

POLSKIE

TOWARZYSTWO

BIOCHEMICZNE

7.2631

Postępy Biochemii

POSTBAH 25(3)
285-464 (1979)

1979

tom 25 nr 3

PL ISSN 0032-5422



Pw

PAŃSTWOWE
WYDAWNICTWO
NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Kwartalnik „Postępy Biochemii” publikuje artykuły monograficzne omawiające wąskie tematy oraz artykuły przeglądowe referujące szersze zagadnienia z biochemii i nauk pokrewnych. Artykuły pierwszego typu winny obejmować syntetyczny przegląd postępu wiedzy w omawianej dziedzinie opracowany na podstawie piśmiennictwa z kilku ostatnich lat, a artykuły drugiego typu jedynie piśmiennictwo z ostatniego roku lub dwu lat. Kwartalnik publikuje także krótkie noty informujące o nowych i ważniejszych osiągnięciach biochemii. Przekazanie artykułu do Redakcji jest równoznaczne z oświadczeniem, że nadesłana praca nie była i nie będzie publikowana w innym czasopiśmie, jeżeli zostanie ogłoszona w „Postępkach Biochemii”. Autorzy artykułu odpowiadają za prawidłowość i ścisłość podanych informacji. Autorów obowiązuje korekta autorska. Koszty zmian tekstu w korekcie (poza poprawieniem błędów drukarskich) ponoszą autorzy. Artykuły honoruje się według obowiązujących stawek. Autorzy otrzymują bezpłatnie 25 odbitek swego artykułu; zamówienia na dodatkowe odbitki (płatne) należy zgłosić pisemnie odsyłając pracę po korekcie autorskiej.

Redakcja prosi autorów o przestrzeganie następujących wskazówek:

Forma maszynopisu: maszynopis pracy i wszelkie załączniki należy nadsyłać w dwu egzemplarzach. Maszynopis powinien być napisany jednostronnie, z podwójną interlinią, z marginesem ok. 4 cm po lewej i ok. 1 cm po prawej stronie; nie może zawierać więcej niż 60 znaków w jednym wierszu nie więcej niż 30 wierszy na stronie zgodnie z Normą Polską.

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

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

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

Dla przejrzystości tekstu obowiązuje podział artykułu na rozdziały i podrozdziały, których tytuły rzeczowo winny informować o przedstawianych treściach. Rzeczowy spis treści publikujemy bezpośrednio po tytule pracy. Rozdziały numerujemy liczbami rzymskimi, a podrozdziały odpowiednią rzymską i arabską (np. I-1.). Tytułów podrozdziałów nie wydzielonych z tekstu nie trzeba numerować. W tekście nie należy stosować żadnych podkreśleń ani rozstrzelonego druku. Ewentualne sugestie autorskie co do charakteru czcionki drukarskiej należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie maszynopisu. W przypadku umieszczenia w tekście liter alfabetu greckiego należy na marginesie wpisać ołówkiem ich fonetyczne brzmienie. Tabele i ryciny numerujemy cyframi arabskimi a wzory rzymskimi. W tekście nie należy umieszczać żadnych tablic, rycin czy wzorców, 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 doraźnie skrótów, nawet jeśli niektóre z nich bywają używane w pracach obcojęzycznych.

Galun

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1979 TOM 25 ZESZYT 3

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 25(3)
285—464 (1979)



Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (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 1979

Nakład 2.330	Oddano do składania 27.IV.79
Ark. wyd. 14,25, ark. druk. 11,25	Podpisano do druku w sierpniu 1979 r.
Pap. druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100	Druk ukończono we wrześniu 1979 r.
Zam. nr 593/79	Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

LEOKADIA KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ *)

Niejednorodność i specyficzność białek niehistonowych **)

Heterogeneity and Specificity of Nonhistone Protein

Spis treści

- I. Zarys metod otrzymywania białek NHC
- II. Niejednorodność oraz specyficzność molekularna i metaboliczna białek NHC
- III. Powinowactwo białek NHC do DNA
- III-1. Chromatografia powinowactwa na immobilizowanych DNA
- III-2. Chromatografia powinowactwa na immobilizowanych histonach
- III-3. Ultrawierowanie w gradiencie gęstości roztworów sacharozy czy metrizamidu
- III-4. Technika sączenia przez filtry nitrocelulozowe
- III-5. Poza-chromosomalne białka z powinowactwem do DNA
- IV. Specyficzność immunochemiczna białek NHC
- V. Białka NHC w tkankach nowotworowych
- V-1. Specyficzność molekularna i metaboliczna
- V-2. Specyficzność immunochemiczna
- VI. Białka NHC enzymatyczne i strukturalne

Contents

- I. General methods of NHC protein isolation
- II. Heterogeneity and molecular and metabolic specificity of NHC proteins
- III. Affinity of NHC proteins for DNA
- III-1. Affinity chromatography on immobilized DNA
- III-2. Affinity chromatography on immobilized histones
- III-3. Ultracentrifugation in saccharose or metrizamide density gradient
- III-4. Nitrocellulose filter technique
- III-5. Extra-chromosomal proteins with affinity for DNA
- IV. Immunospecificity of NHC proteins
- V. NHC proteins in cancerous tissues
- V-1. Molecular and metabolic specificity
- V-2. Immunospecificity
- VI. Enzymic and structural NHC proteins

Wykaz stosowanych skrótów: białko NHC = NHCP***) — białko niehistonowe chromatyny (*nonhistone chromatin protein*); białko UP — NHCP luźno związane z DNA;

*) Prof. dr, Zakład Biochemii, Instytut Biochemii i Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, Banacha 12/16, 90-237 Łódź.

***) Referat sympozjalny wygłoszony 8 września 1978 r. podczas XVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego w Łodzi.

***) Oba skróty stosowane są jako równorzędne w całej pracy.

białko NP—NHCP silnie związane z DNA; białko HP—histon; UC—pozostałość chromatyny po wyekstrahowaniu białek UP; HC—pozostałość chromatyny po wyekstrahowaniu białek UP i HP; NC—pozostałość chromatyny po wyekstrahowaniu białek UP, HP i NP; HMG—grupa NHCP o wysokiej ruchliwości w PAGE (*high mobility group*), ekstrahowanych z chromatyny najczęściej 0,35M roztworem NaCl, a nie strącających się po dodaniu TCA, tj. w 2% roztworze kwasu trójchlorooctowego; LMG—grupa NHCP o niskiej ruchliwości w PAGE (*low mobility group*), wytrącających się z ekstraktu chromatyny w 0,35M roztworze NaCl w obecności 2% stężenia TCA; DBP—białko wiążące się z DNA (*DNA binding protein*); TNP—nowotworowe (tumorowe) NHCP (*tumor nonhistone protein*); AP-NH—białko kwaśne o silnym powinowactwie do DNA i do nukleohistonu (*acidic protein with high affinity for DNA and nucleohistone*); Hap 2—NHCP eluowane 50mM buforem fosforanowym jako komponent drugi podczas frakcjonowania chromatyny na HPT; HPT—hydroksyapatyt; PAGE—elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (*polyacrylamide gel electrophoresis*); IF—ogniskowanie izoelektryczne (*isoelectric focusing*); Gua·Cl—chlorowodorek guanidyny; 3'MDAB—doustny karcynogen zawierający 10% oleju kukurydzy (Mazola) i 0,06% N,N-dwumetylo-*p*-/m-tolylazo/aniliny rozpuszczonej w Mazola; DMH—1,2-dwumetylohydrazyna; m.c.—masa cząsteczkowa; AT—sekwencja DNA bogata w pary adenina—tymina; C_0t —wyrażenie oceniające reakcję reasocjacji i powtarzalność sekwencji DNA; iloczyn z wyjściowego stężenia roztworu DNA zdenaturowanego (mole nukleotydów w 1 litrze) i czasu reasocjacji wyrażonego w sekundach. Sekwencje powtarzające się reasocjują przy niskich wartościach C_0t ; DFP—dwuizopropylodifluorofosforan; PMSF—fenylometrylo-sulfonylofluorek.

Zagadnienie niejednorodności i specyficzności białek niehistonowych (białka NHC=NHCP) stało się przedmiotem niniejszego referatu z tego względu, że te dwie ich właściwości reprezentują jednocześnie dwa główne wymagania stawiane cząsteczkom kandydującym na stanowisko regulatorów genowych.

Pod koniec lat sześćdziesiątych okazało się, że tym dwu nieodzownym warunkom nie odpowiadają w pełni histony—permanentne represory genowe, doskonale zakonserwowane w procesie ewolucji molekularnej (1—3). Jednocześnie obserwowano powszechnie precyzyjną regulację funkcji genów (4, 4a). Nic więc dziwnego, że rozpoczęło się gorączkowe poszukiwanie innych kandydatów na omawiane stanowisko, ze zrozumiałych względów wśród komponentów chromatyny. Uwaga badaczy skoncentrowała się na białkach chromosomalnych innych niż histony, tj. na białkach niehistonowych.

Wobec szeregu niedawnych krajowych przeglądów, dotyczących białek NHC (5—11) oraz organizacji i funkcjonowania genomu *Eucaryota* (12—16), artykuł niniejszy ograniczy się do przedstawienia tylko niektórych danych, bądź mniej eksponowanych w zacytowanych publikacjach, bądź nowszych, zwłaszcza w zakresie specyficzności molekularnej jak i metabolicznej białek NHC, i to w cyklu komórkowym oraz w różnicowaniu, z pełnym pominięciem ich udziału w swoistości transkrypcji narządowej i tkankowej.

I. Zarys metod otrzymywania białek NHC

Obecność w jądrach komórkowych białek nierozpuszczalnych w rozcieńczonych roztworach kwasów mineralnych, jak histony, a więc białek NHC, zostało zasygnalizowane już pod koniec XIX stulecia przez Lillienfielda (17). Jednak białka niehistonowe chromosomalne zostały uzyskane po raz pierwszy dopiero przez Mirsky'ego i Pollistera (18) w 1946 r. Były to istotnie białka dezoksyrybonukleoprotein niestrącalne z dezoksyrybonukleohistonem w 0,14M roztworze NaCl. Technika ta niemal 20 lat później została wykorzystana w laboratorium Wanga (19, 20) z Buffalo, dostarczając jedynie łatwiej ekstrahowanych białek NHC.

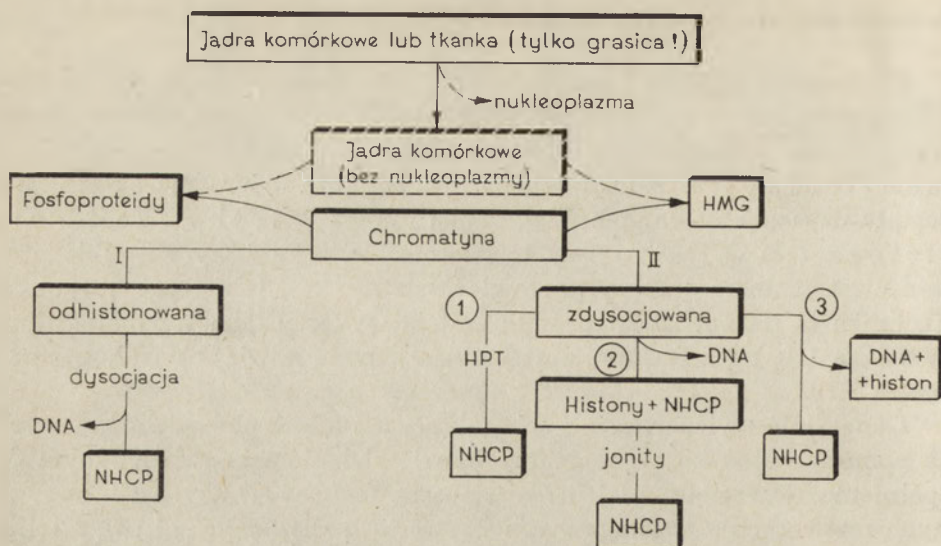
Generalnie wyizolowanie i scharakteryzowanie białek niehistonowych za pomocą metod konwencjonalnych było zadaniem bardzo trudnym do spełnienia ze względu na ich nierozpuszczalność w wodnych zbuforowanych roztworach o fizjologicznych wartościach siły jonowej i pH, a także silną tendencję do agregacji.

Nic więc dziwnego, że pod koniec lat sześćdziesiątych, dosłownemu „wybuchowi” zainteresowania dla białek NHC, zaczęło towarzyszyć poszukiwanie coraz to nowych technik mających ułatwić ich solubilizację i wymontowanie z kompleksu chromatynowego (21). Warto odnotować wprowadzenie w tym celu dezoksychoalanu sodu (22), siarczanu dodecyłu sodu, (SDS) (23, 26), wysokich stężeń mocznika (24, 25), chlorku guanidyny (Gua·Cl) (27, 28), chlorku cezu (26) kwasu mrówkowego (29), czy wreszcie fenolu (30), zwłaszcza zbuforowanego (31), dla wydzielenia pewnej frakcji białek niehistonowych, tzw. fenolorozpuszczalnych fosfoprotein.

Od doświadczeń w laboratorium Johnsa (32) w Londynie przedmiotem badań jest również frakcja białek NHC łatwiejsza do wydzielenia, bo rozpuszczalna w 0,35M roztworze NaCl, tzw. białka HMG (*high mobility group*).

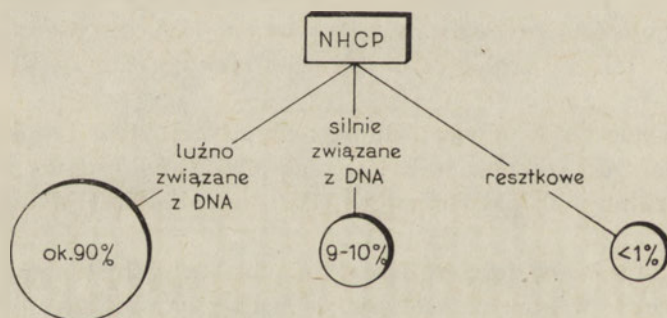
Obecnie stosowane metody izolowania białek niehistonowych dają się ująć w 2 grupy, w których startuje się bądź z chromatyny, bądź z jąder komórkowych bez nukleoplazmy (Ryc. 1).

W obu nieodzowne jest zdysocjowanie kompleksu chromatynowego, najczęściej w środowisku wysokich stężeń soli oraz mocznika lub Gua·Cl (33) z tym, że ta dysocjacja w pierwszej grupie metod dotyczy chromatyny już odhistonowanej, a w drugiej całości chromatyny. W obu seriach uzyskanie białek niehistonowych poprzedzają etapy usunięcia DNA na drodze ultrawierowania (24, 35—37), trawienia DNazą (38, 39), strącenia chlorkiem lantanu (40), filtracji żelowej na Bio-Gel A-50m (44—46) czy Sepharose 4B (27), chromatografii na hydroksyapatycie (wraz z rozfrakcjonowaniem białek) (47—49) lub za pomocą układu polimerów dekstran — glikol polietylenowy (41—43), zaś w drugiej grupie metod —



Ryc. 1. Zestawienie ważniejszych metod izolowania białek NHC.

