mM $Cs$ i $(CH_3)_4N$ bez wpływu, $K_a$ dla potasu 40 mM	23,55 10,53
Wątroba Mózg	$Li > Na \geq K$ $Li > Na > K > Rb > NH_4 > Cs > (CH_3)_4N$	8 mM		57
Łożysko Nasiona grochu	$Li > Na > K > Cs$ $NH_4 > Li > Na$	5 mM 10 mM 4 mM		56 22 17



Tabela 6

## Wpływ nukleotydów na dezaminazę AMP.

Źródło enzymu	Aktywatory	Inhibitory	Písmiennictwo
Mięśnie	ATP	GTP, 3-izo-AMP, 3'AMP, 3'5'-AMP	5
	ATP	metyleno-ADP, N <sup>1</sup> -metylo-AMP	23
Wątroba	ATP, ADP	ATP, GTP, ITP, UTP, CTP	10
	ATP, ADP, ITP, CTP, GTP	3'-AMP, IMP, GMP, GTP, CMP	57
Serce	ATP	2'-AMP, 3'-AMP, GDP	58
Mózg	dATP, ITP, CTP, UTP	GTP	54, 59
Erytrocyty	ATP, ADP	2'-AMP, 3'-AMP, IMP	21
Limfocyty	ATP, ADP		30

*a* 2'-AMP i adenozylna bez wpływu na aktywność enzymu,

*b* ITP bez wpływu na aktywność enzymu,

*c* K<sub>i</sub> dla GTP  $1,0 \times 10^{-5}$  M.

*d* GTP bez wpływu na aktywność enzymu, K<sub>i</sub> dla 3'-AMP 3,2 mM,

*e* GTP bez wpływu na aktywność enzymu.

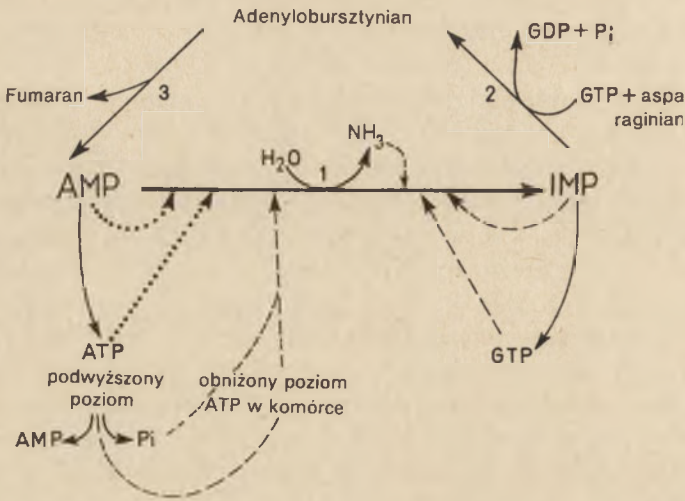
od stężenia substratu miała przebieg sigmoidalny i dopiero dodanie ATP powodowało dalszy wzrost aktywności enzymu i hiperbolizację krzywej Michaelisa (63). W cząsteczce dezaminazy AMP z mięśni królika zidentyfikowano co najmniej 4 miejsca wiążące specyficznie ATP i dwa miejsca specyficzne wobec GTP (66). Dezaminaza z mięśni szczura wiąże 6—7 cząsteczek 5'fosforanu pirydoksalu na jedną cząsteczkę enzymu. Tak zmodyfikowany preparat, o aktywności wynoszącej 30% w porównaniu z preparatem natywnym, odznacza się niezmienną szybkością maksymalną reakcji i czterokrotnie mniejszym powinowactwem do substratu, oraz jest całkowicie niewrażliwy na działanie ATP i GTP. ATP i GTP chroniły dezaminazę AMP przed inhibicją wywołaną przyłączeniem fosforanu pirydoksalu, przy czym efekt ten był specyficzny i nie wykazywały go inne inhibitory allosteryczne dezaminazy (62). Wiązanie fosforanu pirydoksalu przez cząsteczkę dezaminazy następowało za pośrednictwem amidowych grup lizyny w, lub w pobliżu, miejsc wiążących ATP i GTP. W miejscu wiążącym GTP znajdują się także grupy SH cysteiny podlegające działaniu związków blokujących. Ich zablokowanie przez kwas *p*-rtęciobenzoesowy prowadziło do wybiórczej niewrażliwości enzymu na działanie GTP (66, 67). Bardziej szczegółowe rozważania na temat związku regulacji dezaminazy AMP przez nukleotydy z jej udziałem w regulacji przemian pośrednich znajdzie czytelnik w dwóch pracach przeglądowych poświęconych metabolizmowi związków adeninowych w sercu (60) i cyklowi nukleotydów purynowych (61).

Na podstawie wyżej podanych informacji na temat regulacji aktywności dezaminazy AMP można sobie wyobrazić następujący jej schemat (Rycina 1).

Dezaminaza jako jeden z trzech enzymów uczestniczy w tzw. cyklu nukleotydów purynowych (68—71). Jon potasowy w stężeniu 100—150 mM, zbliżonym do fizjologicznych stężeń w komórkach, stabilizuje cząsteczkę dezaminazy AMP w takiej konformacji, w której jest ona zdolna do przyłączania fizjologicznych ligandów — AMP, ATP, GTP i  $P_i$ . Enzym jest aktywowany przez substrat i hamowany przez produkty reakcji. GTP hamuje enzym zwrotnie jako produkt cyklu przemian, na którego drodze znajduje się m.in. dezaminaza AMP. Hamowanie przez GTP reakcji dezaminazy może mieć również znaczenie w uniemożliwianiu przebiegu cyklu nukleotydów purynowych jako cyklu daremnego, bowiem GTP jest ko-substratem reakcji syntetazy adenylobursztynianowej, enzymu współuczestniczącego w reaminacji IMP do AMP (Rycina 1).

ATP przyspiesza dezaminację AMP zapobiegając w ten sposób obniżeniu wartości tzw. ładunku energetycznego zawartego w puli nukleotydów adeninowych poprzez przesunięcie równowagi w tej puli w kierunku ATP i ADP, co jak wiadomo przyspiesza szybkość przemian anabolicznych. Z kolei zużycie ATP w przemianach anabolicznych prowadzi do uwolnienia znacznych ilości fosforanu nieorganicznego, hamującego dezaminazę

AMP, oraz do obniżenia bezwzględnej ilości ATP w komórce; przy niskich zaś stężeniach ATP hamując dezaminazę wespół z fosforanem zapobiega nadmiernemu obniżeniu całkowitej puli nukleotydów adeninowych w komórce. Działanie fosforanu nieorganicznego i ATP w niskich stężeniach modyfikuje także aktywację dezaminazy przez zwiększone stężenia AMP, który pojawia się jako produkt reakcji aktywacji aminokwasów i kwasów



**Ryc. 1.** — Cykl nukleotydów purynowych Lowensteina oraz regulacja aktywności dezaminazy AMP.

1. Dezaminaza AMP (E.C. 3.5.4.6), 2. Ligaza IMP: L-asparaginin (GDP), (syntetaza adenylobursztynianowa), (E.C. 6.3.4.4), 3. AMP-liaza adenylobursztynianowa (liaza adenylobursztynianowa), (E.C. 4.3.2.2).

Linia przerywaną zaznaczono hamowanie dezaminazy AMP, linią kropkowaną jej aktywowanie.

tłuszczowych. W świetle powyższych rozważań bardzo prawdopodobny wydaje się wniosek, że głównym czynnikiem regulującym aktywność dezaminazy AMP jest stosunek stężeń nukleotydów adeninowych, a nie bezwzględne stężenia poszczególnych nukleotydów w komórce. Można więc wnioskować, że w konsekwencji istotne znaczenie ma wielkość ładunku energetycznego zawartego w puli nukleotydów adeninowych. Wykazano, że w fizjologicznym zakresie wartości tego ładunku: 0,75—0,95 aktywność dezaminazy spada liniowo wraz ze wzrostem jego wartości (71a).

Niektóre pochodne glikolizy m.in. glukozy-6-fosforan, fruktozy-1,6- $P_2$ , kwasy 2-P-glicerynowy, 3-P-glicerynowy, 2,3- $P_2$ -glicerynowy i fosfoenolopirogronowy hamują aktywność dezaminazy izolowanej z różnych tkanek zwierzęcych. Obserwowane oscylacje stężeń metabolitów glikolizy i ich związków z regulacją aktywności dezaminazy AMP, a poprzez nią aktywności cyklu nukleotydów purynowych omówione są obszernie w innej pracy przeglądowej (61).



#### IV. Metale dwuwartościowe, a aktywność dezaminazy AMP

Hamowanie dezaminazy AMP przez jony fluorkowe nasuwało podejrzenie, że funkcje katalityczne enzymu wymagają obecności jonów metali dwuwartościowych (10, 52, 53, 72, 73, 77). Inaktywacja dezaminazy AMP z mięśni królika przez szereg typowych chelatorów takich jak o-fenantrolina, EDTA, merkaptoetanol, zależna od obecności efektorów dezaminazy KCL i ADP, utwierdziła to przekonanie (5, 78). Hamujący wpływ niektórych kwasów karboksylowych zależny od obecności KCL przypisywano także słabym właściwościom chelatującym tych kwasów. Metodą spektrofotometrii atomowo-absorpcyjnej wykazano, że enzym z mięśni królika zawiera 2—3 gramoatomów cynku na mol jednorodnego białka, a także pewne ilości wapnia, magnezu i żelaza. Apodezaminaza AMP z mięśni królika uzyskana w wyniku dializy enzymu wobec EDTA dawała się reaktywować przez dodanie jonów cynku, kobaltu, manganu i żelaza. Analogiczne doświadczenia wykonano z enzymem izolowanym z mięśni szczura, człowieka i kury, oraz z łożyska ludzkiego (Tabela 7).

Tabela 7

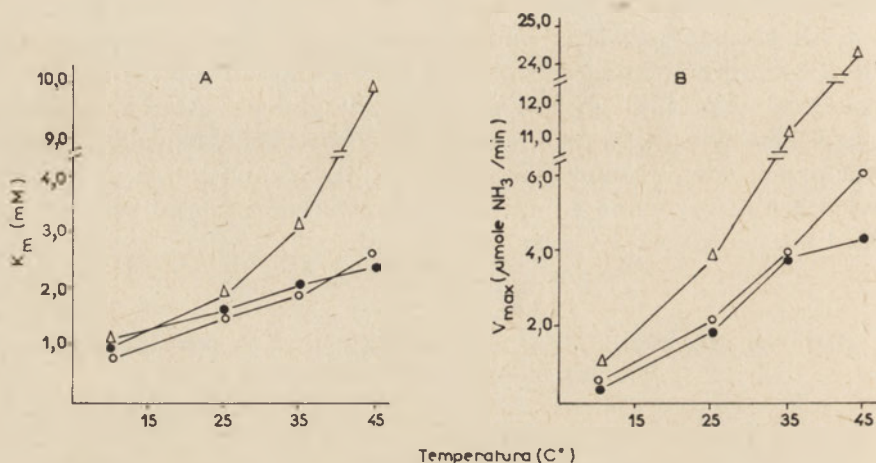
Aktywność dezaminazy AMP w obecności jonów metali dwuwartościowych po uprzedniej dializie enzymów wobec EDTA.

Jony $Me^{2+}$	Źródło enzymu					
	Mięśnie szkieletowe					Łożysko człowieka
	karpia	kury	królika	szczura	człowieka	
$Zn^{2+}$	91	91	80	98	80	100
$Co^{2+}$	74	47	70	25	72	55
$Mn^{2+}$	81	44	40	31	69	43
$Cu^{2+}$	55	56	1	7	69	20
$Fe^{2+}$	18	74	60	19	58	0
$Mg^{2+}$	80	60	1	1	56	0
$Ni^{2+}$	46	28	1	1	56	—
$Ca^{2+}$	67	40	—	1	52	0
$Cd^{2+}$	17	28	1	1	30	11

Enzymy dializowano wobec 1 mM EDTA uzyskując całkowitą utratę aktywności. Dodanie do środowiska pomiaru jonów  $Me^{2+}$  bezpośrednio przed pomiarem aktywności przywracało w różnym stopniu aktywność enzymatyczną. Liczby są wartościami względnymi informującymi o aktywności enzymu w obecności danego jonu jeżeli za 100 przyjmie się aktywność tego samego preparatu enzymatycznego w stanie natywnym, nie poddawanego dializie wobec EDTA. Stężenia jonów zastosowane w poszczególnych doświadczeniach były następujące: w przypadku enzymu z mięśni karpia (79), kury (79), królika (5), szczura (80) i człowieka (79)—10  $\mu$ M, w przypadku enzymu z łożyska ludzkiego (22)—50  $\mu$ M.

W badaniach enzymu z mięśni człowieka stwierdziliśmy równoległość wiązania radioizotopu cynku, lub żelaza przez apoenzym i przywracania aktywności enzymatycznej. Zastosowanie spektrofotometru atomowo-absorpcyjnego pozwoliło wykazać różnice w zawartości cynku w preparatach

dezaminazy inaktywowanej przez chelatory w porównaniu z preparatem natywnym i rekonstruowanym przez cynk (79). Zakładając, że masa cząsteczkowa dezaminazy ludzkiej wynosi 280 000 wyliczyliśmy, że w wyniku dializy wobec EDTA enzym ludzki traci jedynie 1 gramoatom cynku na mol, podczas gdy drugi atom pozostaje nadal związany z białkiem i jest niedostępny dla chelatora. Jest to zjawisko opisywane również w przypadku innych enzymów zawierających cynk. Dla przykładu dehydrogenaza alkoholowa z wątroby konia zawiera 2 gramatomy cynku na podjednostkę,



**Ryc. 2.** Wpływ temperatury na stałą Michaelisa ( $K_m$ ) i szybkość maksymalną reakcji ( $V_{max}$ ) katalizowanej przez dezaminazę AMP: natywną ●—● rekonstruowaną przez cynk ○—○, oraz rekonstruowaną przez kadm △—△.

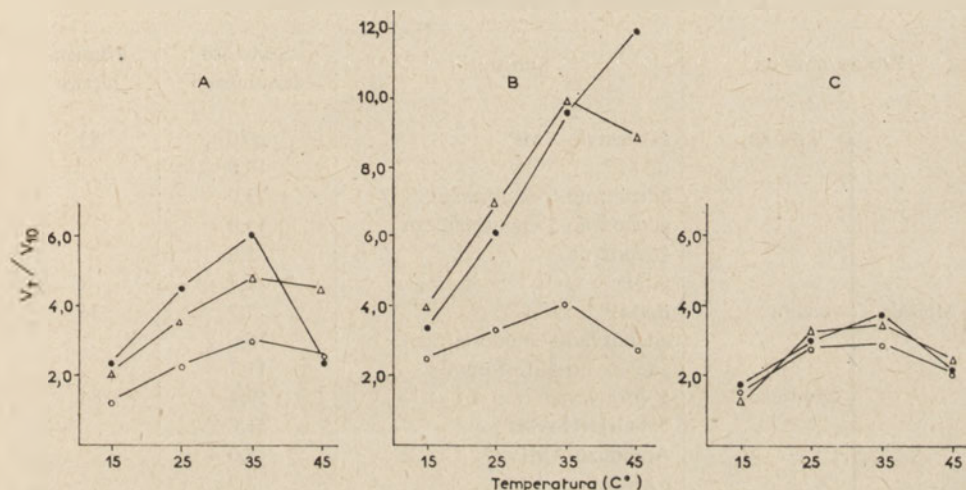
Prędkość początkową reakcji wyrażano w umolach  $\text{NH}_3$  na minutę i obliczano z ilości uwalnianego amoniaku przy następujących stężeniach substratu: 1 mM, 2 mM, 4 mM, 6 mM i 10 mM.  $K_m$  i  $V_{max}$  obliczano graficznie z wykresu Lineweavera-Burka. Każdy z punktów odpowiada wartości średniej z 3–6 doświadczeń wykonanych w dwóch próbach równoległych. Średni błąd średniej arytmetycznej nie przekracza 15% (84).

z których jeden, dostępny chelатовaniu, jest niezbędny dla aktywności katalitycznej, podobnie jak to ma miejsce w przypadku dezaminazy, drugi zaś, nie dający się usunąć z cząsteczki w tych samych warunkach, ma związek przede wszystkim ze stabilizacją struktury białka umożliwiając między innymi jego reaktywację przez dodanie jonów metali dwuwartościowych (81).

Odrębne zagadnienie stanowi wpływ kationów metali dwuwartościowych na aktywność natywnej dezaminazy AMP. Magnez i mangan aktywują dezaminazę AMP z mózgu cielęcia (82), wapń aktywuje niespecyficzną dezaminazę nukleotydów adenylowych z glonów (16). Wapń, magnez i mangan w stężeniach 30–60 mM hamują dezaminazę AMP z mięśni człowieka (79), być może polega to na blokowaniu wolnych grup sulfhydrylowych w cząsteczce enzymu.

Pomyślne wyniki doświadczeń, w których podjęto próbę wymiany cyn-

ku na inny metal dwuwartościowy pozwoliły na porównanie niektórych właściwości tak zmienionych preparatów. Preparaty dezaminazy z mięśni królika zawierające w swojej cząsteczce cynk, kobalt lub mangan wykazują niewielkie jedynie różnice w wartościach stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej reakcji (78). Podobne obserwacje poczyniono w naszej pracowni badając natywną i rekonstruowaną przez cynk (Zn-enzym), żelazo (Fe-enzym), lub kadm (Cd-enzym) dezaminazę AMP z mięśni człowieka (79). Preparat dezaminazy ludzkiej rekonstruowany przez jony kadmu odznaczał się większą opornością na denaturację cieplną (79), a także większą wrażliwością reakcji na regulacyjny wpływ temperatury. Zmiany szybkości maksymalnej reakcji i stałej Michaelisa wraz ze zmianą temperatury środowiska były znacznie większe w przypadku enzymu rekonstruowanego kadmem, niż w przypadku enzymu natywnego i rekonstruowanego przez cynk (Rycina 2).



Ryc. 3. Wpływ temperatury na stosunek szybkości początkowej reakcji w danej temperaturze ( $v_i$ ) do szybkości początkowej reakcji w temperaturze  $10^\circ\text{C}$  ( $v_{i0}$ ).

A — natywna dezaminaza AMP, B — dezaminaza AMP rekonstruowana cynkiem, C — dezaminaza AMP rekonstruowana kadmem, w obecności chlorku potasu w stężeniach: 8 mM ●—●, 25 mM △—△ i 150 mM ○—○. Każdy z punktów odpowiada wartości średniej z 3–5 doświadczeń w dwóch próbach równoległych. Średni błąd średniej arytmetycznej nie przekracza 15% (84).

W badaniach szybkości początkowej reakcji w różnych temperaturach i w różnych stężeniach KCL wykazano, że enzym rekonstruowany kadmem jest praktycznie niewrażliwy na zmiany stężenia KCL w tych warunkach (Rycina 3).

Względna łatwość uzyskiwania preparatów dezaminazy z wbudowanymi do cząsteczki jonami innych niż cynk metali dwuwartościowych stwarza możliwość wykorzystania tak uzyskanych aktywnych form enzymu do badań nad udziałem metali w czynnościach katalitycznych tego enzymu.



## V. Specyficzność substratowa i mechanizm reakcji dezaminazy AMP

Badania specyficzności substratowej dezaminazy AMP mają na celu po pierwsze ustalenie sposobu wiązania się cząsteczki substratu z centrum aktywnym enzymu, a następnie poznanie mechanizmu dezaminacji AMP. Najbardziej prawdopodobny jest prosty mechanizm hydrolitycznego od-szczepienia amoniaku. Przemawiają za nim między innymi badania deza-minacji N<sup>6</sup>-metylo-AMP przez preparat dezaminazy z mięśni królika. Jako produkty dezaminacji tego substratu zidentyfikowano bowiem IMP i me-tyloaminę (5, 83). Szybkość dezaminacji pochodnych o zmodyfikowanych: zasadzie, reszcie cukrowej, bądź podstawniku 5' do pewnego stopnia su-gerować może sposób wiązania się substratu z centrum aktywnym enzymu (Tabela 8).

Tabela 8

Specyficzność substratowa dezaminazy AMP.

Źródło enzymu		Substrat	Szybkość dezaminacji	Piśmien-nictwo
Mięśnie	królika	N <sup>6</sup> -metylo-AMP	20,0	83
		dAMP	18,0	
		adenozyno-5'-fosforamid	73,0	
		adenozyno-5'-monosiarczan	13,0	
		adenozyna	1,0	
		ADP	1,0	
	szczura	dAMP	7,7	33
		adenozyno-5'-monosiarczan	15,6	
		adenozyno-5'-fosforamid	11,7	
	człowieka	5'-formycyna	59,4	84
		N <sup>6</sup> -OHNH-AMP	51,8	
		Arabinizo-AMP	5,0	
dAMP		3,9		
		NH <sub>2</sub> -AMP	1,3	

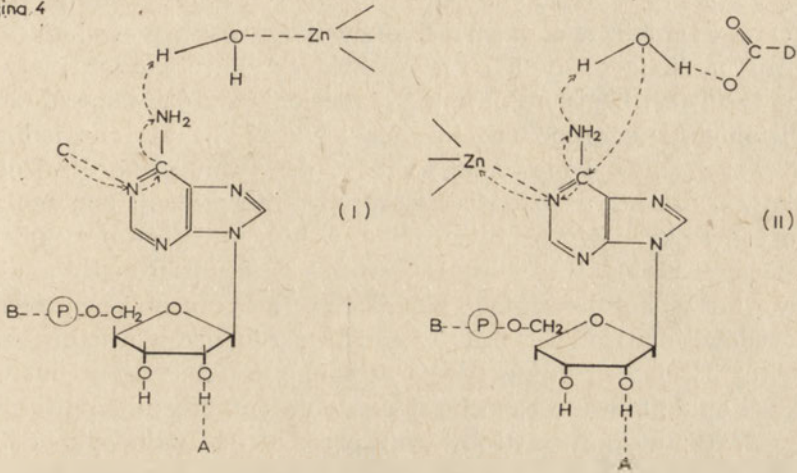
Liczby wskazują względną szybkość dezaminacji poszczególnych substratów, przy czym szybkość dezaminacji 5'AMP w każdym przypadku przyjęto za 100.

Najbardziej istotny wpływ na aktywność dezaminazy wywiera podsta-wienie substratu w pozycjach 2, 2' oraz 5'. Łatwość dezaminacji 5'-for-mycyny wskazuje, że pierścień imidazolowy puryny nie odgrywa istotnej roli w wiązaniu substratu przez enzym i w przebiegu katalizy. Propono-wany mechanizm dezaminacji AMP zakłada dwie możliwości (Rycina 4).

W pierwszej z nich (Model I) przyjmuje się, że jon cynku działa jako kwas Levisa kompleksując cząsteczkę wody (85), co warunkuje wzrost elektrofilowości atomu wodoru w cząsteczce wody i czyni go bardziej po-datnym na nukleofilowy atak grupy NH<sub>2</sub>. Warunkiem takiej sekwencji wydarzeń jest nukleofilowość ligandu C, elementu centrum aktywnego

enzymu uczestniczącego w wiązaniu substratu. Model II zakłada, że cząsteczka wody wiązana jest przez nukleofilowy ligand D stanowiący element struktury centrum aktywnego enzymu, atom cynku zaś uczestniczy bezpośrednio w wiązaniu substratu zachowując się jak elektrofilowy kwas Levisa w stosunku do atomu azotu N<sup>2</sup> przyczyniając się do osłabienia wiązania C-N i umożliwiając nukleofilowy atak cząsteczki wody na to wiązanie. Oba zaproponowane przez mnie mechanizmy mają charakter spe-

Rycina 4



**Ryc. 4.** Proponowane mechanizmy hydrolitycznego odszczepienia cząsteczki amoniaku w reakcji katalizowanej przez dezaminazę AMP.

A, B, C, D — grupy funkcyjne w centrum katalitycznym enzymu uczestniczące w wiązaniu cząstek substratu i wody.

kulacyjny. Dla udowodnienia któregośkolwiek z nich należałoby między innymi stwierdzić: jakie konkretnie ligandy uczestniczą w wiązaniu cynku i substratu w centrum aktywnym dezaminazy, w jaki sposób wiązana jest w nim cząsteczka wody, a także prześledzić przebieg reakcji z zastosowaniem spektralnych metod badania szybkich procesów enzymatycznych.

## VI. Uwagi końcowe

Pomimo wieloletnich badań nie stwierdzono bezpośredniego związku między skurczem mięśnia, a reakcją katalizowaną przez dezaminazę. Wykluczony został również związek dezaminazy AMP ze stabilizacją struktury miozyny, czy też z reakcją miozyny z aktyną (85a—87). Jednakże związek dezaminazy AMP z metabolizmem mięśnia szkieletowego jest niewątpliwy. Wiadomo, że aktywność tego enzymu wzrasta w mięśniach w wyniku długotrwałego drażnienia włókien mięśniowych prądem elektrycznym (88), są też dane wskazujące, że w wyniku treningu obniżeniu

ulegała aktywność dezaminazy AMP we włóknach czerwonych mięśni szczura równoległe z obniżeniem aktywności fosfofruktokinazy, we włóknach zaś białych mięśni szczura aktywność obu enzymów pozostawała w tych warunkach bez zmian (91). Skądinąd wiadomo, że aktywność dezaminazy AMP jest niższa w mięśniach o przewodzie włókien białych, aniżeli w mięśniach czerwonych (12). Ponadto aktywność enzymu malała w mięśniach myszy dystroficznych (92, 93), w mięśniach człowieka ulegających dystrofii (94), oraz w mięśniach człowieka w efekcie paraliżu hipokaliemicznego (95). Wiadomo również, że aktywność dezaminazy AMP wzrasta w wątrobie w stanach przednowotworowych wywołanych syntetycznymi karcinogenami (90) i w niektórych nowotworach pierwotnych tego narządu (89). Opisane powyżej doniesienia w różny sposób związane są z fizjologią i patofizjologią mięśnia i wątroby, mają one jednak charakter przyczynków i nie mogą posłużyć do wysnucia bardziej ogólnych wniosków. Dość liczne są natomiast próby interpretacji znaczenia cyklu nukleotydów purynowych Lowensteina, w którym uczestniczy między innymi dezaminaza AMP (Rycina 1). Podkreśla się udział wątrobowej dezaminazy AMP w stabilizacji tzw. ładunku energetycznego zawartego w puli nukleotydów adenylowych oraz w zapobieganiu nadmiernemu obniżeniu całkowitej ilości tych nukleotydów w komórce (96). Pogląd ten wsparty jest przez opublikowane ostatnio doniesienie dotyczące hamowania dezaminazy AMP z mózgu i wątroby wołu przez oleilo-, palmitylo- i stearylo-CoA. Efekt ten może być wyrazem zapobiegania obniżeniu ładunku energetycznego i puli nukleotydów adenylowych w czasie zużycia acyli kwasowych jako substratów oddechowych (97). Tak więc dezaminaza AMP może być uznana za jeden z głównych enzymów regulujących poziom nukleotydów adenylowych w komórce.