Dysocjacja chromatyny: 2–3M NaCl ±5–8M mocznik (lub 4M Gua·Cl) ±SDS (33). Usunięcie histonów: 0,1–0,5M HCl lub H₂SO₄ (33); 2M NaCl–5M mocznik–50mM bufor bursztynianowy (pH 5,0) (34). Usunięcie DNA: ultrawirowanie (24, 35–37); trawienie DNazą (38,39); strącenie LaCl₃ (40); odwirowanie zdysocjowanej i sonifikowanej chromatyny w układzie dekstran–glikol polietylenowy (41–43); filtracja na żelu Bio-Gel A-50m (44–46) lub Sepharose 4B (27); chromatografia na hydroksypatycie (w tym oddzielenie od histonów i frakcjonowanie NHCP) (47–49); usunięcie dezoksynukleohistonu (20, 33). Oddzielenie NHCP od histonów: na kationitach, np. Amberlite CG–50 (36), Bio-Rex 70 (37, 50), CM-Sephadex (27), CM-celuloza (38), Sp-Sephadex (28, 45) lub na anionitach, np. QAE-Sephadex (24, 28, 51), DEAE–celuloza (52)

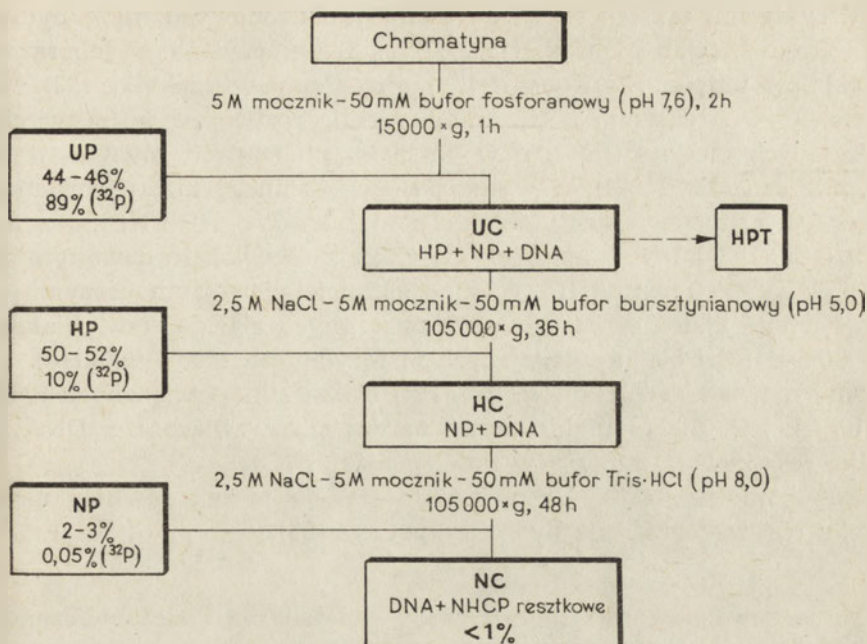


Ryc. 2. Ogólny podział białek NHC

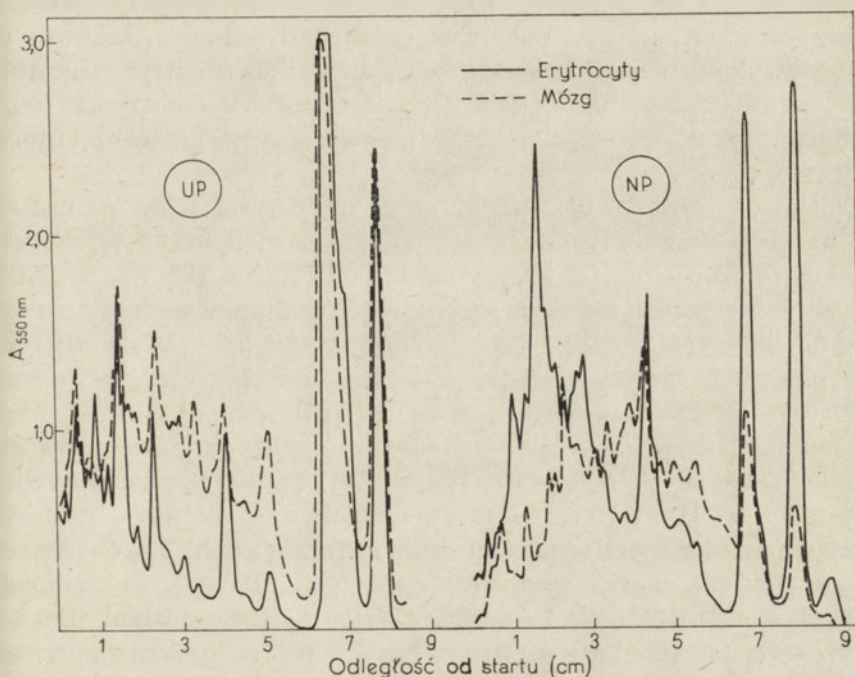
usunięcia histonów, najczęściej w wyniku wymiany jonowej na kationitach (27, 28, 36–38, 45, 50) lub anionitach (24, 28, 51, 52), a nawet oddzielenia dezoksyrybonukleohistonu (20, 33).

Istnieją również metody izolowania pewnych frakcji białek NHC, np. fosfoprotein (53, 54) czy białek HMG (32).

Wydaje się, że na podstawie kryterium rozpuszczalności białka niehistonowe można podzielić na 3 grupy, tj. luźno, silnie i bardzo silnie związane z DNA; ostatnie reprezentują sobą, tzw. białka niehistonowe resztkowe (Ryc. 2).



Ryc. 3. Zestawienie frakcjonowania dostarczającego białek NHC luźno związanych z DNA (UP), a ponadto histonów (HP) i białek NHC silnie związanych z DNA (NP) w wyniku ultrawirowania (34) bądź chromatografii na hydroksyapatycie (55)



Ryc. 4. Profile densytometryczne (PAGE—SDS) białek NHC luźno—(UP) i silnie związanych z DNA (NP) z tkanek kurczęcia (55)

Przykładem takiego rozdziału białek niehistonowych może być technika frakcjonowania chromatyny (Ryc. 3) opracowana w laboratorium H Nilicy najpierw w Houston (34), a następnie w Nashville (55).

Selektywna ekstrakcja chromatyny seria roztworów buforowych zawierających mocznik (5M), a w późniejszych etapach również wysokie stężenia soli (2M NaCl), w wyniku wielogodzinnego ultrawierowania dostarcza w 3 supernatantach białek chromatyny (UP, HP i NP), a w 3 osadach (UC, HC i NC) — kompleksów DNA z niewyeksahowanymi białkami. Poza histonami (HP) w supernatancie pierwszym otrzymuje się główną pulę białek NHC, tj. luźno związanych z DNA, tzw. białek UP (ok. 90% całości białek, ulegających fosforylacji *in vivo* i *in vitro*), a następnie niewielki odsetek (ok. 9—10%) białek silnie związanych z DNA, tj. białek NP. Białka niehistonowe bardzo silnie związane z DNA, tzw. białka resztkowe obecne są w ilości poniżej 1%.

Po usunięciu białek UP pozostałe frakcje można również uzyskać w toku chromatografii na hydroksyapatycie (55).

II. Niejednorodność oraz specyficzność molekularna i metaboliczna białek NHC

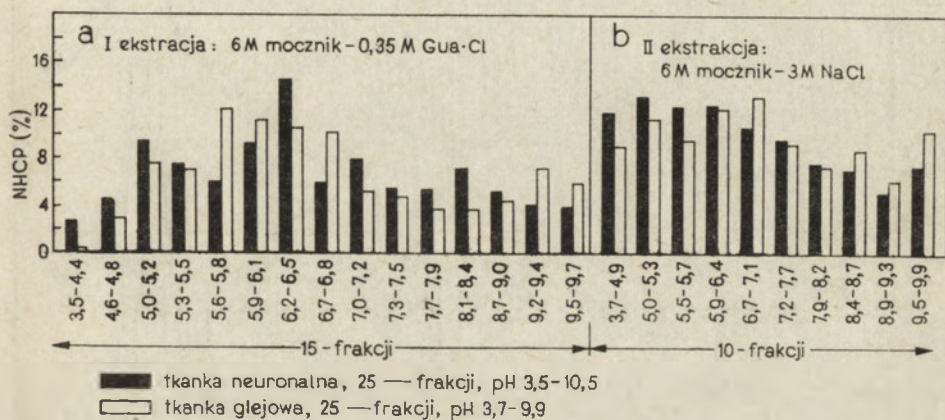
Całość białek niehistonowych, czy ich frakcje to jeszcze gęszcz komponentów (Ryc. 4), które można chociaż częściowo rozszyfrować w toku elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS (przesiew łańcuchów polipeptydowych wg ich mas cząsteczkowych) jednokierunkowej (56—59) lub dwukierunkowej (60—62), ogniskowania izoelektrycznego (63, 64) (IF; sito cząsteczek białkowych wg ich ładunków elektrycznych), czy kombinacji tych 2 technik (49, 65—68), nawet z wprzęgnięciem autoradiografii (69).

Dzięki zastosowaniu tych metod patrzymy dziś na białka niehistonowe jako na duży zbiór indywidualnych łańcuchów polipeptydowych lub ich zespołów, w sumarycznej liczbie od kilkudziesięciu (55, 70) do kilkuset (69), a nawet ponad 500 komponentów (71). Stanowią one przeważnie od 50 do około 150% całości DNA w chromatynie (72, 73), ale w chromatynie gruczołów jądrowych pstrąga — tylko 5% (74). Cechuje je szeroki wachlarz mas cząsteczkowych (od ok. 5 000 do ponad 150 000) (55, 70), punktów izoelektrycznych (3,7—9,0) (70) i stosunków aminokwasów kwaśnych do zasadowych (0,8—4,0) (70, 75, 76). Białka te często zawierają tryptofan (do ok. 1%) (76), a także aminokwasy ulegające post-syntezy modyfikacjom w postaci grup fosforanowych (8, 77, 78), acetylowych (78—80), metylowych (78), tiolowych (81—83), czy polimerów ADP-rybozy (84—85). Warto odnotować, że w laboratorium Buscha (86, 87) wyizolowano pierwsze białko NHC w postaci glikoproteiny, z łańcuchem 15 reszt N-acetyloglukozaminy.

Najwyższym obecnie wyrazem szeroko zakrojonej niejednorodności

białek niehistonowych może być wręcz szokująca publikacja sygnałna Heleny Fleischer-Lambropoulos (71), o sumarycznej ilości około 1200 białek NHC w tkance neuronalnej i glejowej mózgu szczura, z zapowiedzią dalszego, zapewne gigantycznego przeglądu ich właściwości fizykochemicznych.

W wyniku preparatywnego ogniskowania izoelektrycznego w aparacie Valmeta (88) białek NHC wyekstrahowanych po tzw. I (6M mocznik — 0,35M Gua·Cl) i II dysocjacji (6M mocznik — 3M NaCl), otrzymano w sumie z tkanki neuronalnej i glejowej po 25 frakcji o punktach izoelektrycznych w zakresie pH 3,5—10,5 (Ryc. 5).

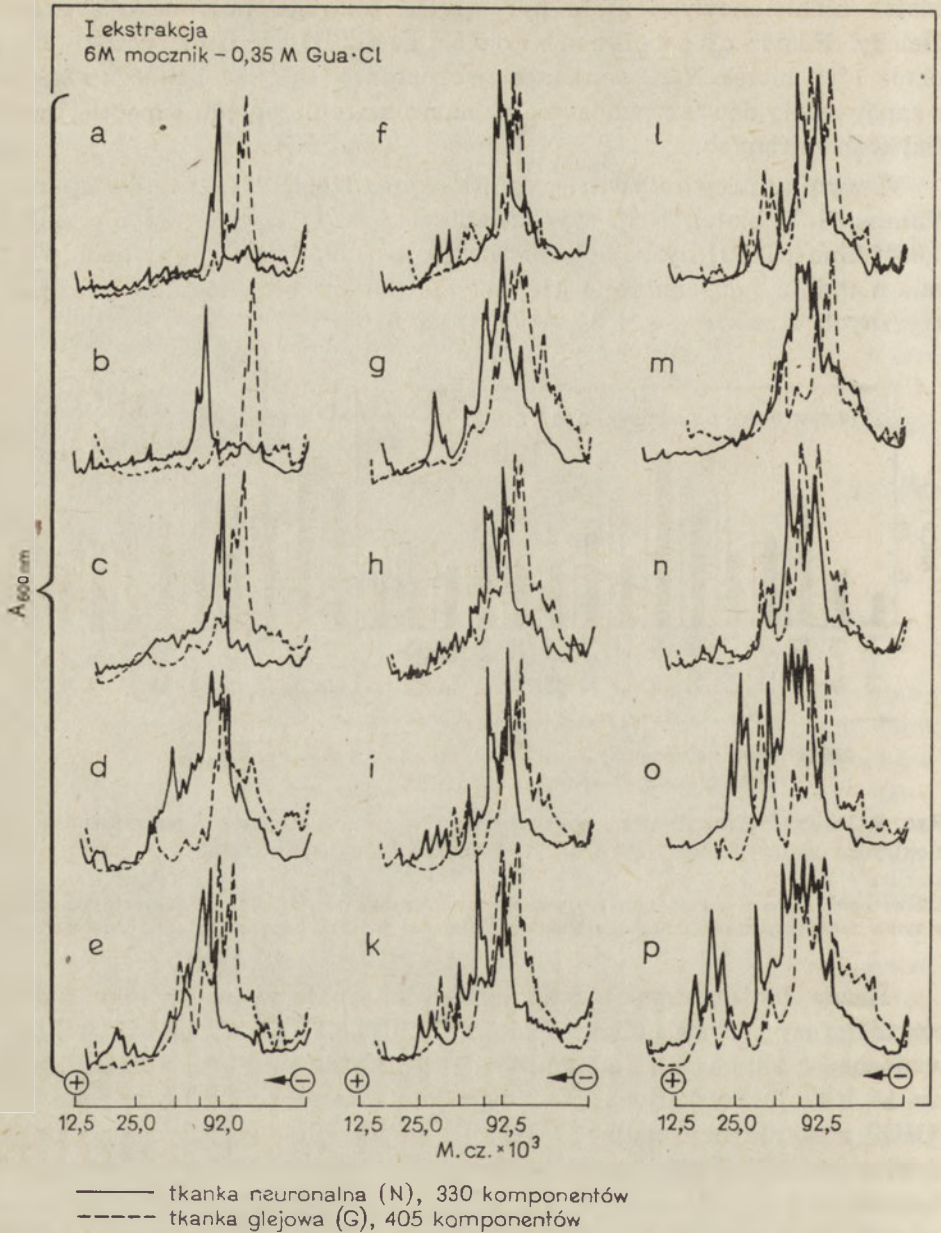


Ryc. 5. Diagram frakcji uzyskanych w wyniku preparatywnego ogniskowania izoelektrycznego (88) białek NHC z I i II ekstraktu tkanki neuronalnej i glejowej mózgu szczura (71)

Liczby pod ryciną ilustrują punkty izoelektryczne uzyskanych frakcji białkowych; po stronie a tylko dane dotyczące tkanki neuronalnej, po stronie b tylko dane dotyczące tkanki glejowej.

Każda z otrzymanych frakcji została zanalizowana w toku mikroelektroforezy w żelu poliakryloamidowym (1—2 μg białka na 1 żel) prowadzonej w kapilarach o pojemności 10 μl . Rozdział mikroelektroforetyczny 15 frakcji uzyskanych po I dysocjacji dostarczył 330 komponentów NHCP z tkanki neuronalnej i 405 — z tkanki glejowej (Ryc. 6), demonstrując nie tylko wybitną niejednorodność białek NHC, ale również ich specyficzność molekularną w 2 tkankach tego samego narządu, tj. mózgu szczura. Obok szeregu pasm wspólnych stwierdza się bezsporne różnice ilościowe, a co najważniejsze jakościowe w profilach densytometrycznych białek NHC obu tkanek.

Szokujące są również niedawne wyniki chemicznej i elektroforetycznej analizy białek 2 typów z chromatyny (z rozbitej mechanicznie), tj. eu- i heterochromatyny (89, 90), rozdzielonych w toku ultrawierowania (990 000xg) w gradiencie stężenia glicerolu (91). Od badań Frenstera (92) wiadomo, że te 2 typy chromatyny, odmienne pod względem ultra-



Ryc. 6. Profile absorpcji w 600 nm (PAGE-SDS, mikroelektroforeza) 15 frakcji uzyskanych w wyniku preparatywnego ogniskowania izoelektrycznego białek NHC I ekstraktu tkanki neuronalnej i glejowej mózgu szczura (71)

struktury i funkcji, cechuje prawie jednakowa ilość histonów, a odmienna, na korzyść euchromatyny, zawartość białek NHC. W doświadczeniach Montagny i wsp. (90) wręcz odwrotnie: 1,5-krotnie wyższa ilość hi-

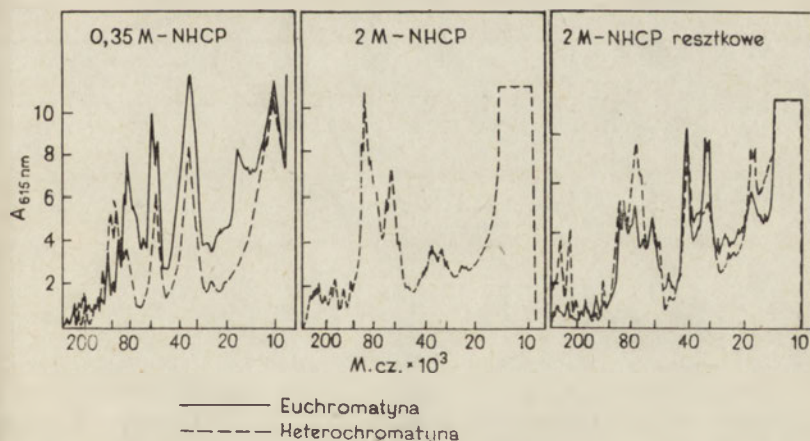
stonów w heterochromatynie przy braku różnic w zawartości białek NHC (Tab. 1). Rozfrakcjonowanie chromatyny budzi jednak zaufanie z uwagi na 7—9-krotnie wyższą aktywność matrycową euchromatyny niż heterochromatyny (90, 91). Ponadto w euchromatynie brak zupełnie białek NHC silnie związanych z DNA, białek luźno związanych jest 4-krotnie więcej, a tzw. resztkowych 2-krotnie mniej niż w heterochromatynie.

Tabela 1

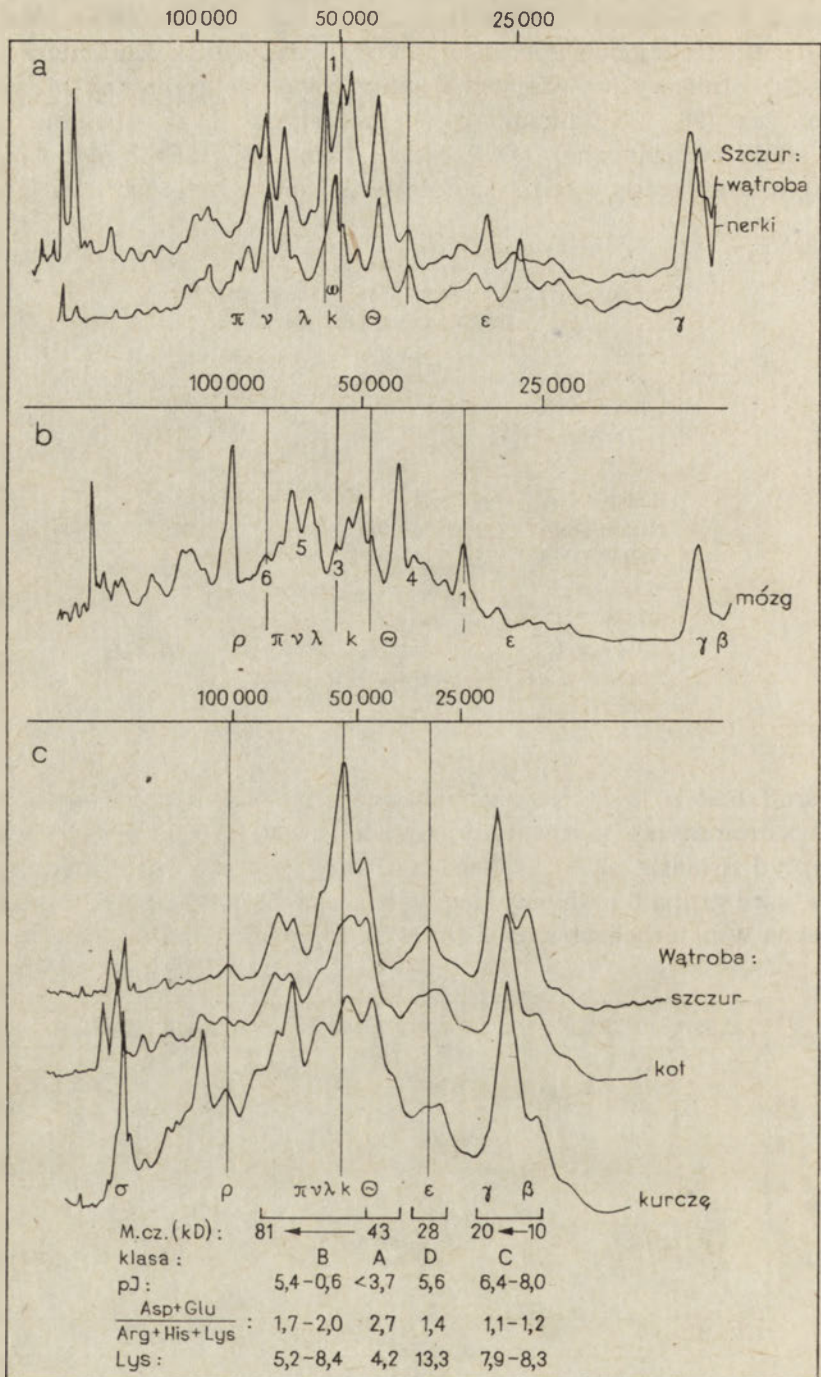
Charakterystyka chemiczna eu- i heterochromatyny wątroby szczura (89, 90)

Składnik lub frakcja NHCP	Euchromatyna	Heterochromatyna
Białko/DNA	$2,43 \pm 0,10$	$1,81 \pm 0,04$
Histon/DNA	$0,94 \pm 0,03$	$1,43 \pm 0,04$
NHCP/DNA	$0,77 \pm 0,02$	$0,74 \pm 0,02$
	(μg białka/mg DNA)	
0,35M—NHCP	460 ± 21	123 ± 15
2,0M—NHCP	—	34 ± 7
2,0M—resztkowe NHCP	310 ± 12	579 ± 29

Wśród białek luźno związanych z DNA dominują, zarówno w eu- i heterochromatynie, polipeptydy o masie 12 000, 35 000 i 54 000, jednakże polipeptyd o masie około 18 000 — unikalny jest dla euchromatyny, podobnie jak i grupa 6 polipeptydów, w zakresie 58 000—90 000, praktycznie nieobecna w heterochromatynie (Ryc. 7). Tę grupę odnajduje się zapewne



Ryc. 7. Profile densytometryczne 3 frakcji białek NHC eu- i heterochromatyny wątroby szczura (90)



Ryc. 8. Zestawienie profili densytometrycznych (PAGE—SDS) białek NHC 3 tkanek szczura (a i b, bufor glicynowy) oraz wątroby 3 gatunków (c, bufor fosforanowy) (98), a także ich ogólnej charakterystyki (99)

(Omyłkowo zakres pH punktów izoelektrycznych zamiast 5,4—6,8 podano jako 5,4—0,6)

wśród białek silnie związanych z DNA. W populacji białek NHC resztkowych — 2 polipeptydy, o masie wyższej od 200 000, występują w heterochromatynie w ilości 5-krotnie wyższej niż w euchromatynie. Zauważa się też zmiany jakościowe: rozdwojony szczyt białka o masie około 35 000 przy pojedynczym w heterochromatynie, a odwrotną sytuację w przypadku komponentu o masie około 20 000.

Z uwagi na ostatnie artykuły (93, 94), wskazujące na niebezpieczeństwo proteolizy w ocenie niejednorodności i specyficzności molekularnej białek NHC, ograniczę się w przedstawieniu tego zagadnienia do zacytowania tylko niektórych publikacji, bądź dotyczących białek NHC izolowanych wobec miarodajnych inhibitorów proteazy histonowej, bądź bardziej kluczowych. Oczywiście będą to wyniki badań poprzedzających pracę *Fleischer-Lambropoulos* (71), a więc przeprowadzonych za pomocą konwencjonalnej analizy elektroforetycznej w żelu poliakrylamidowym z SDS (54, 57—59) lub z mocznikiem w środowisku kwaśnym (95).

Od 1970 r. szkoła *Bonnera* (96) w Pasadenie lansuje teorię tzw. limitowanej niejednorodności, a od 1972 r. — również limitowanej specyficzności białek NHC (29, 97). Rycina 8 ilustruje zestawienie densytogramów białek NHC 3 tkanek szczura (wątroba, nerka, mózg) oraz wątroby 3 gatunków (szczur, kot i kurczę) (98, 99).

Autorzy wyróżniają 10 grup frakcji, oznaczonych literami greckimi (od α do ϱ), wśród których wyodrębniają w zakresie mas cząsteczkowych od 10 000 do 81 000 4 klasy (A—D) komponentów częściowo scharakteryzowanych pod względem punktów izoelektrycznych (pH 3,7—8,0), wartości stosunków sumy aminokwasów kwaśnych do zasadowych (1,1—2,7), a także zawartości lizyny (4,2—13,3 mol⁰/o). Komponenty klasy A i D reprezentują sobą raczej indywidualne białka, tj. Θ i ϵ , odpowiednio. To ostatnie, z uwagi na wysoką zawartość aminokwasów kwaśnych (27,8 mol⁰/o) jak i zasadowych (19,9 mol⁰/o) oraz masę cząsteczkową (28 000) zdaje się należeć do białek HMG (32).

W załączonych densytogramach (Ryc. 8) dominuje 10—20 wybitniejszych komponentów, które stanowią około 50—75% całości (100), obok 20—40 słabiej reprezentowanych. Profile desyntometryczne są analogiczne w obszarze niskocząsteczkowych frakcji ($\leq 40 000$); w rejonie średnich mas cząsteczkowych (40 000—100 000) obserwuje się pewną specyficzność tkankową i gatunkową, najbardziej eksponowaną w przypadku mózgu, który cechuje się unikalnym wzorem obrazu elektroforetycznego, z dominacją wysokocząsteczkowych białek NHC (29).

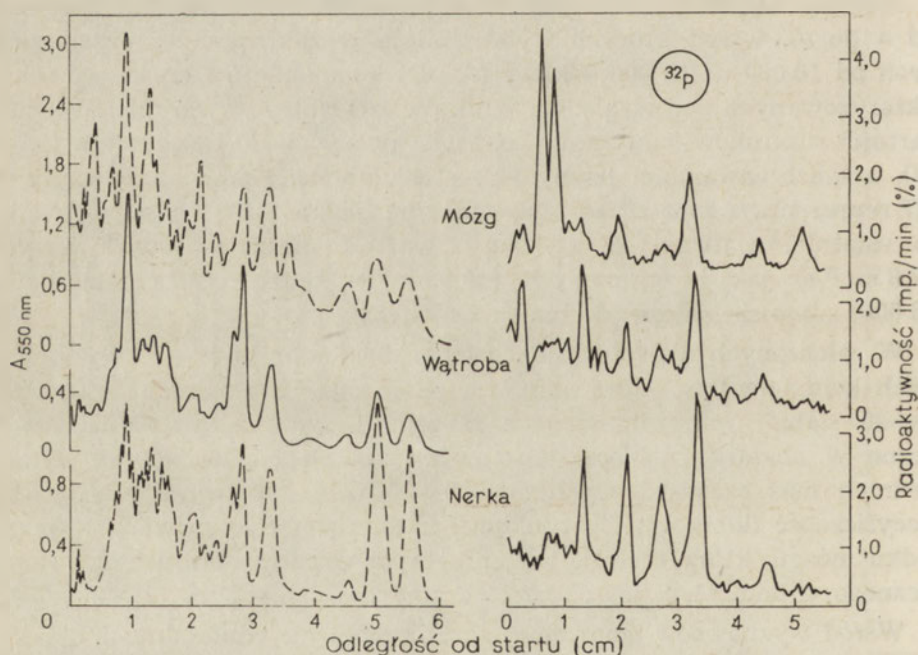
Wśród wyznawców omawianej ograniczonej niejednorodności, a także specyficzności tkankowej i gatunkowej białek NHC, i to zarówno molekularnej jak i metabolicznej, wymienić należy przynajmniej profesorów: *Paula* w Glasgow (48, 101), *Tsaneva* w Sofii (102—104), *Buscha*

w Houston (61, 105) oraz Holoubka w Galveston (106—108) i ich współpracowników.

Odnosi się wrażenie, że przeciwko tej koncepcji limitowanej niejednorodności i specyficzności białek NHC występują Platz i Kleinsmith (109), zarzucając, że w przypadku prac z laboratorium Bonnera (29, 96, 97) została ona oparta na wynikach: 1) badania białek NHC z tkanek zamrożonych, w których dochodzi do zubożenia ilości frakcji wysokocząsteczkowych, 2) porównania komponentów silniej reprezentowanych, z pominięciem niejednorodności i specyficzności być może zlokalizowanej w białkach występujących w małych ilościach, oraz 3) analizy elektroforetycznej pełnej puli białek NHC, bez etapów ich oczyszczania i zatężenia, które ujawniają frakcje niewykrywalne w operowaniu całością.