Bezpośrednim donorem grupy aminowej AMP podczas jego syntezy w cyklu Lowensteina jest asparaginian, jednakże dzięki transaminacji innych aminokwasów ze szczawiooctanem, ich grupy aminowe mogą być za pośrednictwem asparaginianu prekursorami grupy aminowej AMP. Z kolei dezaminaza AMP uwalnia amoniak z AMP. Ponieważ aktywność dehydrogenazy glutaminianowej w mięśniu szkieletowym jest bardzo niska przypuszcza się, że w tkance tej uwalnianie amoniaku z aminokwasów przebiega z udziałem cyklu nukleotydów purynowych (68—70). Jednocześnie cykl ten można brać pod uwagę jako jedno ze źródeł amoniaku do wątrobowej syntezy mocznika (98) i w amoniogenezie nerkowej, zwłaszcza w stanach kwasicy i hipopotasemii (99, 100). Bardziej szczegółowe rozważania na temat hipotez związanych z cyklem nukleotydów purynowych znajdzie czytelnik w odrębnej pracy przeglądowej (61).

Dalszych badań wymaga niewątpliwie kwestia zmienności form dezaminazy AMP w rozwoju ontogenetycznym i filogenetycznym zwierząt. Mogą one wzbogacić naszą wiedzę o, wciąż w niewielkim tylko stopniu poznanej, ewolucji enzymów. Obok wspomnianych wyżej „metabolicznych”



aspektów związanych z dezaminazą AMP warto podkreślić, że enzym ten jest bardzo dogodnym w podstawowych badaniach enzymologicznych. Względna łatwość uzyskiwania jednorodnych preparatów dezaminazy, a także jej trwałość pozwalają na zastosowanie jej do badań nad rolą cynku w katalizie, a także w badaniach regulacyjnego wpływu temperatury na kinetykę reakcji enzymatycznej. Możliwość uzyskania aktywnych i trwałych form enzymu z wbudowanym do cząsteczki innym niż cynk metalem stanowić może wstęp do badań nad metabolicznymi konsekwencjami takich „wymian”. Powyższe uzasadnia coraz większe zainteresowanie jakie budzi dezaminaza AMP w szeregu pracowni na świecie, czego dowodem jest między innymi wciąż rosnąca liczba publikacji na jej temat.

Artykuł otrzymano 12.3.1977; po rewizji autorskiej przyjęto 13.12.1977.

## PIŚMIENNICTWO

1. Schmidt G., (1928), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **179**, 243—248
2. Schmidt G., (1969), W *Biological Phosphorylations*, red. Kalckar H. M., str. 45-53, Prentice Hall Inc., New Jersey
3. Purzycka J., (1964), *Post. Biochem.*, **10**, 359—367
4. Umiasowski J., (1964), *Post. Biochem.*, **10**, 445—461
5. Zielke C. L., (1970), Rozprawa doktorska, Michigan State University, USA
6. Zielke C. L., Suelter C. H., (1971), w *The Enzymes*, red. Boyer P., t. 4, str. 47—78, Academic Press Inc., New York, London
7. Żydowo M., (1960) *Acta Biochim. Polon.*, **7**, 215—226.
8. Lee Y. P., (1960), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K., t. 4, str. 279—283, Academic Press Inc., New York, London
9. Żydowo M., (1965), *Post. Biochem.*, **11**, 15—23
10. Makarewicz W., Stankiewicz A., (1974), *Biochem. Med.*, **10**, 180—187
11. Park D. C., Pennington R. J., (1966), *Clinica Chimica Acta*, **13**, 694—700
12. Raggi A., Ronca-Testoni S., Ronca G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 619—622
13. Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 2502—2506
14. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., (1974), *FEBS Letters*, **44**, 63—66
15. Gibbs K. L., Reiss P. M., Ribnik L. R., Bishop S. H., (1976), *Amer. Zoologist*, **16**, 211
16. Su J. C., Li C. C., Ting C. C., (1966), *Biochemistry*, **5**, 536—540
17. Turner D. H., Turner J. F., (1961), *Biochem. J.*, **79**, 143—147
18. Yates M. G., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 299—302
19. Makarewicz W., Stankiewicz A., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 245—247
20. Stankiewicz A., (1977) w przygotowaniu do druku
21. Chun-Yet Lian, Harkness D. R., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 27—40
22. Makarewicz W., (1974), *Acta Biochim. Polon.*, **21**, 125—135
23. Raggi A., (1971), rozprawa doktorska, Scuola Normale Superiore, Pisa, Włochy
24. Bosman A., Chilson O. P., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1847—1852
25. Makarewicz W., Żydowo M., (1962), *Comp. Biochem. Physiol.*, **6**, 269—275

26. Ashman L. K., Atwell J. L., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 618—625
27. Boosman A., Sammons D., Chilson O. P., (1971), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **45**, 1025—1032
28. Wolfenden R., Tomozawa Y., Bamman B., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3965—3969
29. Coffee C. J., Kofke W. A., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6653—6658
30. Lucacchini A., Ronca-Testoni S., Borghini F., Ronca G., (1976), 10<sup>th</sup> Int. Cong. Biochem., Hamburg, Abstracts, 07-5-127, str. 398
31. Ogasawara N., Yoshino M., Kawamura Y., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **258**, 680—684.
32. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., Yoshino M., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 353—364
33. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 530—537
34. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 245—248
35. Raggi A., Bergamini C., Ronca G., (1975), *FEBS Letters*, **58**, 19—23
36. Żydowo M., Purzycka-Preis J., (1972), *Comp. Biochem. Physiol.*, **43 B**, 271—276
37. Żydowo M., Makarewicz W., Umiastowski J., (1965), *Acta Biochim. Polon.*, **12**, 319—325
38. Makarewicz W., (1965), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, **13**, 447—450
39. Makarewicz W., (1968), *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **485**, 535—542
40. Kaletha K., Żydowo M., (1971), *Int. J. Biochem.*, **2**, 20—26
41. Kaletha K., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 471—474
42. Kendrick-Jones J., Perry S. V., (1967), *Biochem. J.*, **103**, 207—214
43. Purzycka-Preis J., Wrzołkowa T., Pawlak-Byczkowska E., Żydowo M., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 885—887
44. Makarewicz W., Stankiewicz A., (1974), *Biochem. Med.*, **11**, 227—233
45. Melander W. R., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 90—94
46. Ellis K. J., Kuntz K., Sturterant J. M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6631—6637
47. Ronca-Testoni S., Raggi A., Ronca G., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 101—112.
48. Smiley K. L., Suelter C. H., (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1980—1981
49. Brady T. G., Costello J. F., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 455—460
50. Purzycka-Preis J., Żydowo M., (1969), *Acta Biochim. Polon.*, **16**, 235—242
51. Bishop S. H., Barnes L. B., (1971), *Comp. Biochem. Physiol.*, **40 B**, 407—422
52. Sammons D. W., Henry H., Chilson O. P., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2109—2113
53. Kaletha K., Stankiewicz A., Makarewicz W., Żydowo M., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 67—71
54. Setlow B., Lowenstein J. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 3409—3415
55. Ronca G., Raggi A., Ronca-Testoni S., (1972), *Italian J. Biochem.*, **21**, 305—321
56. Setlow B., Lowenstein J. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6216—6221
57. Smith L. D., Kizer D. E., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 415—424
58. Burger R., Lowenstein J. M., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 5281—5288

59. Setlow B., Burger R., Lowenstein J. M., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 1244—1245
60. Żydowo M., (1976), *Int. J. Biochem.*, **7**, 353—357
61. Makarewicz W., (1977), w przygotowaniu do druku
62. Ronca-Testoni S., Ronca G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7723—7728
63. Preis J., Żydowo M., Prus E., dane nieopublikowane
64. Kaletha K., Stankiewicz A., (1976), *Biochem. Med.*, **15**, 161—168
65. Kaletha K., Składanowski A. C., Żydowo M., (1976), *Acta Biochim. Polon.*, **23**, 145—150
66. Tomozawa Y., Wolfenden R., (1970), *Biochemistry* **9**, 3400—3404
67. O'Driscoll D., Ross C. A., (1975), *Biochem. Soc. Transactions* **3**, 1257—1260
68. Lowenstein J. M., (1972), *Physiol. Rev.*, **52**, 382—414
69. Lowenstein J. M., Tornheim K., (1971), *Science*, **171**, 397—400
70. Tornheim K., Lowenstein J. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 162—169
71. Schultz V., Lowenstein J. M., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 485—492
- 71a. Coffee C. J., Solano C., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1606—1612
72. Makarewicz W., (1969), *Comp. Biochem. Physiol.*, **29**, 1—26
73. Lee Y. P., Wang M. H., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2260—2265
74. Raggi A., Ranieri M., Ronca G., Rossi C. A., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 102—113
75. Raggi A., Bergamini C., Ronca G., (1975), *Biochem. J.*, **145**, 145—151
76. Lee Y. P., (1957), *J. Biol. Chem.*, **227**, 987—992
77. Lee Y. P., (1957), *J. Biol. Chem.*, **227**, 999—1007
78. Zielke C. L., Suelter C. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2179—2186
79. Stankiewicz A., Makarewicz W., (1975), *Biochem. Med.*, **13**, 197—212
80. Raggi A., Ranieri M., Taponeco G., Ronca-Testoni S., Ronca G., (1970), *FEBS Letters*, **10**, 101—104
81. Sytkowski A. J., Vallee B. L., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 344—348
82. Setlow B., Lowenstein J. M., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 607—615
83. Zielke C. L., Suelter C. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1313—1317
84. Stankiewicz A., (1976) Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Gdańsku
85. Mildvan A. S., (1970), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., t. 2, str. 445—536 Academic Press Inc., New York, London
- 85a. Żydowo M., Wrzołkowa T., Byczkowski J., (1972), w *Structure and Function of Normal and Diseased Muscle and Peripheral Nerve*, wyd. Hausmanowa-Petrusewicz I., Jędrzejowska H., PWN, 75—78
86. Byrnes E. W., Suelter C. H., (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **20**, 422—426
87. Harris M., Suelter C. H., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **133**, 393—397
88. Moldoveanu N., (1965), *Rev. Roum. Biochem.*, **2**, 327—335
89. Kizer D. E., Cox B., Lorig C. A., De Estrugo S. F., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 3048—3052
90. Kizer D. E., Howell B. A., Shirley B. C., Clouse J. A., Cox B., (1966), *Cancer Res.*, **26 A**, 822—826
91. Winder W. W., Terjung R. L., Baldwin K. M., Holloszy J. O., (1974), *Am. J. Physiol.*, **227**, 1411—1414
92. Montgomery A., Park D. C., Pennington R. J., (1974), *Comp. Biochem. Physiol.*, **49 B**, 387—392
93. Pennington R. J., (1961), *Nature*, **192**, 884—885
94. Pennington R. J., (1962), *Proc. Ass. Clin. Biochem.*, **2**, 17—18



95. Engel H. G., Potter C. S., Rosevear J. W., (1964), *Nature*, **202**, 670
96. Chapman A. G., Atkinson D. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 8309—8312
97. Yoshino M., Miyajima E., Tsushima K., (1976), *FEBS Letters.*, **72**, 143—146
98. Moss K. M., McGivan J. D., (1975), *Biochem. J.*, **150**, 275—283
99. Bogusky R. T., Lowenstein J. M., Lowenstein L. M., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 326—335
100. Żydowo M., Purzycka J., Żelewski L., (1962), *Acta Biochim. Polon.* **9**, 117—123

## Z ŻYCIA POLSKIEGO TOWARZYSTWA BIOCHEMICZNEGO

### Sprawozdanie Komitetu Naukowo-Organizacyjnego z przebiegu XV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego

XV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbywał się w dniach 22—24 września 1977 roku w Instytucie Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku. Powołanym przez władze Oddziału Gdańskiego PTBioch. Komitetem Naukowo-Organizacyjnym Zjazdu kierował prof. dr Leon Żelewski.