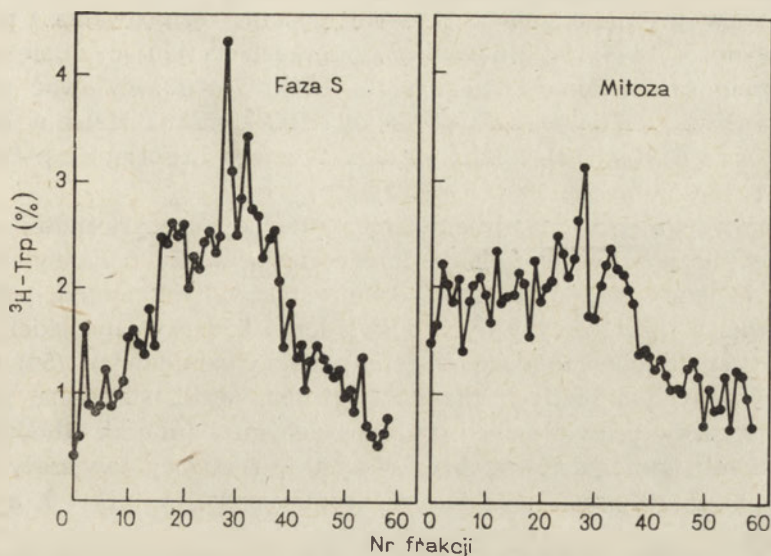
Z wymienionych przyczyn autorzy porównali profile densytometryczne tylko pewnego gatunku NHC, tj. fosfoprotein jądrowych (53), w tym znakowanych *in vivo* radioaktywnym ortosforanem, a otrzymanych m.in. z jąder komórkowych 3 świeżych tkanek szczurów (wątroba, nerki, mózg), dowodząc wyższego rzędu specyficzności molekularnej, a zwłaszcza metabolicznej (Ryc. 9).

Odmienne wzory ufosforylowania białek NHC w doświadczeniach Platza i Kleinsmitha (109), zwłaszcza w zestawieniu tkanki

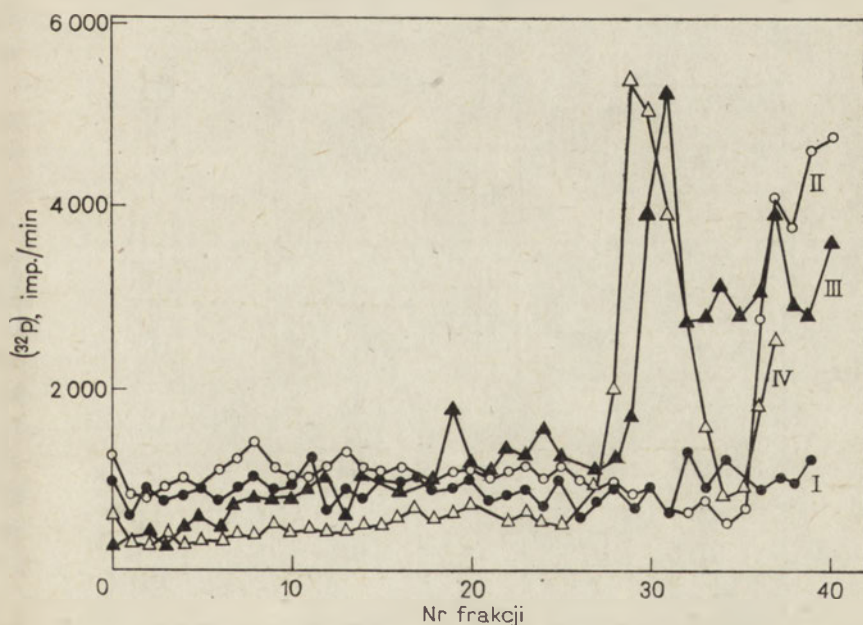


Ryc. 9. Zestawienie profili densytometrycznych (PAGE—SDS) fosfoproteidów z 3 tkanek szczura oraz włączenia w nie [^{32}P] ortofosforanu *in vivo* (wątroba i nerka) oraz *in vitro* (mózg) (109)

mózgowej z wątrobą czy nerką, nie budzą zastrzeżeń, ponieważ dotyczą frakcji wolnej od zanieczyszczeń kwasami nukleinowymi, które w przypadku mocnego związania z białkami, a przez to wspólnej wędrówki



Ryc. 10. Profile elektroforetyczne (PAGE—SDS) białek NHC syntetyzowanych w 2 fazach cyklu komórkowego HeLa S₃ (121)



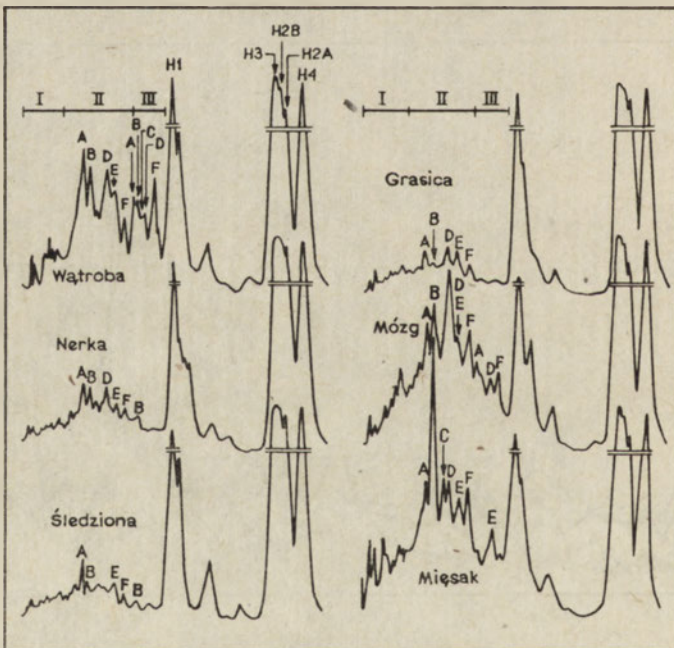
Ryc. 11. Profile elektroforetyczne (PAGE—SDS) białek NHC z mioblastów (Yaffe L₆) inkubowanych z [γ -³²P] ATP w okresie 4 stadiów miogenezy: I (●—●), 3—4 dni; II (○—○), 6. dzień; III (▲—▲), 7. dzień; IV (△—△), 9. dzień (117)

w żelu poliakryloamidowym, mogą stać się przyczyną poważnych błędów w ocenie ilości włączanego radioaktywnego fosforanu (110).

Wręcz dramatyczne zmiany wewnątrzjądrowego stężenia poszczególnych białek NHC, ich fosforylacji oraz szybkości syntezy obserwowano podczas rozwoju organizmów (111—113), podczas różnicowania i proliferacji komórek (114—118), a nawet w komórkach znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego (119—121). Warto zacytować różnice w włączaniu L-[³H] tryptofanu w białka NHC komórek HeLa w okresie mitozy i fazy S (Ryc. 10), a także radioaktywnego fosforanu z [γ -³²P]ATP podczas 4 stadiów miogenezy (Ryc. 11).

W rozstrzygnięciu zagadnienia molekularnej specyficzności białek NHC (specyficzności obrazu elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym), a badanej za pomocą powszechnie stosowanych metod, pomocne są niedawne wyniki precyzyjnych doświadczeń badaczy japońskich (122). Dotyczyły one zachowania się w żelu poliakryloamidowym (59) białek chromosomalnych 5 różnych tkanek (wątroba, nerki, śledziona, grasica i mózg) szczurów prawidłowych oraz nosicieli guza (mięsak Rhodamine), a także tkanki samego nowotworu. Wszystkie roztwory zawierały 1 mM DFP, inhibitor aktywności proteazy chromatynowej w pH 7,5, a także 4,5 i 10,0 (123).

Zawartość białek NHC w badanych tkankach szczura, prawidłowych i mięsaka, zmieniała się następująco: mięsak (5,1) \gg mózg (3,6) \gg wątroba



Ryc. 12. Profile desyptometyczne (PAGE—SDS) białek chromosomalnych różnych tkanek szczura prawidłowych i mięsaka (Rhodamine); 3 grupy mas cząsteczkowych: I (> 100 000), II (40 000—100 000) i III (30 000—40 000) (122)

(3,3) \gg nerki (1,6) śledziona (1,1) \gg grasica (1,0); liczby w nawiasach podają wartości względne. Rozwój mięsaka obniża ilość białek NHC w tkankach nosicieli guza, zwłaszcza w wątrobie, co dotyczy głównie frakcji o masie 52 000, a także 6 komponentów w regionie 30 000 i 40 000. W elektroferogramach dawało się wyodrębnić około 50 pasm, podczas gdy na profilach densytometrycznych — tylko 35 (Ryc. 12).

Porównanie densytogramów pozwala zauważyć identyczność w obrazie histonów nukleosomalnych, niewielką odmienność w histonie pozanukleosomalnym, tj. H1, a znaczną — w białkach NHC. Wśród nich, dla przejrzystości, wyodrębniono na podstawie mas cząsteczkowych 3 grupy, tj. I ($> 100\ 000$), II (40 000—100 000) oraz grupę III (30 000—40 000) i oznaczono literami alfabetu większe komponenty w grupie II i III. Można łatwo zaobserwować zmianę zawartości białek NHC w poszczególnych 3 grupach idąc od tkanki do tkanki, a także pewne prawidłowości: dominację grupy II, jako całości, oraz jej większych komponentów, tj. IIA (71 000), IIB (64 000), IID (52 000), IIE (48 000) i IIF (43 000), a ponadto największą zmienność w ogólnej zawartości białek NHC, jak i w profilach densytometrycznych w grupie III (wątroba $>$ mózg $>$ mięsak \gg śledziona \gg nerki $>$ grasica). Zdaniem autorów tkankowo specyficzne białka NHC są zlokalizowane w regionie 30 000—40 000, a białka IIC (54 000) i IIIE (34 000) są specyficzne dla tkanki nowotworowej.

W ścisłym związku z zagadnieniem specyficzności molekularnej białek NHC pozostaje od kilku lat wciąż jeszcze kontrowersyjna sprawa udziału białek kurczliwych w strukturze i funkcji jądra komórkowego oraz jego komponentów, głównie chromatyny.

W 1975 r. w laboratorium Bonnera (124) wykazano, że w densytogramach (PAGE-SDS) białek NHC chromatyny wątroby szczura niemal połowę ogólnej puli stanowi kilkanaście (12—18) polipeptydów, wśród których znajdują się komponenty białek kurczliwych, tj. 2 dominujące, jak miozyna (ok. 220 000) i aktyna (ok. 45 000), 3 mniej wybitne (tubulina — 50 000, α - i β - tropomiozyna — 32 000 i 34 000), a także przypuszczalne produkty strawionej miozyny (68 000, 65 000 i 24 000). Białka kurczliwe reprezentowały około 38% białek niehistonowych chromatyny izolowanej z pełnego homogenatu wątroby bądź z jąder komórkowych, a wykazującej odpowiednio 8 i 4% zanieczyszczenia białkami cytoplazmatycznymi (metoda izolowania chromatyny w obecności znakowanych izotopowo białek cytoplazmy) (125). Podobne obserwacje, tj. że pewne białka NHC mają szybkość wędrówki zbliżoną do białek mięśniowych, znalazły się również w publikacji Comingsa i Harrisa (126) z 1975 r. W rok później ci sami autorzy (127) wycofali się jednak z tego stanowiska w wyniku bardzo wnikliwych badań porównawczych nad zachowaniem się elektroforetycznym w żelu poliakryloamidowym białek miofibryli, a także białek cytoplazmy, nukleoplazmy oraz białek niehistonowych chromatyny, otrzymywanej z pełnych lizatów komórkowych bądź z bardzo

czystych jąder komórkowych wątroby myszy, przy użyciu — jak zawsze w doświadczeniach Comingsa (126, 127, 130) — inhibitorów proteaz (10^{-4} M CdSO₄, 10^{-3} M NaHSO₃, $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ inhibitora sojowego trypsiny, pH 7,0). Oni wypowiadają się autorytatywnie, że aktyna, miozyna, tubulina i tropomiozyna, jeżeli w ogóle są obecne w chromatynie, stanowią tylko bardzo niewielki odsetek ($< 2\%$) białek NHC. (Komponenty wędrujące w pozycjach α - i β - tropomiozyny wydają się odpowiadać białkom sprzężonym z HnRNA). Większy udział białek kurczliwych wśród NHCP zdarza się tylko wtedy, gdy chromatynę otrzymuje się z surowych homogenatów tkanki zamiast z czystych jąder komórkowych.

Białka kurczliwe zostały wykryte ponad wszelką wątpliwość w jądrach komórkowych *Physarum polycephalum* (114, 128, 129). Jednak ten organizm, w przeciwieństwie do większości *Eucaryota*, cechuje się mitozą wewnątrzjądrową i aktyna, miozyna, tubulina oraz tropomiozyna są częścią wewnątrzjądrowego wrzeciona kariokinetycznego. Znacznym zmianom w morfologii i aktywności jąder komórkowych u *Physarum polycephalum* towarzyszą zmiany w ilości wewnątrzjądrowej aktyny. Le St o - u r g e o n (114) oraz C o m i n g s i O k a d a (130) rozważają możliwość udziału aktyny w procesie kondensacji charakterystycznej dla heterochromatyny.

Sprawa uczestnictwa białek kurczliwych w strukturze chromatyny nadal nie jest definitywnie rozstrzygnięta. Miozyna, aktyna, tropomiozyna i białko przypominające podjednostkę C tropomiozyny zostały wykryte w cytoplazmatycznej i jądrowej frakcji fibroblastów (131, 132), miozyna i aktyna — we wrzecionie mitotycznym (133), a aktyna — we włóknach biegnących od kinetoforów (centromerów) do biegunów tego wrzeciona (134). Wychodząc z założenia, że białka strukturalne chromatyny muszą oddziaływać z DNA, C o r c e s i A v i l a (135) badali interakcję białek kurczliwych z DNA za pomocą techniki filtrów nitrocelulozowych. Dowiedli oni silnego powinowactwa miozyny i troponiny, a słabszego tropomiozyny wobec DNA i braku wiązania z nim aktyny. Białka kurczliwe preferowały bardziej DNA jednołańcuchowy (zdenaturowany) niż podwójnie łańcuchowy, czy RNA, a wśród natywnych — DNA eukariotyczny (fibroblasty chomika syryjskiego) od DNA faga.

W czasie indukowanej przez aktynomycynę D masowej kondensacji chromatyny u *Amoeba proteus* (136) dochodzi do silniejszego związania aktyny w jądrach komórkowych w porównaniu z kontrolnymi jądrami interfazowymi (stężenie aktyny takie samo w jądrze i cytoplazmie). Fakt ten przemawia raczej za udziałem aktyny w kondensacji chromatyny podczas mitozy, niż za jej przemieszczeniem z cytoplazmy do jądra tylko na skutek przepuszczalności osłonki jądrowej (136).