Uroczyste otwarcie Zjazdu połączono z wmurowaniem tablicy pamiątkowej poświęconej nieżyjącemu prof. dr Włodzimierzowi Mozołowskiemu — honorowemu członkowi PTBioch., którego imię nosić będzie oddana do użytku w dniu otwarcia Zjazdu nowa sala wykładowa Instytutu Biologii Medycznej Akademii Medycznej w Gdańsku. Prof. dr Tadeusz Chojnacki — Z-ca Prezesa Zarządu Głównego PTBioch. ogłosił wyniki konkursów na najlepszą pracę eksperymentalną, przeglądową oraz prace wykonane przez młodych biochemików. Wykład inauguracyjny pt. „Rozwój poglądów na regulacje metaboliczne” wygłosiła doc. dr Janina Kwiatkowska.

W obradach Zjazdu wzięły udział łącznie 473 osoby, w tym 266 członków PTBioch.

Tematyka naukowa koncentrowała się wokół dwóch zagadnień wiodących, jakimi były budowa i przemiany steroidów i poliprenoli oraz swoistość metaboliczna tkanek. W ramach Zjazdu odbyły się następujące sympozja:

- Sympozjum „Steroidy i Poliprenole” — organizator prof. dr Leon Żelewski (10 referatów oraz 20 komunikatów),
- Sympozjum „Swoistość metaboliczna tkanek — tkanka łączna” — organizator prof. dr Antoni Danczewicz (4 referaty oraz 10 komunikatów),
- Sympozjum „Swoistość metaboliczna tkanek — mięśnie” — organizator prof. dr Mariusz Żydowo (3 referaty oraz 13 komunikatów),
- Sympozjum „Swoistość metaboliczna tkanek — nerka” — organizator prof. dr Stefan Angielski (6 referatów oraz 14 komunikatów).

Zorganizowano też sesję doniesień referatowych, która stanowiła wspólne forum do publicznego przedstawienia i dyskusji prac doświadczalnych wykonanych przez młodych biochemików kandydujących do nagrody im. Włodzimierza Mozołowskiego. Wygłoszono łącznie 21 komunikatów. Pozostałe prace spełniające warunki regulaminu nagrody, których tematyka łączyła się z tematyką sympozjów, zaprezentowane były na sesjach sympozjalnych.

Podczas sesji doniesień plakatowych przedstawiono łącznie 190 doniesień. Łącznie w trakcie obrad Zjazdu przedstawiono 23 referaty sympozjalne oraz 305 komunikatów.

Streszczenia doniesień i referatów, w formie podanej przez autorów, zostały opublikowane drukiem w tomie streszczeń XV Zjazdu PTBioch., który otrzymał każdy uczestnik Zjazdu.

W trakcie trwania obrad odbyły się ekspozycje sprzętu laboratoryjnego oraz odczynników chemicznych prezentowane przez następujące firmy: LKB (Szwecja), Pharmacia (Szwecja), Eppendorf (RFN), Beckman (Austria), Zakład Konstrukcji Aparatury Naukowej PAN (Warszawa), Polskie Odczynniki Chemiczne (Gliwice),

Zjednoczenie Surowic i Szczepionek (Warszawa), Organon (Holandia) i Miles International (USA).

Uczestnikom Zjazdu zapewniono zakwaterowanie w hotelach I i II kategorii oraz w hotelu studenckim zgodnie z życzeniami (ponadto Komitet Organizacyjny dysponował również noclegami o niższym standardzie w Domach Akademickich). Chętnym zapewniono wyżywienie w restauracjach „Orbis” oraz tańsze obiady w restauracji „Domu Technika” w Gdańsku. W miejscu obrad zorganizowano zimny bufet. Zorganizowano dowóz uczestników Zjazdu autokarami z dalej położonych hoteli do miejsca obrad, oraz dowóz na obiady. W trakcie Zjazdu odbyło się także spotkanie towarzyskie w salach Domu Technika. Za pośrednictwem placówki Orbisu w Biurze Zjazdu chętni mogli zaopatrzyć się w bilety kolejowe i lotnicze oraz uczestniczyć w wycieczkach po Trójmieście i okolicach.

L. Żelewski

### **Sprawozdanie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za okres VIII kadencji (5.9.1974 — 23.9.1977) przedstawionego na Walnym Zebraniu w Gdańsku w dniu 23 września 1977 r.**

Towarzystwo nasze liczy obecnie 1078 członków zrzeszonych w 12 oddziałach terenowych (Białystok — 40, Gdańsk — 46, Kraków — 73, Lublin — 68, Łódź — 105, Olsztyn — 41, Poznań — 99, Szczecin — 45, Śląsk — 63, Toruń — 25, Warszawa — 370 i Wrocław — 97, oraz 6 członków zagranicznych). W stosunku do stanu sprzed 3 lat Polskie Towarzystwo Biochemiczne powiększyło się nieznacznie, bo tylko o 40 osób. Faktycznie jednak przyjęliśmy w poczet członków 126 osób. Jednocześnie Zarząd Główny zmuszony był, zgodnie ze statutem, skreślić z listy członków około 80 osób zalegających od kilku lat ze składkami.

W skład Polskiego Towarzystwa Biochemicznego wchodzi dwie sekcje, a mianowicie Sekcja Fotobiologii i powstała w czasie kadencji ustępującego Zarządu Sekcja Bioenergetyki. Sekcja Fotobiologii ma znaczną autonomię w ramach Towarzystwa i rzeczywiście jest organizacją „międzytowarzystwową”, ponieważ jej członkowie w liczbie około 80 rekrutują się nie tylko z naszego Towarzystwa lecz także z Polskiego Towarzystwa Biofizycznego i Polskiego Towarzystwa Botanicznego. Sekcja ta jest członkiem Międzynarodowego Stowarzyszenia Fotobiologii. Sekcja Bioenergetyki nie jest ściśle wyodrębniona. Jej rada składa się z czterech osób powołanych przez Zarząd Główny. Utworzenie tej Sekcji umożliwiło naszemu Towarzystwu przystąpienie do Międzynarodowej Grupy Bioenergetycznej.

Dochody Towarzystwa pochodzą z trzech źródeł: składki członkowskie przynoszą rocznie około 20.000 zł, wpisowe na zjazdy około 60 000 zł, wreszcie coroczna dotacja Polskiej Akademii Nauk — 200 000 zł. Po stronie wydatków głównymi pozycjami są: organizacja zjazdów Towarzystwa — około 120.000 zł rocznie, podróże (zwrot kosztów udziału w zajdach Towarzystwa, przejazdy prelegentów na zebrania naukowe oddziałów, zebrania Zarządu Głównego i komisji Towarzystwa itp.) — około 40 000 zł, uposażenia personelu biura Towarzystwa w Warszawie (3 osoby na niepełnych etatach) — 44 500 zł i nagrody naukowe — 32.000 zł rocznie.

Najważniejszą formą działalności Towarzystwa są coroczne zjazdy naukowe. Uczestniczyło w nich każdorazowo około 500 osób. Na program zjazdów składały się jedno lub kilka sympozjów oraz sekcje doniesień wolnych. Tematyka sympozjów zjazdowych przedstawiała się następująco: XIII Zjazd w Toruniu (1975) — fotosynteza, XIV Zjazd w Lublinie (1976) — 1. poliformizm białek, 2. biosynteza białek i 3. bio-



energetyka, XV Zjazd w Gdańsku (1977) — 1. sterydy i poliprenole i 2. swoistość metaboliczna tkanek: tkanka łączna, mięśnie i nerka.

Oprócz zjazdów odbyły się w okresie sprawozdawczym następujące imprezy naukowe zorganizowane przy współudziale naszego Towarzystwa: 1. krajowa konferencja bioenergetyczna (Warszawa, 1975) zorganizowana przez Sekcję Bioenergetyki, 2. międzynarodowy kurs FEBS, na temat bioenergetyki mitochondriów (Warszawa, 1976), 3. szkoła na temat spektroskopii w badaniach biologicznych (Kołobrzeg, 1977) zorganizowana przez Sekcję Fotobiologii, 4. międzynarodowe sympozjum pod nazwą „Translacja syntetycznych i naturalnych polinukleotydów” (Biażejewko pod Poznaniem, 1977) i 5. VII międzynarodowe kolokwium „Bioenergetyka i mitochondria” (Gdańsk, 1977).

W oddziałach Towarzystwa odbyło się w okresie sprawozdawczym ponad 150 zebrań naukowych. Zorganizowano również z pomocą firmy Pharmacia z Uppsali 10 kursów metod chromatograficznych. Ponadto w Oddziale Warszawskim odbyły się przy współudziale Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego dwa kursy pomiaru promieniowania jonizującego przy pomocy ciekłych scyntylatorów.

Ważną domeną działalności Towarzystwa jest wydawanie kwartalnika „Postępy Biochemii” oraz „Monografii Biochemicznych”. W ciągu minionych 3 lat ukazały się w „Postęпах Biochemii” 72 artykuły. Dbając o poziom pisma, Redakcja stosuje dość ostrą selekcję nadsyłanych materiałów. W okresie sprawozdawczym nie zakwalifikowano do druku 28 maszynopisów. „Monografie Biochemiczne” są wydawnictwem ukazującym się nieregularnie, w miarę napływu materiału. W okresie sprawozdawczym ukazał się jeden zeszyt, a mianowicie „Polskie Słownictwo Biochemiczne” pod redakcją A. Morawieckiego. Pod koniec 1977 r. spodziewane jest wydanie monografii pod redakcją A. Chorążego pod tytułem „Genom Organizmów Zwierzęcych, Struktura i Transkrypcja”. Trzecia monografia, autorstwa L. Wasilewskiej, pod tytułem „Regulacja Syntezy RNA w Tkankach Roślinnych” została już złożona do druku.

Inną formą popularyzacji biochemii są nagrody Towarzystwa. Nagroda im. Jakuba Karola Parnasa przyznawana jest corocznie za najlepszą pracę doświadczalną wykonaną w Polsce, a nagroda im. Bolesława Skarżyńskiego — za najlepszy artykuł przeglądowy w „Postęпах Biochemii”. Staraliśmy się uzyskać wysoką rangę obu nagród i kandydatury do nich były szczególnie skrupulatnie rozpatrywane. Trzecim rodzajem nagród były nagrody i wyróżnienia za najlepsze prace przedstawiane przez młodych biochemików na dorocznych zjazdach Towarzystwa. Nagrodom tym nadaliliśmy w 1975 r. imię Włodzimierza Mozołowskiego. Przyznano ich w sumie w okresie sprawozdawczym 25.

Na arenie międzynarodowej Towarzystwo nasze należy do Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych a ponadto — przez odpowiednie sekcje Towarzystwa — do Międzynarodowego Stowarzyszenia Fotobiologii i do Międzynarodowej Grupy Bioenergetycznej. Dzięki przynależności do FEBS członkowie naszego Towarzystwa otrzymują bezpłatnie dwa razy do roku biuletyn tej Federacji zawierający informacje o planowanych zjazdach, konferencjach, kursach itp. w całej Europie. Przynależność do FEBS daje możliwość polskim biochemikom uczestniczenia na pełnych prawach w dorocznych zjazdach tej Federacji, będących największym forum spotkań biochemików w Europie, a także w sympozjach i kursach FEBS. Corocznie kilku młodych biochemików z Polski korzysta ze stypendiów FEBS na pokrycie kosztów uczestnictwa w kursach Federacji.

Ustępujący Zarząd Główny dziękuje swym członkom i sympatykom, którzy w minionym trzyletnim okresie przyczynili się do osiągnięć Towarzystwa, a przyszłym władzom Towarzystwa życzy owocnej działalności z pożytkiem dla polskiej biochemii.

*Lech Wojtczak*

## Protokół z IX Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego odbytego w dniu 23 września 1977 r. w Gdańsku

Zebranie otworzył prezes Towarzystwa, prof. Lech Wojtczak, proponując na przewodniczącego Zebrania prof. Mariusza Żydowo a na sekretarza dr Zenona Aleksandrowicza. Propozycja została zatwierdzona przez aklamację. Obejmując przewodnictwo, prof. Żydowo stwierdził prawomocność Zebrania. Ze względu na brak quorum w pierwszym terminie. Zebranie rozpoczyna się w drugim terminie przy obecności 113 osób uprawnionych do głosowania. Zaproponowany porządek obrad został przez zebranych przyjęty:

1. Otwarcie, wybór przewodniczącego i sekretarza zebrania oraz powołanie Komisji Wnioskowej i Komisji Skrutacyjnej
2. Przyjęcie protokołu z VIII walnego Zebrania w dniu 5.9.1974 r.
3. Sprawozdanie z działalności Towarzystwa w okresie VIII kadencji od 5.9.1974 do 23.9.1977
4. Sprawozdanie Komisji Rewizyjnej
5. Dyskusja nad sprawozdaniami
6. Wniosek o absolutorium dla ustępującego Zarządu
7. Wybór nowych władz Towarzystwa
8. Nadanie godności członków honorowych Towarzystwa
9. Dyskusja na temat dotychczasowej i przyszłej działalności Towarzystwa, wnioski i podjęcie uchwał
10. Wolne wnioski

Ad 1. Komisję Skrutacyjną powołano w składzie: prof. Tadeusz Chojnacki (przewodniczący), dr J. Preiss i dr W. Bogusławski, zaś Komisję Wnioskową w składzie: prof. L. Kłyszajko-Stefanowicz (przewodnicząca), prof. A. Legocki i doc. J. Kwiatkowska.

Ad 2. W zastępstwie nieobecnego sekretarza Zarządu Głównego protokół z poprzedniego walnego zebrania przedstawiła prof. L. Kłyszajko-Stefanowicz. Protokół został przyjęty.

Ad 3 i 4. Prof. L. Wojtczak złożył sprawozdanie z działalności Zarządu Głównego w okresie VIII kadencji, a prof. T. Borkowski przedstawił protokół z posiedzenia Komisji Rewizyjnej z dnia 2.9.1977 r. i zgłosił wniosek o udzielenie absolutorium ustępującemu Zarządowi.

Ad 5. W dyskusji nad sprawozdaniem zabierali głos: prof. W. Niemierko, prof. S. Niemierko, prof. T. Borkowski i prof. L. Wojtczak.

Ad 6. Wniosek o udzielenie absolutorium został przyjęty przy 5 głosach wstrzymujących się (członkowie ustępującego Zarządu).

Ad 7. Ustępujący Zarząd zaproponował kandydatury prezesa, vice-prezesa i 14 członków Zarządu. Zebrani dodali jeszcze dwie kandydatury na członków Zarządu i zaproponowali 3 kandydatury do Komisji Rewizyjnej. W wyniku tajnego głosowania do władz Towarzystwa wybrani zostali: prezes — prof. L. Wojtczak, vice-prezes — prof. L. Kłyszajko-Stefanowicz, członkowie Zarządu Głównego: doc. W. Ardelt, prof. J. Chmielowski, dr B. Czartoryska, prof. L. Działoszyński, prof. A. Legocki, doc. Z. Machoy, dr G. Palamarczyk, doc. E. Sikorska, dr B. Skoczylas, doc. Z. Wojciechowski, doc. E. Wolna, doc. W. Zagórski, doc. A. Krawczyk i dr Z. Aleksandrowicz; Komisja Rewizyjna: prof. Z. Zielińska, doc. H. Panusz, prof. M. Sarnecka-Keller.

Ad 8. Ustępujący Zarząd zgłosił wniosek o nadanie godności członków honorowych Towarzystwa prof. dr Irenie Mochnackiej i prof. dr Davidowi Shugarowi.

Motywację wniosku przedstawili prof. Z. Zielińska i prof. L. Wojtczak. W dyskusji obie kandydatury gorąco poprali prof. S. Niemierko, prof. I. Chmielewska, prof. W. Niemierko i doc. H. Panusz. W tajnym głosowaniu zebrani wypowiedzieli się olbrzymią większością głosów za nadaniem godności członka honorowego Towarzystwa obu kandydatom.

Ad 9. W dyskusji głos zabierali: doc. H. Panusz, prof. M. Żydowo, prof. L. Wojtczak, prof. T. Borkowski, prof. I. Chmielewska i prof. Z. Zielińska. Przyjęto większością głosów lub jednomyślnie następujące wnioski:

1. zobowiązujący Zarząd Główny do interwencji wobec odpowiednich czynników w sprawie poprawy zaopatrzenia placówek badawczych w niezbędne odczynniki importowane i radioizotopy a także części zamienne oraz w sprawie obsługi serwisowej aparatury importowanej,
2. podwyższający składkę członkowską do 40 zł rocznie,
3. Zalecający coroczne organizowanie ogólnego zjazdu Towarzystwa lub jednego albo kilku specjalistycznych sympozjów,
4. poprawy rozpowszechniania i udostępniania Monografii Biochemicznych.

Ad 10. Wolnych wniosków nie zgłoszono.

*M. Żydowo  
Z. Aleksandrowicz*





## RECENZJE

### **Molecular and Biological Aspects of the Acute Allergic Reaction,**

red. S.G.O. Johansson, Kjell Strandberg and Börje Uvnäs,  
1976, Plenum Press, New York, London. Nobel Foundation Symposium 33, str. 463.

Książka stanowi zbiór referatów przygotowanych i wygłoszonych przez wybitnych specjalistów na sympozjum poświęconym molekularnym i biologicznym aspektom ostrych reakcji alergicznych, organizowanym przez Fundację Nobla w marcu 1976 roku w Sztokholmie. Po każdym referacie zamieszczone jest aktualne piśmiennictwo oraz dyskusje dotyczące poruszanego w referacie zagadnienia.

W sumie książka zawiera 22 referaty a przedstawione w nich zagadnienia dotyczą:

- struktury alergenów,
- genetyki, struktury i regulacji immunologicznej odpowiedzi immunoglobulin klasy IgE,
- eksperymentalnego modelu badania immunoglobulin klasy IgE u szczurów,
- mechanizmów uwalniania mediatorów,
- roli mastocytów w ostrych reakcjach alergicznych,
- relacji mastocyt — komplement i system kinin,
- komórkowej odporności immunologicznej.

Przedstawione w referatach zagadnienia są jasno i nowocześnie sformułowane, rozwinięte i poparte własnymi wynikami. Dokumentacja wyników i sposób ich przedstawienia jest bardzo dobra. Schematy obrazujące niektóre immunologiczne i biochemiczne mechanizmy reakcji biologicznych w ostrych odczynach alergicznych są doskonałe i ułatwiają czytającemu szybkie zrozumienie nawet najbardziej skomplikowanych reakcji — począwszy od procesów indukcji do reakcji efektorowej oraz procesów regulacyjnych.

Na wyróżnienie zasługują referaty:

Lichtensteina — The Interdependence of Allergic and Inflammatory Processes, Austena i wsp. — Mast Cell-Derived Mediators: Structural and Functional Diversity and Regulation of Expression, Goetzla i Austena — Specificity and Modulation of the Eosinophil Polymorphonuclear Leukocyte Response to the Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis (ECF — A).

Z. Wiczorek

## John Daly, *Cyclic Nucleotides in the Nervous System*

Plenum Press, New York and London, 1977, str. 402.

Książka J. Daly pt.: „Cyclic Nucleotides in the Nervous System” jest krytycznym opracowaniem na temat tworzenia, degradacji i funkcji cyklicznych nukleotydów w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Autor omawia prace dotyczące dwóch cyklicznych nukleotydów, a mianowicie AMP i GMP, opierając się na ponad 1200 pozycjach piśmiennictwa od 1961 roku do kwietnia 1976. Materiał zawarty na około 300 stronach książki jest przedstawiony w trzech rozdziałach: 1 — Synteza enzymatyczna, rozpad i działanie cyklicznych nukleotydów, 2 — Nagromadzanie cyklicznych nukleotydów, 3 — Funkcjonalne znaczenie cyklicznych nukleotydów. enzymów związanych z ich metabolizmem w różnych częściach układu nerwowego

W pierwszej części autor omawia występowanie cyklicznych nukleotydów oraz enzymów związanych z ich metabolizmem w różnych częściach układu nerwowego a także ich rozmieszczenie wewnątrzkomórkowe. Zajmuje się wnikliwie czynnikami regulującymi aktywność enzymów: cyklaz, fosfodwuesteraz, kinaz i fosfataz białkowych. Przedstawia zmiany ilości cyklicznych nukleotydów i aktywności cyklaz w rozwoju różnych zwierząt.

Drugi rozdział poświęcony jest gromadzeniu cyklicznych nukleotydów w tkance nerwowej. Autor przedstawia tu wyniki badań prowadzonych na skrawkach mózgu, izolowanych zwojach i nerwach obwodowych różnych zwierząt. Zajmuje się szczególnie metodami pomiarów ilości i szybkości syntezy cyklicznych nukleotydów. Omawia również wpływ neurotransmitterów (oraz związków zmieniających ich poziom lub metabolizm), hormonów, i jonów na gromadzenie się cyklicznych nukleotydów.

W trzeciej części autor zajmuje się rolą cyklicznych nukleotydów w układzie nerwowym. Przedstawia szereg danych dotyczących korelacji zaburzeń poziomu cyklicznych nukleotydów z zaburzeniami: szlaków metabolicznych, podziałów komórkowych, funkcjonowania błon, zachowania zwierząt. Omawia też działanie środków czynnych farmakologicznie na poziom cyklicznych nukleotydów. Ponadto zajmuje się wpływem cyklicznych nukleotydów na metabolizm neurotransmitterów.

Omawiana książka ze względu na olbrzymi ładunek wiadomości, często bardzo szczegółowych, jest pozycją trudną, zwłaszcza dla początkujących biochemików czy neurochemików. Niewątpliwie jest ona bardzo przydatna dla osób zajmujących się cyklicznymi nukleotydami jako swego rodzaju indeks piśmiennictwa. Jest napisana zwięzłym językiem. Układ książki jest przejrzysty, umożliwiając szybkie znalezienie interesujących odnośników. Czytelne schematy, wyczerpujące tabele oraz appendix zawierający wzory chemiczne wszystkich omawianych substancji podnoszą wartość tej pozycji.

*A. Potempska*

## Protein metabolism of the brain

Red.: A. V. Palladin, Y. V. Belik i N. M. Polyakova, 1977,  
Consultant Bureau, New York, London str. 335.

Książka „Protein metabolism of the brain” to przetłumaczona na język angielski rosyjska monografia, której autorami są znani badacze — A. V. Palladin, Y. V. Belik i N. M. Polyakova.



Czytelnik polski miał możliwość zapoznać się dużo wcześniej z rosyjskim oryginałem, wydanym w 1972 roku. Zrozumiałe jest zatem, że tak długi okres, który upłynął od chwili pierwszego wydania a ukazaniem się książki w wersji angielskiej, sprawił, że nie omawia ona najnowszych osiągnięć w dziedzinie badań metabolizmu białek mózgu.

Tym niemniej 1800 pozycji piśmiennictwa daje czytelnikowi możliwość zapoznania się z rozwojem wiedzy o białkach układu nerwowego. Szczególnie bogato reprezentowane są prace autorów radzieckich, co dla czytelnika rzadko sięgającego do czasopism wydawanych w języku rosyjskim czy ukraińskim, jest niezwykle cenne.

W ośmiu rozdziałach przedstawiono w sposób jasny i wyczerpujący najbardziej istotne zagadnienia:

- kierunki badań nad białkami układu nerwowego i ich metabolizmem
- frakcjonowanie białek oraz fizykochemiczne i biologiczne własności niektórych frakcji białkowych
- bariera krew—mózg i transport aminokwasów poprzez błony komórkowe
- niektóre morfologiczne, biochemiczne i funkcjonalne właściwości układu nerwowego
- odnowa białek układu nerwowego i jego struktur subkomórkowych
- metabolizm białek tkanki nerwowej w różnych stanach funkcjonalnych
- metabolizm białek mózgowych w czasie rozwoju
- katabolizm białek układu nerwowego.

Wielką zaletą książki jest krytyczne omówienie badań nad metabolizmem białek mózgu. Ukazuje ono wszystkie trudności nad badaniem dynamicznych przemian białek mózgu przy stosowaniu radioaktywnych prekursorów i niebezpieczeństwo błędów w interpretacji wyników. Szczególnie ciekawy jest rozdział poświęcony zmianom składu białkowego i metabolizmu białek w czasie rozwoju ontogenetycznego, zarówno w poszczególnych strukturach mózgu jak i we frakcjach subkomórkowych. Pewnym niedostatkiem opracowania jest zbyt skromny i nie zawsze przejrzysty materiał ilustracyjny. Należy żałować, że tak użyteczna książka trafia do odbiorcy czytającego w języku angielskim z tak wielkim opóźnieniem.

*J. Skangiel-Kramska*

## Structure of Biological Membranes

**Red. S. Abrahamsson i I. Pascher, 1977,  
Plenum Press, New York, London, str. 580.**

W czerwcu 1976 r. odbyło się w Skövde w Szwecji XXXIV Sympozjum Fundacji Nobla poświęcone błonom biologicznym. Wzięło w nim udział około 50 wybitnych specjalistów z całego świata i przedstawiono 30 referatów. Teksty tych referatów składają się na omawiane wydawnictwo. Tematyką Sympozjum można ująć w następujących punktach: 1. lipidy i właściwości fizyczne błon, 2. białka błon, 3. oddziaływania między lipidami a białkami, 4. węglowodany błon, 5. zjawiska dynamiczne w błonach, 6. zjawiska elektrostatyczne, 7. transport przez błony, 8. przetwarzanie energii, 9. modele błon. Spośród omawianych rodzajów błon wymienić można: endoplazmatyczne retikulum, błony mitochondrialne, chloroplasty, błony erytrocytów, mielinę, błony plazmatyczne i szereg innych. Do szczególnie ciekawych artykułów zaliczyłbym następujące: M. Avrona (Rehovot) na temat transportu protonów w chloroplastach, D. Chapmana (Londyn) o przejściach fazowych, agregacji białek i płyn-

ności fazy lipidowej błon biologicznych, L. L. M. van Deenena (Utrecht) omawiający lipidową strukturę błon erytrocytów, L. Ernster (Sztokholm) na temat naturalnego inhibitora mitochondrialnej ATP-azy, C. R. Hackenbrocka (Dallas, Teksas) o molekularnej organizacji wewnętrznej błony mitochondrialnej, Yu. A. Ovchinnikova (Moskwa) na temat jonoforów peptydowych, J. C. Skou (Aarhus) traktujący o transporcie jonów sodu i potasu i W. Stoeckeniusa (San Francisco) o transporcie protonów w błonach modelowych zawierających wbudowaną bakteriorodopsynę.