III. Powinowactwo białek NHC do DNA

Dominującą cechą białek zaangażowanych w strukturę chromatyny i regulowanie czynności genów winna być zdolność do odwracalnego wiązania się z określonymi sekwencjami nukleotydowymi DNA. Istnienie takich białek zostało udokumentowane pod koniec lat sześćdziesiątych dla *Procaryota* (137—139). Regulatory genowe typu represor operonu Lac w *E. coli* (137, 138), czy genu C_1 bakteriofaga λ (139) okazały się białkami allosterycznymi, które rozpoznają i wiążą się z właściwymi odcinkami DNA, a występują w bardzo małych ilościach (mniej niż 100 kopii na komórkę) (140).

Właściwości specyficznego powinowactwa do DNA poszukuje się również w cząsteczkach kandydujących na stanowisko regulatorów genowych u *Eucaryota*, m.in. w białkach NHC. Wykorzystywane są w tym celu następujące metody zaczerpnięte głównie z systemów mikrobiologicznych: 1) chromatografia powinowactwa biologicznego na kolumnach z unieruchomionymi DNA lub histonami, 2) wirowanie w gradiencie gęstości roztworów sacharozy czy metrizamidu, 3) sączenie na filtrach nitrocelulozowych.

Wszystkie one generalnie dowodzą, że tylko niewielki odsetek białek NHC cechuje się specyficzną gatunkową wiązaniami z DNA. Niemal we wszystkich tych technikach stosuje się nie tylko DNA różnego pochodzenia, tj. gatunkowo homo- i heterologiczne oraz o różnej konformacji (podwójnie i pojedynczo łańcuchowe), ale również DNA o różnym składzie zasad (np.: typu AT) czy odmiennej częstotliwości powtarzanych sekwencji.

Unieruchomienie na hydroksyapatycie natywnej chromatyny i kolejne oddysocjowywanie jej białek zbuforowanymi roztworami (pH 7, 5), zawierającymi wzrastające stężenia NaCl (do 2M) oraz mocznika lub Gua·Cl (do 5M), dostarczyło ostatnio, w ramach jednoetapowego postępowania, szeregu frakcji białek NHC o selektywnym powinowactwie do rodzimego DNA (140a).

III-1. Chromatografia powinowactwa na immobilizowanych DNA

Chromatografia powinowactwa na adsorbentach zawierających polinukleotydowe ligandy datuje się od 1968 r., kiedy to Litman (141) opisała pomyślne oczyszczenie mikrokokalnej polimerazy DNA na kolumnie zawierającej DNA unieruchomiony na celulozie.

W tym samym roku niezależnie Alberts (142) oraz Gilham (143) wprowadzili pojedynczo lub podwójnie łańcuchowe DNA przymocowane do inertnej celulozowej matrycy i zaproponowali nowe metody dla przygotowania adsorbentów zawierających głównie oligonukleotydy

lub mocno zdegradowane DNA, związane z różnymi nierozpuszczalnymi nośnikami.

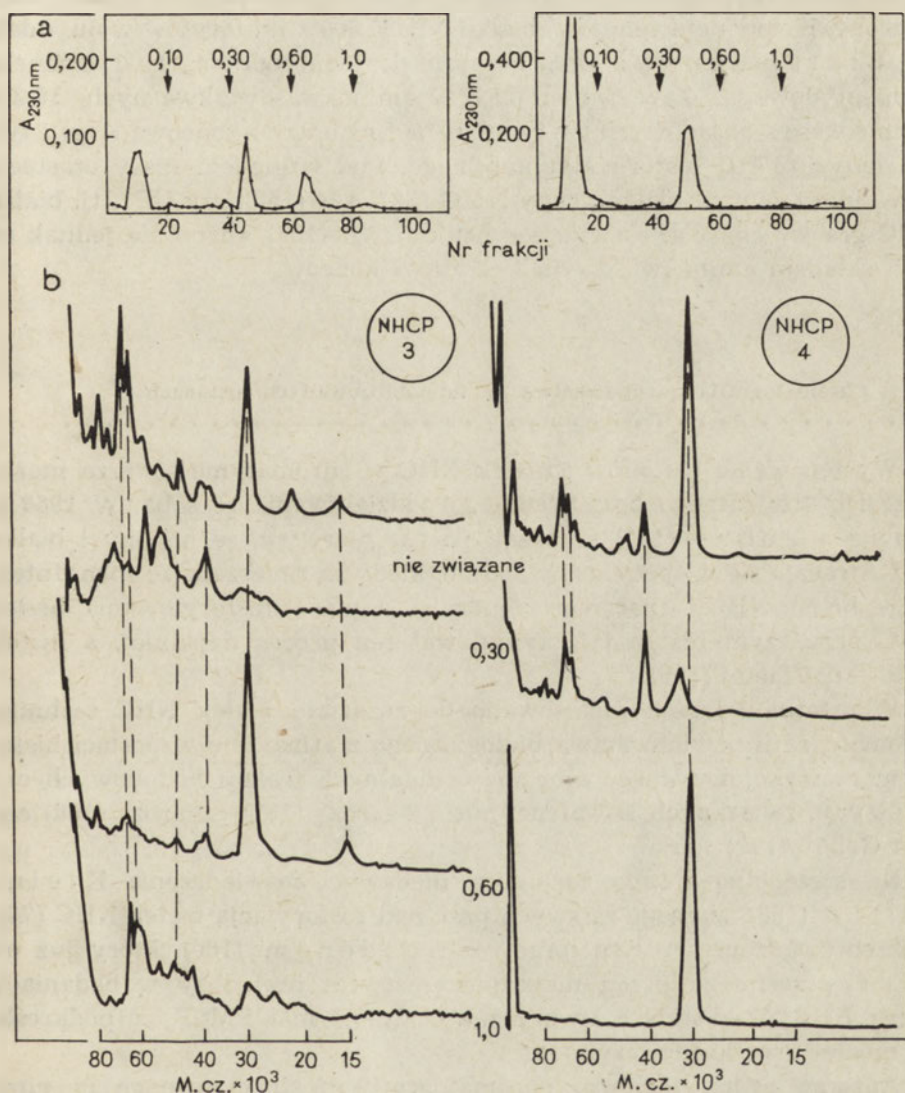
Najczęściej stosowanym wielkocząsteczkowym nośnikiem molekuł DNA jest celuloza (141, 144), żel poliakryloamidowy (145), Sephadex G-200 z odstepnikiem (ligandem) w postaci karbodiimidu (146), agarozą (147, 148) czy aminoetylosefarozą 4B (140).

Najwcześniejsze doświadczenia w tym zakresie należą do Klein-smitha i wsp., którzy zastosowali technikę chromatografii na DNA-celulozie całości białek NHC (144), a także ich ufosforylowanej frakcji, tj. fosfoprotein jądrowych (149). Wykazano, że w warunkach fizjologicznej siły jonowej (0,14M NaCl) tylko 0,01% całości białek NHC wątroby szczura wiąże się specyficznie z DNA homologicznego gatunku, a nie wykazuje żadnego powinowactwa do DNA łososia, czy bakterii. Odsetek ten zwiększył się do 1% (149) w przypadku chromatografii na DNA-celulozie fosfoprotein jądrowych uzyskanych z pominięciem fenolu. W toku elektroforezy w żelu poliakryloamidowym fosfoproteiny wątroby szczura, wiążące się specyficznie z DNA szczura, reprezentowały sobą niejednorodną populację ufosforylowanych białek o masach cząsteczkowych w zakresie od 30 000 do 70 000. Wiązały się one słabiej z DNA grasicy cielęcia i spermy łososia, a bardzo słabo z DNA *E. coli* czy *C. perfringens*.

Rozdział chromatograficzny na serii kolumn celulozowych z DNA heterologicznym (DNA *E. coli*) i homologicznym (DNA wątroby szczura) pozwolił rozdzielić białka NHC wątroby szczura (46) na 3 grupy, tj. 1) białka, które w ogóle nie wiążą się z DNA, 2) białka wiążące się niespecyficznie z DNA (np. z DNA *E. coli*) oraz 3) białka o wybiórczym powinowactwie do DNA homologicznego gatunkowo i tkankowo.

Chromatografia powinowactwa na DNA związanym kowalencyjnie z aminoetylosefarożą 4B (140), zapewniła rozfrakcjonowanie białek NHC pod względem ich powinowactwa do specyficznych sekwencji DNA. W doświadczeniach Allfrey' a i wsp. (116, 140), uznawanych powszechnie za „najelegantsze”, użyto 6 typów kolumn z DNA o różnej częstotliwości sekwencji a więc o 3 różnych wartościach C_0t , tj. wysokiej (225—40 000), pośredniej (6—225) i niskiej (< 6), a ponadto w postaci łańcucha pojedynczego (zdenaturowanej) oraz podwójnego (renaturowanej). Białka NHC wymywane z tych 6 typów DNA wzrastającymi stężeniami soli (NaCl), nawet z udziałem związków denaturujących (mocznik i chlorek guanidyny) w końcowych etapach, charakteryzowały się odmiennym obrazem elektroforetycznym w żelu poliakryloamidowym. Wyniki te sugerują, że białka NHC rozpoznają nie tylko fizyczny stan DNA, ale również jego sekwencje nukleotydowe. Właściwość tę demonstrują niedawne rozległe doświadczenia Blüthmanna i wsp. (148, 150) dotyczące rozdziału na DNA-agarozie 4 frakcji (NH1, NH2, NH3 i NH4) uzyskanych w toku chromatografii na hydroksyapatycie całości białek NHC

limfocytów wołu (151). Frakcje te w sumie stanowiły wagowo 20% DNA, reprezentowały sobą 55% (NH1), 20% (NH2), 10% (NH3) i 15% (NH4) białek NHC, a także wykazywały odmienne powinowactwo do dwu- (151) i jednołańcuchowego DNA (150), związanego z agarozą. Na tych kolumnach dostarczały one komponentów o odmiennym, a jednocześnie mniej niejednorodnym profilu densytometrycznym w żelu poliakrylamidowym (Ryc. 13). Warto odnotować, że omawianą chromatografię na hydroksy-



Ryc. 13. Wyniki badania niejednorodności i specyficzności 2 białek NHC limfocytów wołu, tj. NH3(NHCP3) oraz NH4(NHCP4), wyeluowanych z HPT (151). a) Chromatografia powinowactwa tych białek na DNA-agarozie. b) Analiza elektroforetyczna (PAGE—SDS) ich frakcji nie związanych z DNA-agarozą oraz wymytych z kolumny za pomocą 0,30, 0,60 i 1,0M roztworów NaCl (150)

apatycie według Tiseliusa i wsp. (152) prowadzono w temperaturze 4°C dzięki zastąpieniu w eluentach, soli sodowych lepiej rozpuszczalnymi fosforanem potasowym (pH 7,5) oraz chlorkiem potasowym.

Porównawcza analiza elektroforetyczna w żelu poliakryloamidowym 4 frakcji NHCP otrzymanych z dwu tkanek wołu wykazała pewne różnice ilościowe w profilach densytometrycznych, zwłaszcza w odniesieniu do frakcji NH₄, a właściwie jej komponentu o masie 30 000, stanowiącego aż 45% białka NH₄ w limfocytach a prawie nieobecnego w białku NHC wątroby. Komponent ten, tzw. białko NH 30 000 z limfocytów wołu, udało się Blüthmannowi (148) oczyścić do jednorodności, tj. 1 łańcucha polipeptydowego. Zawierał on 25,3% aminokwasów kwaśnych, 18,3% aminokwasów zasadowych (w tym 10,3% Lys oraz N-końcową Arg) i tylko ślady (0,17%) fosforu alkalilabilnego. Pod względem masy cząsteczkowej przypominał białka grupy HMG (32), A24 (153), czy UP1, tj. białko NHC grasicy cielęcia, rozwijające heliks DNA (154), różnił się jednak od nich składem aminokwasowym i resztą N-końcową.

III-2. Chromatografia powinowactwa na immobilizowanych histonach

Występowanie histonów i białek NHC w chromatynie stwarza możliwość ich wzajemnego bezpośredniego oddziaływania ze sobą. W 1968 r. Wang i Johns (155) wykazali po raz pierwszy, że histony i białka NHC strącają się w specyficzny sposób, kiedy są zmieszane ze sobą. Interakcje histon-NHCP znacznie pobudzały stopień ufosforylowania białek NHC przy czym histon H1 stymulował ten proces najsilniej, a histon H2B — najsłabiej (156).

W ostatnich latach zastosowano do rozdzielania białek NHC technikę chromatografii powinowactwa biologicznego z afinantem w postaci histonu nierozfrakcjonowanego albo indywidualnych frakcji histonowych czy polilizyny, związanych kowalencyjnie z agarozą (157), sefarozą (158) czy Affi-Gel 10 (159).

Na szczególną uwagę zasługują niedawne doświadczenia Kleinsmitha (158), znanego ze swych prac nad fosforylacją białek NHC (77), a przeprowadzone we współpracy z Noodémem (160), który już od 1973 r. przestrzega przed niebezpieczeństwem proteolizy w badaniach białek NHC. Wszystkie roztwory zawierały 0,1 mM PMSF, co podkreśla się niemal przy każdej czynności.

Autorzy podali technikę chromatografii ufosforylowanych *in vitro* [³²P]białek NHC wątroby wołu na 2 homologicznych gatunkowo frakcjach histonowych, tj. H1 i H2B, immobilizowanych na Sepharose 4B (aktywowanej CNBr). Strąceniu kompleksu histon-NHCP zapobiega się w niej przez wprowadzenie radioaktywnych białek NHC nie bezpośrednio na

histonosefarożę, ale przez wypełnienie kolumny uprzednio przygotowaną mieszaniną radioaktywnych białek NHC z histonosefarożą w obecności 2M NaCl i 4M mocznika, z następnym stopniowym obniżeniem stężenia soli w toku gradientowej dializy. Kolejna elucja kolumny histono-sefaroza-NHCP roztworami o wzrastających stężeniach soli dostarczyła kilku wysoce powtarzalnych szczytów radioaktywności, nie obserwowanych w przypadku kolumn kontrolnych z sefarozy samej lub z cytochromem c). Kolumny z histonem H2B wiązały więcej znakowanych białek NHC niż z histonem H1, z odmiennymi profilami elucji w obu przypadkach.

Doświadczenia dowodzą specyficzności oddziaływania białek NHC z histonem H1 i H2B, co prawda w stopniu limitowanym, w wyniku następujących danych: 1) Nie zaobserwowano żadnego wiązania białek NHC z albuminą surowicy ani cytochromem c. 2) Różne profile elucji białek NHC z kolumn zawierających histon H1 lub H2B wskazują na różnice w interakcji tych 2 histonów z ufosforylowanymi białkami NHC. 3) Pewne białka NHC wiążą się wybiórczo tylko z jednym z 2 typów unieruchomionych histonów. 4) Chromatografia białek NHC tylko na tym samym typie kolumny histonowej, dostarczała szczytów wymywanych roztworami o dokładnie tym samym stężeniu NaCl.