W sumie książka zawiera niezwykle cenny materiał dla wszystkich interesujących się biochemią i biofizyką błon biologicznych.

L. Wojtczak

## Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants,

red. L. Bogorada i J. H. Weila, 1977, Plenum Press,  
New York, London, seria A: Life Sciences vol. 12,  
NATO Advanced Study Institutes Series, str. 417.

W lipcu 1976 r. w Strasburgu odbyło się kolokwium połączone ze specjalistycznym kursem na temat kwasów nukleinowych i syntezy białka u roślin. Plonem konferencji były dwie cenne publikacje: „Acides Nucléiques et Synthèse des Protéines cher les Végétaux” wyd. C.N.R.S. Paris 1977 oraz pozycja recenzowana. Redaktorami obydwu tomów byli L. Bogorad i J. H. Weil. Pierwsza publikacja zawiera ponad 100 przedstawionych w syntetycznej formie komunikatów i doniesień referowanych w ramach kolokwium, druga zaś 24 obszerne artykuły wygłoszone w ramach kursu i ułożonych w książce w następujących działach:

- Organizacja i replikacja genomów jądrowych i chloroplastowych
- Transkrypcja
- Translacja: aparat syntezy białka
- Synteza kwasów nukleinowych i białka przez organelle: zależności organel-la-jądro
- Kontrola syntezy kwasów nukleinowych i białka przez hormony i czynniki środowiska
- DNA obcy w komórkach roślinnych: wirusy roślinne

W zasadzie wszystkie artykuły mają charakter prac doświadczalnych opartych głównie na pracach własnych autorów, choć każdy z nich zawiera użyteczne wprowadzenie literaturowe. Problematyka poszczególnych rozdziałów dobrze odzwierciedla aktualne kierunki w badaniach nad biosyntezą białka i metabolizmem kwasów nukleinowych. Wydawcom udało się zebrać zespół znakomitych autorów, co sprawia, że poziom naukowy tomu jest bardzo wysoki.

Stosunkowo najszczerzej potraktowany jest rozdział dotyczący charakterystyki genomu roślinnego (H. Stern, K. K. Tewari i in.). Wynika to zapewne z niewielkiego jeszcze rozwinięcia badań nad właściwościami i organizacją DNA u roślin. Dotychczasowe badania, co znajduje wyraz w powyższych artykułach, koncentrowały się głównie na DNA chloroplastów, które scharakteryzowano typowymi metodami fizycznymi a także poprzez analizę fragmentów otrzymanych po alkalicznej hydrolizie. Należy oczekiwać jednak, że zastosowanie enzymów restrykcyjnych pozwoli na zmapowanie poszczególnych genów, a co za tym idzie przybliży zrozumienie organizacji i replikacji genomu tych organelli.

Obszerniejszy natomiast jest rozdział o transkrypcji oraz o właściwościach zależnych od DNA polimeraz RNA. W większości przebadanych dotąd układów roślin-



nych wykryto obecność polimeraz typu I i II, których aktywności zależą, jak to wykazano na przykładzie soi, zarówno od warunków wzrostu rośliny, jak też obecności substancji wzrostowych (artykuł J. L. Key i in.).

Do frapujących od dawna zależności regulacyjnych w świecie roślin należy wzajemne powiązanie metabolizmu i systemów kontrolnych jądra, cytoplazmy i organelli komórki. Problem ten przewija się przez szereg artykułów omawiających przebieg syntezy rybosomalnych RNA (G. Richter i in.), właściwości i specyficzność organellowych tRNA i syntetaz aminoacylo-tRNA (J. H. Weil i in.), a także rybosomów i białkowych czynników elongacyjnych (O. Ciferri i in.). Istotny postęp w badaniach funkcji organellowych systemów genetycznych przyniosło opracowanie modelowych układów bezkomórkowych syntetyzujących białko. Układy takie opracowano zarówno dla chloroplastów (R. J. Ellis) jak i mitochondriów (C. J. Leaver i in.). Jak wiadomo rybosomy organelli organizmów wyższych wykazują typowe cechy rybosomów prokariotycznych, jakkolwiek wykryto subtelne różnice w budowie i właściwościach m.in. niskocząsteczkowych rRNA (artykuł T. A. Dyera i in.).

Dodatkowa atrakcyjność śledzenia poszczególnych stadiów przekazywania informacji genetycznej w układach roślinnych leży w ich unikalnej podatności na zmiany morfogenetyczne. Zmiany takie mogą mieć charakter zarówno naturalny (wzrost i różnicowanie roślin) jak też indukowany czynnikami fizycznymi (światło) czy też substancjami o działaniu hormonalnym. Jakkolwiek obecnie daleko jeszcze do pełnego zrozumienia tych złożonych procesów regulacyjnych, nagromadzony zwłaszcza w ostatnich latach obszerny materiał doświadczalny pozwala już na wyciągnięcie pierwszych wniosków n.t. syntezy określonych, funkcjonalnych i zapasowych białek roślinnych. Zagadnieniom tym poświęconych jest w książce szereg artykułów napisanych m.in. przez J. Varnera, L. S. Dure III i in. H. Mohra i in., D. Boultera, A. Trewavasa i in.

W osobnym rozdziale ujęte są wybrane zagadnienia dotyczące syntezy w komórkach roślinnych białek pochodzenia wirusowego. Ten ważny kierunek badawczy dostarczył wielu dogodnych modeli dla poznania szczegółowego przebiegu różnych etapów przekazywania informacji genetycznej (artykuły J. B. Briand i in., T. O. Diener, L. van Vloten-Doting i in.).

Staranny dobór przez redaktorów wydania zagadnień powierzonych do opracowania najbardziej kompetentnemu gronu autorów sprawia, że książka jest jednym z najlepszych zbiorów artykułów monograficznych na temat kwasów nukleinowych i syntezy białka u roślin, jaki ukazał się na przestrzeni kilku ostatnich lat. Taki charakter wydawnictwa zakreśla jednocześnie jego zasięg jak i też dobiera czytelników, którymi będą biologowie i biochemicy o ukierunkowanych zainteresowaniach i o pewnym już zaawansowaniu w problematyce. Niezwykle staranna szata graficzna i przejrzystość układu są dodatkową godną odnotowania cechą tej cennej pozycji.

A. Legocki

## Comprehensive Virology

**Vol. 7, Reproduction — Bacterial DNA Viruses, Red. H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner, 1977, Plenum Press, New York, London, str. 300;**

**Vol. 8, Regulation and Genetics — Bacterial DNA Viruses, Red. H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner, 1977, Plenum Press, New York, London, str. 350.**

Dwa recenzowane tomy Comprehensive Virology stanowią tomy 7 i 8 serii wydawniczej, które według założenia w około 25 tomach ma przedstawić współczesną wiedzę i poglądy ze wszystkich dyscyplin współczesnej wirusologii. Reprodukcyjność



rusów poświęcono cztery tomy, z których jeden — recenzowany tom 7 — przedstawia zagadnienia związane z reprodukcją bakteriofagów. Kolejne rozdziały tego tomu opisują grupy fagów, różniące się znacznie właściwościami genetycznymi.

Rozdział 1 (104 strony, 24 ryciny, około 300 pozycji literatury) napisany przez D. T. Denhardta, poświęcony jest reprodukcji izometrycznych bakteriofagów, zawierających DNA jednoniciowy. Autor tego rozdziału jest autorytetem w dziedzinie teorii replikacji DNA, jak również w zakresie badań nad reprodukcją faga  $\Phi$ X174 — klasycznego przedstawiciela grupy fagów, opisywanych w tym rozdziale. Na przykładzie tego faga przedstawiono szczegółowo kolejne etapy namnażania faga w komórce bakteryjnej, mechanizmy regulacyjne, działające na poszczególnych etapach replikacji faga informacji genetycznej, transkrypcji i translacji oraz dane na temat rekombinacji genetycznej.

Rozdział 2 (75 stron, 20 rycin, ponad 200 pozycji literatury) omawia reprodukcję bakteriofagów nitkowatych z genomem w postaci jednoniciowego DNA. Autorem tomu jest D. S. Ray — autor cyklu prac na temat reprodukcji faga M13. Autor wymienia fagi zaliczane do opisywanej grupy, przedstawia ich cechy morfologiczne oraz właściwości fizykochemiczne i biochemiczne. Proces reprodukcji opisano szczegółowo na przykładzie bakteriofagów z grupy colifagów Ff — tak zwanych fagów płciowych, które mają zdolność infekowania komórek, posiadających fimbrie płciowe typu F. Dotychczasowe dane na temat reprodukcji fagów nitkowatych z jednoniciowym DNA dotyczą bowiem, niemal wyłącznie fagów tej grupy. Na zakończenie rozdziału autor przedstawia najważniejsze problemy, czekające swego rozwiązania, podkreślając możliwość poznania, w bliskiej przyszłości, struktury pierwszorzędowej DNA tych fagów.

Rozdział 3 (116 stron, 11 rycin, około 500 pozycji literatury) napisał C. K. Mathews. Przedstawiono w nim reprodukcję dużych fagów wirulentnych. We wstępie omówiono ogólne właściwości tej dużej i niejednorodnej grupy oraz ich niektóre cechy morfologiczne i biochemiczne. Następnie przedstawiono szczegółowo właściwości genetyczne colifaga T4, jego mapę fizyczną i genetyczną (z listą wszystkich znanych genów) oraz cykl życiowy tego typowego przedstawiciela tzw. fagów T-parzystych. W kolejnych częściach rozdziału Czytelnik znajdzie dane na temat reprodukcji colifagów z grupy T-nieparzystych oraz bakteriofagów wirulentnych dla *Bacillus subtilis*. Dane dotyczące tej ostatniej grupy fagów przedstawia jednak pobieżnie, odsyłając Czytelników do innych, niedawno publikowanych prac przeglądowych.

Chociaż rozdziały tego tomu są obszernymi pracami monograficznymi, przedstawiającymi bardzo szczegółowo poszczególne etapy namnażania bakteriofagów, to jednak książka nie straciła cech dobrego podręcznika, z którego mogą korzystać zarówno studenci, jak i naukowcy, zajmujący się poruszonymi w niej problemami.

Procesom regulacyjnym i genetyce wirusów poświęcono w serii Comprehensive Virology cztery tomy. Tom 8 poświęcono procesom regulacji i genetyki bakteriofagów. Cztery kolejne rozdziały przedstawiają regulację aktywności genów w grupach bakteriofagów, różniących się sposobem wzajemnego oddziaływania: bakteriofag — komórka gospodarza.

W rozdziale 1 (196 stron, 11 rycin, około 1000 pozycji literatury) D. Rabussay i E. P. Geidushek przedstawiają regulację aktywności genów w rozwoju fagów litycznych. Rozdział ten podzielony jest na kilka części, w których autorzy przedstawiają regulację aktywności genów fagów: T7 i T3, fagów *Bacillus subtilis*, zawierających hydroksymetylouracyl, fagów T-parzystych na przykładzie faga T4, faga T5 oraz bardzo charakterystyczny sposób oddziaływania na aktywność transkrypcyjną gospodarza — fagów N4 i PBS2. Ostatnia część, stanowiąca niejako komentarz autorów do rozdziału, podsumowuje złożone zależności fag lizujący — komórka gospodarza oraz przedstawia pewne mechanizmy regulacyjne jako prototypy podobnych mechanizmów, spotykanych u wyżej zorganizowanych organizmów.

Rozdział 2 (62 strony, 7 rycin, około 200 pozycji literatury) napisany został przez

R. A. Weisberg, S. Gottesman i M. E. Gottesman i przedstawia rozwój fagów lizogennych na przykładzie faga lambda. Fag ten jest najlepiej poznanym fagiem łagodnym *E. coli*. Autorzy przedstawiają krótko jego właściwości fizyczne a następnie bardzo szczegółowo opisują kolejne etapy ustalania się stanu lizogenii, mechanizm wbudowywania się do chromosomu bakteryjnego, wyłączenia z chromosomu wraz z genetycznymi konsekwencjami tych procesów oraz współoddziaływanie informacji genetycznej komórki gospodarza i własnej informacji faga w tych procesach.

W rozdziale 3 (70 stron, 16 rycin, około 200 pozycji literatury) A. Campbell opisuje właściwości genetyczne fagów defektywnych, metody ich namnażania w komórkach bakteryjnych oraz mechanizmy, dzięki którym tego rodzaju struktury mogą powstawać. Bardzo interesująca jest część rozdziału poświęcona rozważaniom na temat znaczenia defektywnych bakteriofagów w ewolucji. Część ta jest bardzo oryginalnym uzupełnieniem hipotez (często ostatnio przedstawianych) na temat roli pozachromosomowych elementów w ewolucji.

Ostatni, czwarty rozdział (16 stron, 4 ryciny, 54 pozycje literatury) napisany został przez R. Calendar, J. Geisselsoder, M. G. Sunshine, E. W. Six i B. H. Lindqvist. Poświęcony on został niezwykle interesującym oddziaływaniom między fagami *E. coli* P2 i P4, czyli tak zwanemu systemowi transaktywacji. W rozdziale tym autorzy opisują kolejno cykle życiowe fagów P2 i P4 a następnie wzajemne oddziaływania ich genomów na poszczególnych etapach rozwoju.

W tomach siódmym i ósmym pewne informacje powtarzają się (np. mapa genetyczna faga T4 i lista jego genów). Dzięki temu jednak, każdy z tych tomów stanowi pewną całość i dla zrozumienia problemów w nich zawartych, nie trzeba odwoływać się do innych tomów. Bardzo cenne jest również ogólne wprowadzenie, ułatwiające zrozumienie bardzo trudnych problemów genetycznych przedstawionych w tych opracowaniach (np. na pierwszych 27 stronach ósmego tomu przedstawiono opis mechanizmów kontrolujących transkrypcję i translację w komórkach bakteryjnych nie zakażonych bakteriofagami. Cytowana literatura jest bardzo starannie dobrana i obejmuje najnowsze odkrycia w dziedzinach poruszanych w poszczególnych rozdziałach. W uzupełnieniach dodanych w czasie przygotowania wydawnictwa cytowana jest literatura nawet z roku 1977.

Wszystkie te cechy składają się na to, że książki te można polecić wirusologom, bakteriologom, genetykom oraz ewolucjonistom. Informacje i pewne syntezy w nich zawarte wykraczają bowiem znacznie poza zakres jednej dziedziny, mogą być jednak zrozumiałe dla przedstawicieli dziedzin pokrewnych. Przede wszystkim książki te można polecić wykładowcom genetyki molekularnej na kierunkach mikrobiologicznych, jako cenne uzupełnienie dotychczas dostępnej literatury przeglądowej.

St. Cebrat

Red. M.A.Q. Khan

### **Pesticides in aquatic environments**

**Environmental Science Research t. 10, 1977. Plenum Press, Nowy Jork i Londyn, str. XIV+257.**

Jednym z bardziej aktualnych problemów współczesnej cywilizacji jest zapobieganie chemicznym skażeniom naszego środowiska i ich zwalczanie. Toteż spośród 10 wydanych dotychczas tomów serii Environmental Science Research aż 6 poświęcono różnym aspektom toksykologii środowiskowej w ogóle, a pestycydom w szczególności; należy do nich również recenzowany obecnie tom dziesiąty. Zawiera on



materiały sympozjum, które odbyło się w ramach Międzynarodowego Kongresu Entomologicznego (sierpień 1976, Waszyngton).

Materiał zgrupowano w trzech częściach:

#### I. Pestycydy w środowisku wodnym

M.in. oceniono źródła zanieczyszczeń pestycydami wód śródlądowych, sklasyfikowano poszczególne grupy pestycydów pod względem stopnia ich szkodliwości i przedstawiono dalsze losy pestycydów w środowisku wodnym (C. A. Edwards). Wskazano także na fizykochemiczne cechy pestycydów determinujących te losy (R. Hague i in.).

#### II. Pestycydy w organizmach wodnych

Przedstawiono wyniki bardzo jednostronnych studiów nad absorpcją pestycydów przez organizmy wodne, ich przemianami i usuwaniem, rezultatem czego jest ostateczny poziom pestycydu w organizmie (bioakumulacja). Badania te, prowadzone w laboratoryjnych modelach ekosystemów, objęły również szeroki wachlarz czynników modyfikujących powyższe procesy (doniesienia F. Matsumury, M. A. Q. Khana i R. L. Metcalfa).

#### III. Degradacja pestycydów przez organizmy wodne

Omówiono badania *in vivo* i *in vitro* przemian, którym podlegają pestycydy w organizmach, zarówno morskich, jak i słodkowodnych. Charakter tych przemian jest bardzo różnorodny, ponieważ pestycydy obejmują bardzo szeroką i zróżnicowaną grupę organicznych związków chemicznych, a także ponieważ jest wiele czynników (ekologiczne, fizjologiczne, taksonomiczne) modyfikujących te przemiany. Metabolit nie musi być mniej toksyczny od związku wyjściowego (doniesienia L. S. Harta oraz M. O. Jamesa i in.). Niezwykle cenną pozycją jest przedstawienie aktualnego stanu wiedzy o metabolizmie pestycydów w organizmach wodnych (Przegląd literatury M. A. Q. Khana i in.).

Niewątpliwą zaletą tego zbioru prac widzę w oderwaniu się od statycznego podejścia do zagadnienia (nie ograniczono się do interpretowania połówkowych stężeń letalnych, LC50). Skoncentrowano się natomiast na ważkich procesach zachodzących nie tylko w pojedynczych organizmach, lecz także w całych sieciach troficznych. Było to możliwe dzięki pogodzeniu metodologii chemicznych, biochemicznych, toksykologicznych i ekologicznych wreszcie; dla Czytelników tych specjalności omawiana książka będzie wysoce interesująca, mimo, że nie omawia szeregu istotnych aspektów działania pestycydów w środowisku wodnym. Kombinowane działanie trucizn (np. synergiczne, antagonistyczne) zostało tylko zaaansowane. Pominięto zupełnie zagadnienie wpływu pestycydów na funkcje życiowe hydrobiontów; jest ono praktycznie ważne dla wczesnej detekcji (biologiczny monitoring) subanalitycznych stężeń pestycydów. Te ograniczenia wynikają zapewne z ograniczonego grona jej Autorów (prawie wszyscy z U. S. A. i Kanady). To samo ograniczenie tyczy (obszernego zresztą) zestawu piśmiennictwa.

E. Kamler



## SPIS TREŚCI

J. Kwiatkowska — Rozwój poglądów na mechanizmy regulacji metabolicznych . . . . .	131
J. Rytka — Genetyczna regulacja metabolizmu w drożdżach <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	151
W. Krajewska, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Białka chromatyny komórek erytroidalnych ptaków . . . . .	177
P. Chomczyński — Regulacja transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy . . . . .	195
A. Krop-Wątorrek — Budowa i właściwości biologiczne lektyn . . . . .	221
A. Stankiewicz — Dezaminaza AMP . . . . .	243
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: Sprawozdanie Komitetu Naukowo-Organizacyjnego z przebiegu XV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (L. Żelewski) . . . . .	265
Sprawozdanie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za okres VII kadencji (L. Wojtczak) . . . . .	266
Protokół z IX Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk (M. Żydowo, Z. Aleksandrowicz) . . . . .	268
Recenzje . . . . .	271
Komunikaty . . . . .	150, 219, 242
Spis treści — Tom XIII 1977 rok . . . . .	279

## POSTĘPY BIOCHEMII

June 1978

ARTICLES IN POLISH

Volume 24

Number 2

J. Kwiatkowska — Mechanisms of Metabolic Regulation: Development of Concepts (Dept Biochem., Medical School, Wrocław)	131
J. Rytka — Genetic Regulation of Metabolism in Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	151
W. Krajewska, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Chromatin Proteins of Avian Erythroid Cell (Dept Biochem., Inst. Biochem. Biophys., University of Łódź, Łódź)	177
P. Chomczyński — Regulation of Transcription in Mammary Gland During Lactogenesis (Dept Biochem., Inst. Genetics and Animal Breeding, Pol. Acad. Sci., Jastrzębiec)	196
A. Krop-Wątorok — Structure and Biological Properties of Lectins (Dept Biochem., Inst. Organic Physical Chem., Technical University of Wrocław, Wrocław)	221
A. Stankiewicz — AMP-deaminase (Dept. Biochem., Inst. Med. Biol., Medical School of Gdańsk, Gdańsk)	243
Chronicle	265
Book Reviews	271
Communications	150, 219, 242

# POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartlnik

**Cena zł 20.—**

WARUNKI PRENUMERATY

**Cena prenumeraty krajowej**

**półrocznie zł 40.—**

**rocznie zł 80.—**

Prenumeratę krajową 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 prenumeratorzy indywidualni, zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, 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.



SPIS TREŚCI — TOM XXIII, 1977

ARTYKUŁY MONOGRAFICZNE

G. Adler — Tyreoliberyna . . . . .	3
W. Filipowicz — Inicjacja translacji mRNA u organizmów eukariotycznych	21
K. Gonta-Grabiec — Rola poliprenoli w przenoszeniu reszt cukrowych . . . . .	61
W. Rode — Synteza tymidylanowa . . . . .	81
B. Szukalski — Komórkowa i subkomórkowa topografia enzymów sterydogenezy . . . . .	95
W. Rode — Oczyszczanie enzymów i innych białek biologicznie czynnych poprzez chromatografię na substancjach niskocząsteczkowych unieruchomionych w fazie stałej . . . . .	113
M. Piechowska — Jednołańcuchowe frakcje dwułańcuchowego DNA . . . . .	139
K. Kańska-Brudzyńska, Z. Walter — Struktura chromatyny . . . . .	157
A. Niedźwiecka, A. Kaliński — Rola histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny . . . . .	157
E. M. Rakowicz-Szulczyńska — Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów . . . . .	189
J. J. Bujarski, St. Paszyc — Strukturalne tionukleozydy w badaniach struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych . . . . .	211
B. Czartoryska — Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisacharydów . . . . .	229
B. Suszka, J. Chmiel — Wyodrębnianie i oznaczanie glikozoaminoglikanów tkanki łącznej . . . . .	267
J. Opieńska-Blauth — Wspomnienie — Prof. dr Marek Kański . . . . .	295
W. P. Michalski — Struktura i funkcja błony purpurowej bakterii słonolubnych z rodzaju <i>Halobacterium</i> . . . . .	297
A. Sołtyk — Wczesne etapy oddziaływania kompetentnych bakterii z kwasami nukleinowymi . . . . .	321
B. Mazuś — Polimerazy RNA eukariotów ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz roślin wyższych . . . . .	347
K. St. Famulski — Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne substraty jądrowych kinaz białkowych . . . . .	379
B. Wolska-Mitaszko — Rola poliamin w syntezie białka . . . . .	399
A. L. Pawlak — Homotropowe i heterotropowe oddziaływania w ludzkiej hemoglobinie A . . . . .	417
D. Sławińska, J. Sławiński — Analiza chemiluminescencyjna w biochemii . . . . .	445
E. N. Christiansen, L. Wojtczak — Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej . . . . .	495
M. Michalak, M. G. Sarzała — Asymetria błon biologicznych . . . . .	523
J. Zborowski — Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi . . . . .	541
B. Grzelakowska-Sztabert — Metabolizm aminoanalogów folianu . . . . .	559
B. Oderfeld-Nowak — Wpływ niektórych uszkodzeń mózgu na mechanizm cholinergiczne hipokampa . . . . .	579

## RECENZJE KSIĄŻEK

- J. Lisowski — „Immunologische Arbeitsmethoden”, red. Helmut Friemal, VEB Gustav Fischer Verlag, 1976, Wyd. 1 . . . . . 134
- J. Gregorczyk — „Praktische Chemie für Mediziner und Naturwissenschaftler”, red. H. G. Henning, W. Jugett, G. Sauer, VEB Verlag und Gesundheit — Berlin, 1976 III wydanie przerobione . . . . . 134
- M. G. Sarzała — The enzymes of biological membranes, red. A. Martonosi, 1976, Plenum Press, New York, London:  
Tom 2 — „Biosynthesis of cell compounds” . . . . . 283  
Tom 3 — „Membrane transport” . . . . . 284
- L. Wojtczak — The Enzymes of Biological Membranes, red. A. Martonosi, 1976, Plenum Press, Nowy York, London:  
Tom 4 — „Electron transport systems and receptors” . . . . . 285
- L. Wojtczak — Horst Reinbothe — „Einführung in die Biochemie” VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1975 . . . . . 286
- H. Dominas — „Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous systems” Wydana przez G. Porcellati, Z. Amaduci i C. Galli w ramach wydawnictwa ciągłego „Advances in Experimental Medicine and Biology”, Vol. 72 (1975) . . . . . 286
- M. Dydyńska — Erol Basar — „Biophysical and Physiological Systems Analysis”. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, 1976 . . . . . 288
- I. Sopata, E. Wojtecka-Łukasik — „Biochemistry of Collagen”, red. G. N. Ramachandran i A. H. Reddi, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . . 475
- Z. Kaniuga — Horizons in Biochemistry and Biophysics, Tom 2, red. E. Quagliariello, F. Palmieri, T. P. Singer, Addison-Wesley Publishing Company (Advanced Book Program) Reading, Mass., 1976 . . . . . 476
- Z. Kuratowska — Iron and Copper Proteins, red. K. T. Yasounobu, H. F. Mower, O. Hayashi, tom 75 Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . . 477
- B. Kędzierska — Biological Roles of Sialic Acid, red. A. Rosenberg, C. L. Schengrund, 1976, Plenum Press, New York, London . . . . . 478
- A. Przełęcka — XVII Supplement Acta Histochemica, wyd. Gustav Fischer, Jena — Biomorphose von Zellorganellen und Methoden ihrer submikroskopischen Untersuchung, red. prof. dr med. habil. Gunther Geyer, Instytut Anatomiczny Uniwersytetu Fryderyka Schillera w Jenie . . . . . 480
- A. Przełęcka — Methods in Membrane Biology, 7. Red. Edward D. Korn, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . . 480
- Z. Zielińska — Reflection on Biochemistry. In honour of Severo Ochoa, Red. A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella i J. Oro. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1976 . . . . . 481