Znaczenie podjętych prac nad białkami niehistonowymi o wybitnym powinowactwie do histonów jest tym większe, że jeden z mechanizmów odwrócenia represji genowej może wciągać ich wiązanie do zasadowych chromosomowych polipeptydów — efektywnych inhibitorów transkrypcji.

Powinowactwo histonów do DNA zmienia się w cyklu komórkowym (121). Są one silniej związane z DNA podczas mitozy niż fazy S i za ten fakt wydają się ponosić odpowiedzialność białka NHC, odmienne w obu fazach cyklu. Ekstrahowalność histonu za pomocą 0,25M roztworu dezoksyholanu sodu (pH 8,0) była wyższa z chromatyny rekonstruowanej, zawierającej białko NHC z fazy S niż w przypadku chromatyny rekonstruowanej z udziałem białek NHC z komórek w czasie mitozy.

Powinowactwo białek NHC do DNA było efektywniejsze w obecności histonów w mieszaninie rekonstytucyjnej (161). Około 50% białek NHC nie wiązało się z DNA w 5M roztworze mocznika w doświadczeniach G a d s k i e g o i C h a e ' a (162), co tłumaczono przypuszczeniem, że pewne białka NHC mogą wymagać histonów do reasocjacji.

Sugeruje się, że białka NHC mogą modyfikować aktywność genów podczas cyklu komórkowego poprzez pośredniczenie w wiązaniu histonów do DNA (121).

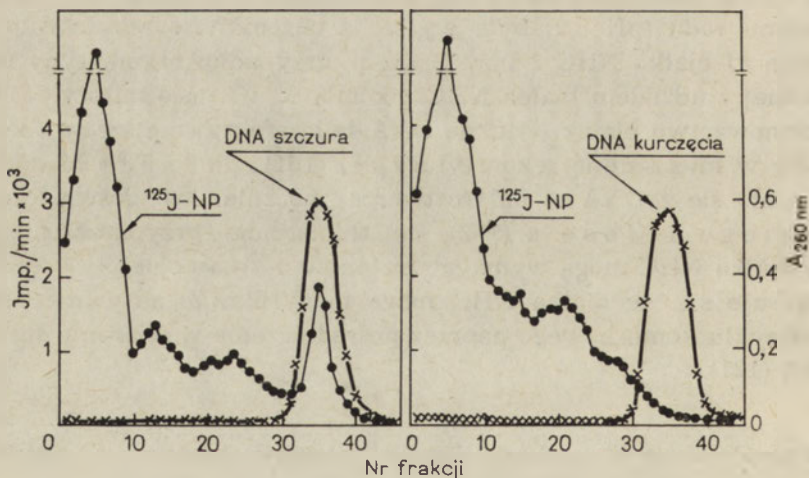
III-3. Ultrawierowanie w gradiencie gęstości roztworów sacharozy czy metrizamidu

W laboratorium A l l f r e y ' a (54) opracowano technikę tworzenia kompleksów wzbogaconej w fosfor (ok. 1%) frakcji białek NHC wątroby i śledziony szczura z DNA różnego pochodzenia (DNA wątroby szczura,

myszy, grasicy cielęcia, pneumokoków), w toku gradientowej dializy według klasycznej metody Bekhora i wsp. (25), stosowanej do badania rekonstrukcji chromatyny. Uzyskane próbki były frakcjonowane podczas ultrawierowania w gradiencie gęstości roztworów sacharozy (5—25⁰/o).

Zademonstrowano, że 13⁰/o fosfoprotein jądrowych, reprezentujących sobą około 1,5⁰/o całości białek jądrowych wątroby szczura, wiązało się specyficznie z homologicznym gatunkowo DNA. Zdolność wiązania fosfoprotein z DNA spadał w kompleksach zawierających DNA z coraz to odleglejszych gatunków, idąc od DNA wątroby do DNA pneumokoków. Białka odzyskane z połączeń fosfoproteidów z homologicznym DNA wykazywały niemal ten sam stopień niejednorodności, co fosfoproteidy wyjściowe. Maksymalne wiązanie zachodziło w 0,01M roztworze NaCl.

W odróżnieniu od wiążących się z DNA omawianych fosfoprotein (54), tzw. białko AP-NH (*acidic protein with high affinity for DNA and nucleohistone*) (163, 164), zarówno wyjściowe jak i odzyskane z kompleksu z DNA, zawierało w obrazie elektroforetycznym głównie komponenty niskocząsteczkowe. Stanowiło ono około 10⁰/o całości białek NHC (1,5—3,0⁰/o białek jądrowych) wątroby szczura i strącało się z dezoksyrybonukleohistonem, kiedy roztwór chromatyny w układzie 2M NaCl—5M mocznik—10mM Tris·HCl (pH 8,0) był dializowany wobec 13 objętości wody destylowanej. Od histonów i DNA dawało się oddzielić w toku chromatografii na hydroksyapatycie. Cechowało się ono 11-krotnie niższą ilością fosforu ,0,08⁰/o) niż fosfoproteiny (54) i optymalnym wiązaniem do DNA w warunkach fizjologicznej siły jonowej. Specyficzność jego powinowactwa do DNA nie była absolutna: 46⁰/o białka AP—NH wiązało się



Ryc. 14. Wyniki ultrawierowania w gradiencie stężenia sacharozy (5—20⁰/o) rekonstruowanych *in vitro* kompleksów [¹²⁵J] białka NP wątrobiaka Novikoffa z DNA homi i heterologicznym gatunkowo (165)

z DNA grasicy cielęcía, ale odsetek ten zmniejszał się w przypadku DNA ewolucyjnie odległych (ok. 21% z DNA spermy łososia: 32,8% z DNA *Flavobacterium meningosepticum*). Zdaniem Patela i Thomasa (163) białka wiążące się z DNA, które spełniają rolę raczej strukturalną niż specyficznych regulatorów, nie mogą wykazywać absolutnej specyficzności wiązania z DNA.

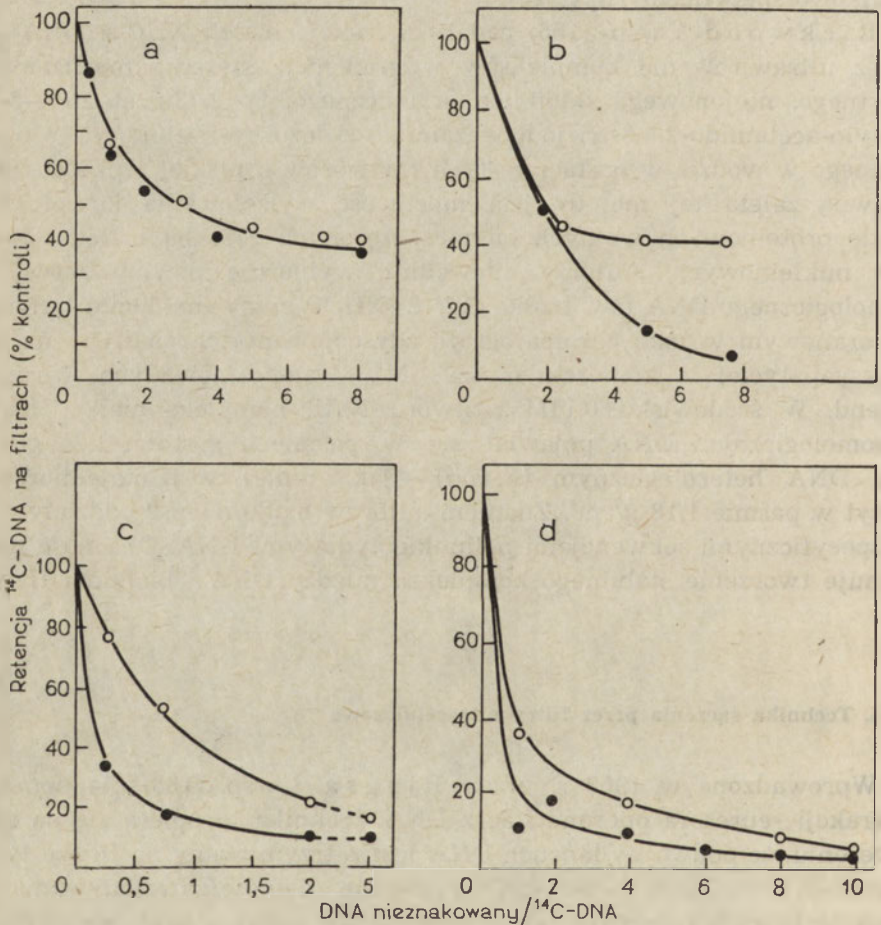
Rycina 14 ilustruje wyniki (165) ultrawierowania w gradiencie gęstości sacharozy, rekonstruowanych *in vitro*, kompleksów [¹²⁵J] białka NP wątrobiaka Novikoffa z DNA gatunkowo homologicznym (DNA wątroby szczura) oraz heterologicznym (DNA erytrocytów kurczęcia). Widoczna jest selektywność powinowactwa do DNA homologicznego białka NP (ok. 10% całości NHCP), uznawanego za silnie związane z DNA (Ryc. 2 i 3) oraz tkankowo specyficzne (Ryc. 4).

Rickwood i wsp. (166) badali interakcję białek NHC z DNA poprzez ultrawierowanie kompleksów w gradiencie stężenia metrizamidu, inertnego, niejonowego składnika organicznego, tj. 2-(3-acetamido-5-N-metylo-acetamido-2,4,6-tri-jodobenzamido)-2-dezoksy-D-glukozy, rozpuszczalnego w wodzie w postaci gęstych roztworów o niskiej lepkości (167). Główną zaletą tej metody jest możliwość wyizolowania kompleksów nukleoproteinowych wolnych od niesprzężonych ze sobą białek i kwasów nukleinowych. Autorzy udowodnili wybiórcze powinowactwo do homologicznego DNA tzw. białka Hap 2 (NHCP eluowane 50mM buforem fosforanowym w toku chromatografii zdysocjowanej chromatyny na hydroksypatyście) z komórek myszy, M2, transformowanych wirusem Friend. W środowisku 0,14M roztworu NaCl kompleks białka Hap 2 z homologicznym DNA pojawiał się w paśmie o gęstości 1,21 g/cm³, a z DNA heterologicznym (*E. coli*) — jako mniejszy i niejednorodny szczyt w paśmie 1,18 g/cm³. Zdaniem autorów białko Hap 2 oddziałuje ze specyficznymi sekwencjami polinukleotydowymi DNA. Obecność RNA hamuje tworzenie stabilnego kompleksu między DNA i białkiem Hap 2.

III-4. Technika sączenia przez filtry nitrocelulozowe

Wprowadzona w 1968 r. przez Riggsa i wsp. (138) dla pomiaru interakcji represora operonu Lac z DNA, technika ta opiera się na spostrzeżeniu, że podwójny łańcuch DNA jest zatrzymywany na filtrze tylko w postaci kompleksu z białkiem. Oczywiście zdolność zatrzymywania się DNA na filtrach zależy nie tylko od interakcji białek z DNA, ale również od innych parametrów, m.in. od: 1) stanu fizycznego białek i DNA (ich natywności; czasu przechowywania nawet w roztworze Tris·HCl, pH 7,5, 2°C; masy cząsteczkowej DNA), 2) rozmieszczenia białek wśród cząstek DNA, 3) zdolności różnych białek do zatrzymywania się na filtrach (168).

Przy zachowaniu dużej ostrożności, tj. przestrzeganiu maksymalnej natywności DNA i białek oraz możliwie identycznych warunków doświadczeń można uzyskać wiarygodne i ciekawe wyniki (168). W doświadczeniach z zastosowaniem sączenia przez filtry nitrocelulozowe badano najczęściej oddziaływanie pewnych frakcji białek NHC, reprezentujących sobą mieszaninę kilku lub wielu polipeptydów, wykazując ich specyficzne powinowactwo do DNA homologicznych (46, 163, 168, 169), pojedynczo łańcuchowych (168, 170), bogatych w sekwencje AT (169, 170) oraz powtarzające się sekwencje (116, 140, 169). U m a n s k i j i wsp. (168) badali interakcję różnych preparatów białek NHC, luźno i silnie związanych z DNA, wątroby szczura i grasicy cielęcia z DNA homologicznym i heterologicznym (Ryc. 15).



Ryc. 15. Zestawienie niektórych wyników badania (techniką filtrów nitrocelulozowych) współzawodnictwa homologicznych (●—●) i heterologicznych (○—○) DNA, natywnych (a i b) oraz zdenaturowanych (c i d), z homologicznym [^{14}C] DNA o białko NHC grasicy szczura w nieobecności (a i c) oraz obecności (b i d) 5M mocznika (168)

W grę wchodziło współzawodnictwo nieznakowanych DNA homologicznych lub heterologicznych, przy tym natywnych (górne diagramy) i zdenaturowanych (dolne diagramy), z natywnym homologicznym [^{14}C]DNA, w nieobecności (lewe diagramy) i obecności mocznika (prawe diagramy). W tych próbach badano zdolność zwiększających się ilości nieznakowanych DNA do współzawodnictwa z określoną ilością radioaktywnego homologicznego podwójnie łańcuchowego DNA o miejsca wiążące na określonej ilości białka. Im niższe stężenie kompetycyjnego DNA było wymagane do osiągnięcia 50% współzawodnictwa, tym wyższe było powinowactwo tego DNA do białka.

Autorzy wykazali, że mocznik destabilizuje heliks DNA i ułatwia interakcję białka NHC z kompetycyjnym DNA. Oddziaływanie białek z współzawodniczącym DNA natywnym, homologicznym i heterologicznym, jest identyczne w nieobecności mocznika, ale w obecności mocznika interakcja z DNA homologicznym jest wyraźnie silniejsza niż z heterologicznym.

Ogólnie zdenaturowane DNA są bardziej efektywne w oddziaływaniu z białkiem niż natywne. DNA zdenaturowane homologiczne współzawodniczą silniej o białko NHC niż zdenaturowane heterologiczne. Oczywiście specyficzna interakcja nie dotyczy całości białek NHC. Białka NHC głównej puli oddziałują z DNA niespecyficznie, a nieliczne — specyficznie z natywnym homologicznym DNA w obecności mocznika. Specyficzną interakcję białek NHC z homologicznym, zdenaturowanym DNA obserwuje się w nieobecności i w obecności mocznika.