## KRONIKA

- Komunikat Polskiego Towarzystwa Biochemicznego — Doroczne nagrody za najlepsze publikacje z zakresu biochemii ogłoszone w 1975 . . . . . 128
- Sprawozdanie z XVI posiedzenia Rady FEBS, Hamburg, 25 i 31 lipca 1976 r. — L. Wojtczak . . . . . 130
- Sprawozdanie z III Wszeczwiązkowego Sympozjum „Struktura i funkcja aktywnych centrów enzymów” Puszczino nad Oką (ZSRR) 9—12.VIII.1976 — G. Muszyńska . . . . . 131

Sprawozdanie z Kolokwium nt. „Biosynteza koenzymów folianowych”, Dublin (Irlandia), 2—3 wrzesień 1976 — <i>Z. Zielińska</i> . . . . .	132
Sprawozdanie z VII Międzynarodowego Kongresu Fotobiologicznego, Rzym, 27. VIII.—3. IX. 1976 — <i>J. Sławiński</i> . . . . .	279
Dedykacja w osiemdziesiątą rocznicę urodzin Prof. dr Włodzimierza Niemierko — Polskie Towarzystwo Biochemiczne . . . . .	473



## INDEKS AUTORÓW — TOM XXIII, 1977

### A

- Adler G. — Tyreoliberyna . . . . . 3

### B

- Blauth J. — (patrz Opieńska-Blauth J.) — Wspomnienie — Prof. dr Marek  
Kański . . . . . 295
- Brudzyńska K. — (patrz Kańska-Brudzyńska K., Walter Z.) — Struktura  
chromatyny . . . . . 157
- Bujarski J. J., Paszyc St. — Strukturalne tionukleozydy w badaniach  
struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych . . . . . 211

### C

- Chmiel J. — (patrz Suszka B., Chmiel J.) — Wyodrębnianie i oznaczanie gli-  
kozoaminoglikanów tkanki łącznej . . . . . 267
- Christiansen E. N., Wojtczak L. — Regulacja metabolizmu energe-  
tycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej . . . . . 495
- Czartoryska B. — Glikozydazy lizosomalne w katabolizmie heteropolisa-  
charydów . . . . . 229

### D

- Dominas H. — Recenzja książki „Function and Metabolism of Phospholipids  
in the Central and Peripheral Nervous Systems”, Wyd. G. Porcellati,  
Z. Amaduci i C. Galli — Advances in Experimental Medicine and Biology,  
vol. 72, 1975 . . . . . 286
- Dydyńska M. — Erol Basar — „Biophysical and Physiological Systems  
Analysis”, Addison-Wesley Publ. Company, Reading, Mass., 1976 . . . . . 288

### F

- Famulski K. St. — Niehistonowe białka chromatyny jako endogenne sub-  
straty jądrowych kinaz białkowych . . . . . 379
- Filipowicz W. — Inicjacja translacji mRNA u organizmów eukariotycz-  
nych . . . . . 21

### G

- Grabiec K. — (patrz Gonta-Grabiec K.) — Rola poliprenoli w przenoszeniu  
reszt cukrowych . . . . . 61
- Gonta-Grabiec K. — Rola poliprenoli w przenoszeniu reszt cukrowych . . . . . 61
- Gregorczyk J. — Recenzja książki „Praktische Chemie für Mediziner und  
Naturwissenschaftler”, red. H. G. Henning, W. Jugett, G. Sauer, VEB Verlag  
und Gesundheit, Berlin, 1976 . . . . . 134
- Grzelakowska-Sztabert B. — Metabolizm aminoanalogów folianu . . . . . 559

## K

- Kaliński A. — (patrz Niedźwiecka A., Kaliński A.) — Rola histonu H1 w strukturze i funkcji chromatyny . . . . . 175
- Kaniuga Z. — Recenzja książki *Horizons in Biochemistry and Biophysics*, Tom 2, red. E. Quagliariello, F. Palmieri, T. P. Singer, Addison-Wesley Publ. Comp., Reading, Mass., 1976 (Advanced Book Program) . . . . . 476
- Kańska-Brudzyńska K., Walter Z. — Struktura chromatyny . . . . . 157
- Kędzierska B. — Recenzja książki *Biological Roles of Sialic Acid*, red. A. Rosenberg, C. L. Schengrund, 1976, Plenum Press, New York, London . . . . . 478
- Kuratowska Z. — Recenzja książki *Iron and Copper Proteins*, red. K. P. Yasounobu, H. F. Mower, O. Hayashi, Tom 75 *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . . 477
- Lisowski J. — Recenzja książki *Immunologische Arbeitsmethoden*, red. Helmut Friemal, VEB Gustav Fischer Verlag, 1976, Wyd. I . . . . . 134

## Ł

- Łukasik E. — (patrz Sopata I., Wojtecka-Łukasik E.) Recenzja książki *Biochemistry of Collagen*, red. G. N. Ramachandran i A. H. Reddi, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . . 475

## M

- Mazuś B. — Polimerazy RNA eukariotów ze szczególnym uwzględnieniem polimeraz roślin wyższych . . . . . 347
- Michalak M., Sarzała M. G. — Asymetria błon biologicznych . . . . . 523
- Michalski W. P. — Struktura i funkcja błony purpurowej bakterii słonolubnych z rodzaju *Halobacterium* . . . . . 297
- Mitaszko B. — (patrz Wolska-Mitaszko B.) — Rola poliamin w syntezie białka . . . . . 399
- Muszyńska G. — Sprawozdanie z III Wszzechzwiązkowego Sympozjum nt. „Struktura i funkcja aktywnych centrów enzymów”, Puszczyca nad Oką (ZSRR), 9—12.VIII.1976 . . . . . 131

## N

- Niedźwiecka A., Kaliński A. — Rola histonu HI w strukturze i funkcji chromatyny . . . . . 175
- Nowak B. — (patrz Oderfeld-Nowak B.) — Wpływ niektórych uszkodzeń mózgu na mechanizmy cholinergiczne hipokampa . . . . . 579

## O

- Oderfeld-Nowak B. — Wpływ niektórych uszkodzeń mózgu na mechanizmy cholinergiczne hipokampa . . . . . 579
- Opieńska-Blauth J. — Wspomnienie — Prof. dr Marek Kański . . . . . 295

## P

- Paszyc St. — (patrz Bujarski J. J., Paszyc St.) — Strukturalne tionukleozydy w badaniach struktury i funkcji transferowych kwasów rybonukleinowych . . . . . 211

Pawlak A. L. — Homotropowe i heterotropowe oddziaływania w ludzkich hemoglobinie A . . . . .	417
Piechowska M. — Jednołańcuchowe frakcje dwułańcuchowego DNA . . . . .	139
Przełęcka A. — Recenzja książki XVII Supplement Acta Histochemica, wyd. Gustav Fischer, Jena — Biomorphose von Zellorganellen und Methoden ihrer submikroskopischen Untersuchung, red. prof. dr med. habil. Gunther Geyer, Instytut Anatomiczny Uniwersytetu Fr. Schillera w Jenie . . . . .	480
Przełęcka A. — Recenzja książki Methods in Membrane Biology, 7. Red. Edward D. Korn, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . .	480

## R

Rakowicz-Szulczyńska E. M. — Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów . . . . .	189
Rode W. — Syntetaza tymidylanowa . . . . .	81
Rode W. — Oczyszczanie enzymów i innych białek biologicznie czynnych poprzez chromatografię na substancjach niskocząsteczkowych unieruchomionych w fazie stałej . . . . .	113

## S

Sarzała M. G. — (patrz Michalak M., Sarzała M. G.) — Asymetria błon biologicznych . . . . .	523
Sarzała M. G. — Recenzja książki The Enzymes of Biological Membranes, red. A. Martonosi, 1976, Plenum Press, New York, London: Tom 2: — Biosynthesis of cell compounds . . . . .	283
Tom 3: — Membrane transport . . . . .	284
Sławińska D., Sławiński J. — Analiza chemiluminescencyjna w biochemii . . . . .	445
Sławiński J. — Sprawozdanie z VII Międzynarodowego Kongresu Fotobiologicznego, Rzym, 25.VIII.—3.IX.1976 . . . . .	279
Sławiński J. — (patrz Sławińska D., Sławiński J.) — Analiza chemiluminescencyjna w biochemii . . . . .	445
Sołtyk A. — Wczesne etapy oddziaływania kompetentnych bakterii z kwasami nukleinowymi . . . . .	321
Sopata I., Wojtecka-Łukasik E. — Recenzja książki Biochemistry of Collagen, red. G. M. Ramachandran i A. H. Reddi, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . .	475
Suszka B., Chmiel J. — Wyodrębnianie i oznaczanie glikozoaminoglikanów tkanki łącznej . . . . .	267
Sztabert B. — (patrz Grzelakowska-Sztabert B.) — Metabolizm aminoanalogów folianu . . . . .	559
Szukalski B. — Komórkowa i subkomórkowa topografia enzymów sterydogenezy . . . . .	95
Szulczyńska E. M. — (patrz Rakowicz-Szulczyńska E. M.) — Niehistonowe białka chromatyny jako regulatory ekspresji genów . . . . .	189

## W

Walter Z. — (patrz Brudzyńska-Kańska K., Walter Z.) — Struktura chromatyny . . . . .	157
Wojtczak L. — Sprawozdanie z XVI posiedzenia Rady FEBS, Hamburg, 25 i 31.7.1976 . . . . .	130



Wojtczak L. — Recenzja książki <i>The Enzymes of Biological Membranes</i> , red. A. Martonosi, 1976, Plenum Press, New York, London: Tom 4 — Electron transport systems and receptors . . . . .	285
Wojtczak L. — Recenzja książki H. Reinbothe „Einführung in die Biochemie”, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1975 . . . . .	286
Wojtczak L. — (patrz Christiansen E. N., Wojtczak L.) — Regulacja metabolizmu energetycznego w mitochondriach brunatnej tkanki tłuszczowej	495
Wojtecka E. — (patrz Sopata I., Wojtecka-Łukasik E.) — Recenzja książki <i>Biochemistry of Collagen</i> , red. G. N. Ramachandran, A. H. Reddi, Plenum Press, New York, London, 1976 . . . . .	475
Wolska-Mitaszko B. — Rola poliamin w syntezie białka . . . . .	399

## Z

Zborowski J. — Wymiana fosfolipidów pomiędzy błonami biologicznymi	541
Zielińska Z. — Sprawozdanie z Kolokwium nt. Biosynteza koenzymów folianowych, Dublin (Irlandia) 2—3.IX.1976 . . . . .	132
Zielińska Z. — Recenzja książki <i>Reflection on Biochemistry. In honour of Severo Ochoa</i> , red. A. Kornberg, B. L. Horecker, L. Cornudella i J. Oro, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1976	481

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

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

Ze względu na wewnętrzną spistość 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 przeznaczanego 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

J. Kwiatkowska — Rozwój poglądów na mechanizmy regulacji metabolicznych	131
J. Rytka — Genetyczna regulacja metabolizmu w drożdżach <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	151
W. Krajewska, L. Kłyszajko-Stefanowicz — Białka chromatyny komórek erytroidalnych ptaków	177
P. Chomczyński — Regulacja transkrypcji w gruczole mlecznym podczas laktogenezy	196
A. Krop-Wątarek — Budowa i właściwości biologiczne lektyn	221
A. Stankiewicz — Dezaminaza AMP	243
Z życia Polskiego Towarzystwa Biochemicznego: Sprawozdanie Komitetu Naukowo-Organizacyjnego z przebiegu XV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego (L. Zelewski)	265
Sprawozdanie Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Biochemicznego za okres VII kadencji (L. Wojtczak)	266
Protokół z IX Walnego Zebrania Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Gdańsk (M. Zydowo, Z. Aleksandrowicz)	268
Recenzje	271
Komunikaty	150, 219, 242
Spis treści — Tom XIII 1977 rok	279