W przeciwieństwie do dotychczasowych doświadczeń, w których badano interakcję z DNA białek NHC stanowiących populację kilku lub wielu peptydów, ostatnie publikacje Blüthmana (171, 148, 172) dotyczą powinowactwa do DNA 3 indywidualnych białek NHC z komórek prawidłowych i nowotworowych, a mianowicie: białka NH 30 000 z limfocytów wołu (148, 171), a także 2 białek o masie 20 000 i 23 000, wyizolowanych ze szpiczaka myszy MOPC (172). Z doświadczeń wynikało silniejsze oddziaływanie tych białek z pojedynczo łańcuchowym DNA, a w przypadku podwójnie łańcuchowego — z sekwencjami nukleotydowymi bogatymi w pary AT (regiony termolabilne). Ponadto białka te wykazywały większe powinowactwo do sekwencji powtarzających się z wyższą częstotliwością ($C_{0t} < 100$) w porównaniu z unikalnymi ($C_{0t} > 100$) oraz nierozfrakcjonowanym DNA.

Niejednorodne frakcje białek NHC badane przez Allfrey'a i wsp. (116, 140) wiązały się wybiórczo do DNA o wysokiej częstotliwości powtarzających się sekwencji ($C_{0t} < 6$), a w doświadczeniach pod kierunkiem Bonnera (169) — do DNA ze średnią częstotliwością powtórzeń.

Wybiórcze oddziaływanie pewnych białek NHC z powtarzającymi się sekwencjami DNA jest zgodne z generalnymi modelami regulacji funkcji genomu (176—178, 13), w których zakłada się, że powtarzające się sek-

wencje DNA spełniają rolę regulatorową, służąc jako miejsce wiązania regulatorowych cząsteczek.

Zgodnie z wyliczeniami Blüthmanna komponent NH 30 000, stanowiący 45% frakcji NH₄, występuje w ilości 10⁶ (148), a białka nowotworowe, reprezentujące tylko 10% tej frakcji — w ilości 10⁵ cząsteczek w jądrze komórkowym (172). Wartości te, zwłaszcza liczba 10⁶ cząsteczek NH 30 000 (148) przypominają wyliczenia dla białek HMG (173) i przemawiają raczej za ich rolą strukturalną niż regulatorową. Jednak białko NH 30 000 nie zostało wykryte w chromatynie wątroby (151), a doświadczenia nad transkrypcją rekonstruowanych hybrydów, zawierających wymiennie komponenty chromatynowe limfocytów i wątroby, sugerowały odpowiedzialność tego białka za specyficzność matrycową chromatyny limfocytów (148, 151).

Na filtrach nitrocelulozowych białko NH 30 000 wykazywało wyższe powinowactwo do DNA limfocytów niż do DNA z *E. coli*. W środowisku 0,2M roztworu NaCl wiązało ono około 30% DNA limfocytów (jak wydedukowano z krzywych nasycenia dla nadmiaru białka oraz DNA o różnych masach cząsteczkowych, każde miejsce wiążące liczyło 1700 par nukleotydów). Wbrew poglądom, że interakcje białek HMG są niespecyficzne z uwagi na sekwencje zasad (174, 175), wydaje się, że białko NH 30 000 ma odrębne miejsca interakcji na cząsteczce DNA (148). Blüthmann (171) spekuluje, że białko to jest zaangażowane w regulację funkcji genów poprzez wpływ na strukturę chromatyny, tj. na konformację aktywnych genów.

III-5. Poza-chromosomalne białka z powinowactwem do DNA

Od 1973 r., tj. od znanej publikacji Vaughana i Comingsa (179) lansuje się teorię, że białka regulujące funkcje DNA winny wiązać się z nim odwracalnie i być w stanie równowagi dynamicznej między tzw. rozpuszczalną porcją komórki (zapewne cyto- i nukleoplazmą), a jej strukturami w postaci chromosomów, czy chromatyny, odbywając stałą wędrówkę między jądrem i cytoplazmą.

Punktem wyjścia tej hipotezy stały się doświadczenia nad hybrydyzacją komórek (180, 181), czy transplantacją jąder komórkowych (182), które zademonstrowały ważną rolę czynników cytoplazmatycznych w utrzymaniu charakterystycznej zróżnicowanej aktywności komórki, a także szybką wymianę między nukleo- i cytoplazmą.

Wychodząc z tego założenia Vaughan i Comings (179) zamiast chromatyny, jako źródła białek NHC wiążących się z DNA, ale opornych na ekstrakcję, sięgnęli po cytosol, a także nukleoplazmę wątroby i nerek chomika chińskiego oraz komórek linii V-79, w celu wydzielenia

łatwo rozpuszczalnych białek o powinowactwie do DNA (homo- i heterologicznego). Okazało się, że 1,4⁰% całości białek cytoplazmatycznych z 3 typów tkanek chomika chińskiego było wiązanych z DNA homologicznym oraz grasicy cielęcia (podwójnie łańcuchowym), a tylko 0,3⁰% z pojedynczo łańcuchowym DNA z *Micrococcus lysodeikticus*. Chromatografia powinowactwa na kolumnach DNA-poliakryloamid (145) udowodniła wyższy odsetek białek wiążących się z DNA w nukleoplazmie niż w cytoplazmie.

Białka te, podobnie jak niektóre dobrze scharakteryzowane regulatory genowe u *Procaryota* (137, 139) cechowały się powinowactwem do specyficznych sekwencji DNA, ale miały wyższą masę cząsteczkową ($\geq 65\ 000$) w porównaniu z 40 000 (137), czy 20 000 (139), co nie wydawało się autorem pozbawione sensu biologicznego. U *Eucaryota*, różniących się generalnie od *Procaryota* wyższą zawartością DNA, może być wymagany znacznie dłuższy odcinek łańcucha DNA, a także większa cząsteczka białka w celu osiągnięcia genowo specyficznego sprzężenia w stopniu porównywalnym do systemów prokariotycznych.

Badane białka uzyskane z cytoplazmy nie okazywały jednak żadnego wpływu na proces transkrypcji zarówno DNA jak i chromatyny. Być może tego rodzaju właściwość winna być badana w systemie z homologiczną polimerazą DNA albo w systemach syntezy indywidualnych produktów genowych (hemoglobiny, mioglobiny, albuminy itp.).

W doświadczeniach Connera i Comingsa (157) z 1978 r. z cytoplazmy i nukleoplazmy wydzielono białka o specyficznym powinowactwie do histonów, wykorzystując w tym celu technikę chromatografii powinowactwa biologicznego na immobilizowanych histonach. W ekstrakcie jąder komórkowych (0,15M NaCl) dominował polipeptyd o masie 25 000 i stosunku aminokwasów kwaśnych do zasadowych równym 1,58, oznaczony na elektroferogramie jako J₂, który wybiórczo wiązał się z histonami.

Nukleoplazma i cytoplazma komórek wątrobiaka Novikoffa stała się w laboratorium Bonnera (183) źródłem rozpuszczalnych białek o powinowactwie do DNA homologicznego (DNA szczura) i heterologicznego (*E. coli*) immobilizowanych na celulozie. W warunkach 0,05M roztworu NaCl oraz serii kolumn celulozowych zawierających DNA *E. coli* lub wątroby szczura, z całości białek rozpuszczalnych wątrobiaka Novikoffa autorzy wyodrębnili 3 klasy, a mianowicie: białek wiążących się z DNA 1) odwracalnie i niespecyficznie (6—8⁰%), tj. z heterologicznym i homologicznym DNA, 2) odwracalnie i specyficznie (1—1,5⁰% całości białek rozpuszczalnych) z 7—17-krotnie wyższym powinowactwem do DNA homologicznego niż heterologicznego oraz 3) specyficznie i nieodwracalnie (1—1,5⁰% całości białek rozpuszczalnych), tzn. nie dających się oddzielić od DNA na kolumnie, nawet 4M roztworem NaCl, a jedynie przy pomocy dezoksyrybonukleazy.

Analiza elektroforetyczna w żelu poliakryloamidowym z SDS i ogniskowanie izoelektryczne frakcji białkowych uzyskanych z kolumny zademonstrowały duże podobieństwo większych komponentów w białkach wiążących się z DNA homo- i heterologicznym (3—5 głównych pasm w zakresie 35 000—40 000 i kilka mniejszych o wyższej masie cząsteczkowej).

Zgodnie z informacjami Patela i Thomasa (163) około 22% całości białek nukleoplazmy wiązało się z DNA, przy czym ilość białek nukleoplazmy z powinowactwem do DNA była 11-krotnie wyższa niż w cytoplazmie.

Należy zaznaczyć, że autorzy w swoich doświadczeniach nad białkami wiążącymi się z DNA nie operowali białkami jodowanymi, unikając utleniania białek chloraminą T przed procedurą znakowania jodem, co mogłoby zmodyfikować to wiązanie; znakowanie białek *in vitro* za pomocą ^{125}J lub ^{131}J zwiększa specyficzną radioaktywność ponad 10 000-krotnie niż w znakowaniu *in vivo*. Było ono wykorzystane przez autorów tylko w analizie elektroforetycznej z SDS oraz w ogniskowaniu izoelektrycznym białek.

Około 10% całości białek cytoplazmy mikroplazmodiów śluzowca *Physarum polycephalum* (szcep $M_3\text{CVII}$) wiązało się z DNA grasicy cielęcia immobilizowanym na celulozie, przy czym 5,4% przyłączało się do DNA natywnego, a 4,4% do DNA zdenaturowanego (185). Białka te reprezentowały sobą populację kilkuset polipeptydowych łańcuchów o masie cząsteczkowej w zakresie od 22 000 do 200 000, a wśród nich 30—40 frakcji białkowych wiązało radioaktywny fosforan w ilości 0,07 do 0,13%.

Magun (184) zademonstrował występowanie w cytosolu fosfoprotein, które mają powinowactwo do DNA, potwierdzając poprzednie swoje sugestie (185), że w cytoplazmie może zachodzić fosforylacja pewnych białek niehistonowych przed ich inkorporacją w jądro komórkowe.

Tylko niewielkie różnice w obrazie elektroforetycznym w 5—6% żelu poliakryloamidowym z SDS zostały stwierdzone w przypadku białek wiążących się z DNA grasicy cielęcej immobilizowanymi na celulozie, a pochodzącymi z całości komórek ludzkich fibroblastów WI38 (z płuca płodu) prawidłowych i transformowanych wirusem SV40 (186). W tych ostatnich obserwowano się wzrost zawartości 2 komponentów (P6b i P6a) o masie 47 000 i 90 000. Białka te nie wydają się być charakterystyczne dla procesu transformacji wywołanej przez wirus SV40, ponieważ w zwiększonych ilościach występują one także w komórkach HeLa, (w porównaniu z fibroblastami ludzkimi WI38), oraz w komórkach indukowanego chemicznie wątrobiaka szczura (187), w porównaniu z wątrobnymi prawidłowymi.

W laboratorium Harrisa (188) w Oksfordzie, znanego ze swoich prac nad hybrydami komórkowymi (189), zastosowano kolumny agaro-

zowe (147) i celulozowe (141) z pojedynczo (147) i podwójnie (141) łańcuchowymi DNA grasicy cielęcica oraz z komórek puchlinowych u myszy, w celu wydzielenia białek wiążących się z DNA z całości komórek, a także z całości jąder komórkowych pochodzących z prawidłowych linii komórkowych ludzkich (HeLa i Daudi), mysich (Ag i AgHT), jak również z hybrydów komórkowych (człowiek — mysz; klony P₁, P₃, P₄, OR i Cl₂, zawierające odpowiednio 2, 10, 12, 14 i 22 ludzkie chromosomy), a ponadto ze złośliwych guzów u myszy (Ehrlich, SEWA, MSWBS). Wyeluowano 2 grupy białek wiążących się z DNA, tj. luźniej (elucja 0,14M NaCl) i mocniej (elucja 2M NaCl). Stanowiły one w sumie 10% całości białek komórkowych i 25% całości białek jądrowych. Białka wiążące się z DNA, a pochodzące z różnych źródeł okazały się niejednorodne (60 i 100 komponentów) w toku jednokierunkowej (59) i dwukierunkowej (60) elektroforezy w żelu poliakryloamidowym z SDS, a przede wszystkim niemal identyczne pod względem ruchliwości elektroforetycznych. Tylko mała frakcja wiązała się specyficznie z DNA tego samego gatunku. Z uwagi na wspólność podwójnie helikalnej struktury DNA we wszystkich gatunkach, autorzy sugerują istnienie poważnych ograniczeń w zmienności strukturalnej białek wiążących się z DNA i konserwatywność ewolucyjną struktury większości białek wchodzących w inetrakcję z DNA (nie tylko histonów, ale również białek NHC). Zdaniem ich fakt ten jest molekularną podstawą wewnątrzkomórkowej zgodności hybrydów komórkowych pochodzących z różnych gatunków zwierzętych (zgodności białek komórek z różnych gatunków, które łącząc się, tworzą zdolne do życia międzygatunkowe hybrydy komórkowe).

Autorzy potwierdzili poprzednie obserwacje (190, 191), że zdenaturowany DNA ma wyższą zdolność wiązania białek (90%) niż natywny (6,7%). To powinowactwo do pojedynczo łańcuchowej cząsteczki DNA może być zgodne z teoretycznymi sugestiami, że cząsteczki DNA podczas replikacji i transkrypcji występują w postaci jednołańcuchowej.

Białka wiążące się z DNA izoluje się ostatnio metodą chromatografii powinowactwa na DNA-celulozie z płynów ustrojowych, jak surowica ludzka prawidłowa (192, 193) i patologiczna (194). Około 1,5% całości białek prawidłowej surowicy wiążących się z DNA reprezentuje sobą wysoce niejednorodną grupę, która wędruje w regionie α - i β -globulin, a w toku elektroforezy z SDS dostarcza ponad 20 pasm. Wśród nich dominują 2 większe frakcje DBP (DNA binding protein), tj. DBP1 (126 000) i DBP2 (86 000), które zostały wydzielone i scharakteryzowane jako glikoproteiny o charakterze kwasowym.

Wśród białek wiążących się z DNA, w tym do DNA zdenaturowanego, znajdują się tzw. białka rozplatające heliks DNA („*unwinding proteins*”) stwierdzone już na początku lat siedemdziesiątych u *Procaryota*, włączając bakteriofagi (195, 196).

Białka tego typu zostały również znalezione i scharakteryzowane w sy-

stemach eukariotycznych, bardziej prymitywnych (197, 198), jak i w tkankach ssaków, w tym grasicy cielęcia (199—201), czy regenerującej wątrobie (202). Były one wydzielone z całkowitych lizatów komórkowych (197, 198), lub z cytosolu (202), a także chromatyny (202).

Białka te ogólnie cechuje: 1) wybiórcze wiązanie z pojedynczo łańcuchowym DNA, 2) rozkręcanie podwójnego heliksu DNA oraz 3) interakcja z polimerazami DNA, prowadząca do stymulacji lub zahamowania syntezy DNA. Sugerowany udział tych białek w mechanizmach replikacji DNA, i to zarówno w inicjacji jak i elongacji tego procesu, jest przyczyną wzmożonego nimi zainteresowania (202).

Zastosowanie do pewnej frakcji (AP—NH) białek niehistonowych wątroby szczura chromatografii powinowactwa na pojedynczo łańcuchowym DNA z grasicy cielęcia, unieruchomionym na agarozie, pozwoliło Thomasowi i Patelowi (201) wydzielić komponent o preferencyjnym powinowactwie do zdenaturowanego DNA. Białko to o masie około 20 000, stanowiło mniej niż 5% całości AP—NH. Technika sączenia na filtrach nitrocelulozowych z zastosowaniem różnych DNA (faga T7, wątroby szczura i grasicy cielęcia) udowodniła brak gatunkowo specyficznej interakcji tego białka z DNA i preferencyjne wiązanie z regionami AT. Białko to ułatwiało denaturację poli[d(A—T)·d(A—T)], czego wyrazem był 40% wzrost efektu hiperchromowego. Zjawisko to daje się wytłumaczyć stymulacją przez komponent białkowy przejścia heliks—kłębek dla syntetycznego DNA.

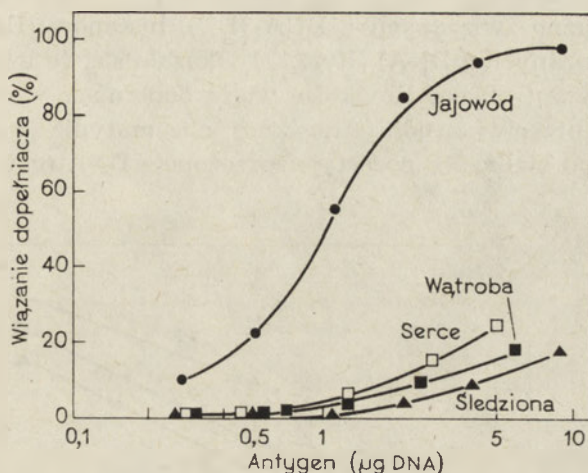
IV. Specyficzność immunochemiczna białek NHC

Wyjątkowa czułość i selektywność interakcji antygen—przeciwciała stała się przyczyną wprowadzenia w latach siedemdziesiątych metod serologicznych do badania struktury i funkcji chromatyny, a w szczególności do badania właściwości i lokalizacji jej białkowych komponentów.

Techniką z wyboru okazała się mikrometoda wiązania dopełniacza według Wassermana i Levine'a (203). W 1970 r. Stollar i Ward (204) zastosowali ją po raz pierwszy do reakcji serologicznych z histonami (stosunkowo słabymi immunogenami z uwagi na małą masę cząsteczkową i niską zawartość aminokwasów aromatycznych), a w rok później Chytil i Spelsberg (205) — do badania właściwości immunochemicznych białek niehistonowych (Ryc. 16).

W słynnym doświadczeniu wykazali oni, że odhistonowana chromatyna jajowodu niedojrzałych kurcząt, którym wstrzykiwano przez 15 dni po 5 mg dwuetylostilbestrolu, wywoływała produkcję i pojawienie się w surowicy królika tkankowo specyficznych przeciwciał, jakie wiązały silnie dopełniacz w obecności antygenu w postaci pełnej lub odhistonowanej chromatyny jajowodu, a tylko w nieznacznym stopniu — w obecności chro-

matyny z innych tkanek tego kurczęcia (wątroba, serce, śledziona). Wyniki te wskazywały na głębokie różnice w determinantach antygenowych odhistonowanych chromatyn pochodzących z badanych tkanek, sugerując wysoką chemiczną i konformacyjną specyficzność białek NHC odpowiedzialnych za to zjawisko. Histony ani DNA nie wiązały dopełniacza w warunkach doświadczenia ilustrowanego na rycinie 16.



Ryc. 16. Krzywe wiązania dopełniacza przez wzrastające ilości kompleksów DNA—NHCP z jajowodu i innych narządów kurczęcia w obecności przeciwsurowicy królika (rozcieńczenie 1:400). Odhistonowana chromatyna jajowodu użyta do immunizacji królika (205)

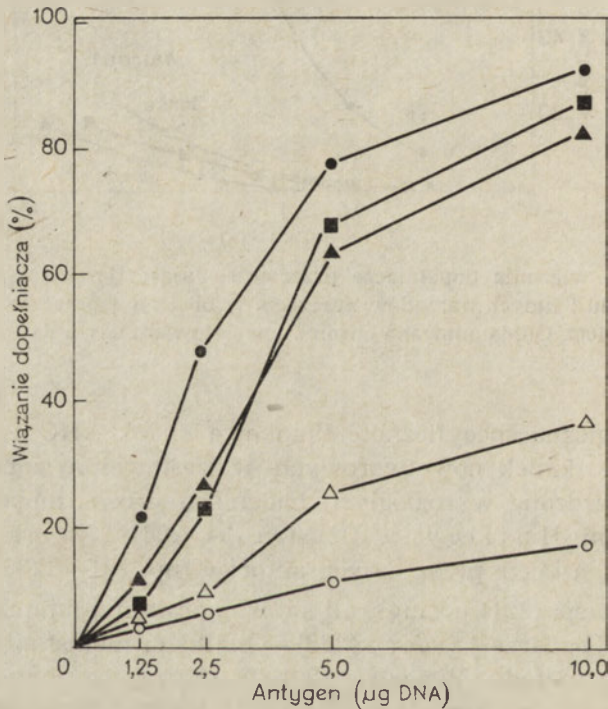
Immunologiczna specyficzność tkankowa białek NHC ssaków (szczur, człowiek), a także tkanek nowotworowych w zestawieniu z prawidłowymi, została potwierdzona w rozległych badaniach prowadzonych od 1972 r. w laboratorium Hnilicy, w Houston (34, 206—213) oraz w Nashville (55, 214—220), a także przez innych autorów (np. 221—223).

Zaradi i wsp. (221) posługiwali się w charakterze immunogenu pełną chromatyną, a badacze japońscy (223) — białkiem niehistonowym wydzielonym według metody Wanga (20). W przeprowadzonych przez tych autorów reakcjach wiązania dopełniacza antygenem była bądź chromatyna (221), bądź białko NHC pełne (221, 223) bądź też jego frakcje uzyskane w toku chromatografii na hydroksypatycie (223).

Grupie Hnilicy (34, 55, 206—220), wywołującej immunizację królików głównie za pomocą odhistonowanej chromatyny, udało się zlokalizować immunochemiczną specyficzność w kompleksie białko NP—DNA, dzięki eksperymentom z rekonstruowanymi chromatynami (34, 208, 212) oraz z frakcjami (UC, HC i NC, por. ryc. 3), uzyskanymi w wyniku selektywnej ekstrakcji chromatyny (213).

Autorzy wykazali, że dysocjacja chromatyny w zbuforowanym układzie

2M NaCl-5M mocznik, a także jej rekonstrukcja nie niszczą właściwości antygenowych. Fakt ten pozwolił na wymianę poszczególnych komponentów chromatyny używanej do wytworzenia specyficznych przeciwciał (np. wątrobiaka Novikoffa) ze składnikami chromatyny immunologicznie nieaktywnej w danym doświadczeniu (np. wątroby prawidłowej szczura). Ponadto stało się możliwe zbadanie immunoreaktywności frakcji chromatyny (213), reprezentujących sobą pozostałość po selektywnym usunięciu białek NHC luźno związanych z DNA (UP), histonów (HP) oraz białek NP (silnie związanych z DNA) (Ryc. 17). Okazało się, że uzyskane frakcje chromatynowe wątrobiaka Novikoffa wiążą dopełniacz w obecności przeciwsurowicy (przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka) tak długo, jak długo białko NP pozostaje sprzężone z DNA (gatunkowo homologicznym).



Ryc. 17. Krzywe wiązania dopełniacza przez preparaty chromatyny w obecności przeciwciał przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa.

Chromatyna wątrobiaka natywna (●-●), pozbawiona białek UP (■-■), białek UP i histonów (▲-▲), a także białek UP, histonów i białek NP (△-△). Chromatyna wątroby szczura (○-○) (213).

Reakcja wiązania dopełniacza nie miała miejsca w przypadku użycia jako antygenu natywnej i rekonstruowanej chromatyny wątroby szczura (213), a nawet hybrydu chromatynowego zawierającego białka NP z wątroby, a wszystko inne (UP, HP i NC) — z wątrobiaka (212). W doświadczeniach Hnilicy i wsp. (216) kompleks białek NP z DNA, po tra-

wieniu DNazą lub trypsyną, tracił immunogenność; nie wykazywały jej również ani sam DNA, ani samo białko NP. Białko NP (bez DNA), użyte jako immunogen, wytwarzało przeciwciała, które wiązały dopełniacz tylko w obecności antygeny w postaci białka NP, ale nie w obecności chromatyny. Ponadto przeciwciała wyprodukowane w surowicy królika wobec białka NP z jednej tkanki dawały reakcje krzyżowe z białkami NP z innych tkanek, a więc nie wykazywały istotnie żadnej specyficzności tkankowej. Wywnioskowano, że chromatyna wyższych kręgowców zawiera gatunki białek niehistonowych, które mogą tworzyć wysoce tkankowo specyficzne kompleksy tylko z DNA z tego samego gatunku, a nie z DNA heterologicznym.

Mniemanie, że DNA jako elektroujemny polimer może wpływać na konformację białkowego niehistonowego polimeru zostało odrzucone przez doświadczenia przeprowadzone z kompleksami białek NHC z różnymi polianionami, jak heterologiczny DNA, RNA drożdży, siarczan dekstranu, sulfonian polietylenu czy poliglutaminian (207, por. poz. 5).

Immunochemiczna specyficzność białek NHC zmienia się w procesie różnicowania tkanek, np. jajowodu niedojrzałych kurcząt stymulowanego do rozwoju dwuetylostilbestrolem w ciągu 15 dni (224). W obecności przeciwciał wyprodukowanych przeciwko odhistonowanej chromatynie z całkowicie zróżnicowanego jajowodu, tj. po 15 dniach podawania hormonu, chromatyna z jajowodu niedojrzałych kurcząt nie była immunoreaktywna. Ta aktywność immunologiczna wzrastała jednak w miarę rozwoju stymulowanego estrogenem, osiągając pełne wiązanie dopełniacza w przypadku chromatyny izolowanej z całkowicie zróżnicowanych jajowodów. Natomiast w procesie erythropoezy krwinek jądrzastych kur (219, 220), dojrzewaniu retikulocytów, komórek aktywnie syntetyzujących globinę w przeciwieństwie do dojrzałych erytrocytów, towarzyszy spadek aktywności immunologicznej chromatyny, prawdopodobnie w wyniku zmiany jej konformacji. Odhistonowanie, czy wprowadzenie do środowiska polianionów zwiększa immunoreaktywność skondensowanej uprzednio chromatyny dojrzałych erytrocytów do poziomu obserwowanego w przypadku znacznie luźniejszej chromatyny retikulocytów.

Za odmienną immunoreaktywność obu typów chromatyn okazały się odpowiedzialne immunochemicznie odmienne białka NHC bardzo silnie związane z DNA (zapewne resztkowe NHC), zawierające białko antygenowe. Doświadczenia z trawieniem DNazą I i mikrokokalną nukleazą chromatyny komórek erytroidalnych pozwoliły zlokalizować materiał antygenowy w wysokocząsteczkowej frakcji polinukleosomalnej, sugerując jego udział w wyższego rzędu strukturze chromatyny.

V. Białka NHC w tkankach nowotworowych

V-1. Specyficzność molekularna i metaboliczna

Zrozumiałe zainteresowanie budzi rola białek niehistonowych w procesie transformacji nowotworowej, który cechuje anormalna ekspresja informacji zawartej w genomie oraz nieograniczona zdolność do mitoz.

Od lat porównywane są wzory molekularne białek NHC w różnego typu nowotworach i prawidłowych tkankach kontrolnych. Ze względu na wspomnianą już publikację Tsaneva i wsp. (93), nawołującą do maksymalnej ostrożności w interpretowaniu obrazów elektroforetycznych białek NHC izolowanych w nieobecności inhibitorów proteaz chromatynowych, w rozdziale tym zostaną pominięte publikacje, w których brak wyraźnej wzmianki o rodzaju i stężeniu odpowiedniego inhibitora.

Na szczególną uwagę zasługują rzetelne doświadczenia Tsaneva i wsp. (93), dotyczące wątroby szczurów, którym podawano nitrozomorfolinę. Zastosowano w nich: 1) 1-milimolowe stężenie PMSF we wszystkich roztworach, 2) analizę składu komórkowego badanych tkanek, 3) eliminowanie zanieczyszczeń cytoplazmatycznych przez izolowanie chromatyny z jąder komórkowych przemytych detergentem Nonidet P-40, 4) usuwanie białek soku jądrowego, luźno związanych cząstek RNP poprzez ekstrakcję chromatyny roztworami soli do 0,35M stężenia NaCl (z utratą części białek NHC luźno związanych z DNA) oraz 5) analizę porównawczą całości białek chromatynowych, w celu uniknięcia strat, zwłaszcza w białkach NHC, przy oddzielaniu ich od histonów.

W elektroferogramach białek NHC tkanki wątrobiaka indukowanego nitrozomorfoliną w zestawieniu z wątrobą prawidłową nie zaobserwowano żadnych zmian jakościowych i tylko nieznaczne zmiany ilościowe, a mianowicie: zwiększenie intensywności zabarwienia frakcji o masie 63 000, wzrost zawartości frakcji o masie 43 000 przy spadku ilości histonu H1⁰.

W tkance z przerzutów wątrobiaka stwierdzono jednak, w porównaniu z wątrobą prawidłową, następujące odchylenia jakościowe i ilościowe w regionie frakcji wysokocząsteczkowych: pojawienie się komponentów o masie 60 000, 90 000 i 120 000, 2) wzrost zawartości białek o masie 63 000 i 155 000, 3) spadek ilości pasma w obszarze 160 000. Ponadto autorzy zauważyli obniżenie zawartości prążków odpowiadających α - i β -tubulinie oraz aktywie spośród białek NHC, a wśród ogółu białek chromosomalnych — zanik szybko poruszającej się podfrakcji histonu H1⁰. Wnikliwa ocena elektroferogramów białek chromosomalnych wątrobiaka i wątroby izolowanych w obecności i bez 1 mM PMSF, upoważniła autorów do kuszącej sugestii, że chromatynę tkanki nowotworowej cechuje wyższa aktywność proteolityczna i występowanie specyficznych proteaz (będących przeciw białkami NHC), które są łatwiej aktywowane podczas kancerogenezy. Proponują oni również, jako prawdopodobny mechanizm

zaburzeń funkcji genomu podczas komórkowej transformacji nowotworowej, degradację enzymatyczną ważnych białek regulatorowych w chromatynie. Koncepcja ta jest zgodna z sugestią Browna i wsp. (225) wypowiedzianą na podstawie stymulującego wpływu trypsyny na aktywność polimerazy DNA fibroblastów chomika chińskiego, że trypsynopodobny enzym może odgrywać ważną rolę w inicjacji syntezy DNA, a więc w procesie replikacji komórki.

Wyższa aktywność proteazy serynowej została stwierdzona w preparatach chromatyny i histonów 2 typów wątrobiaka Morrisa (5123D i 7777) w porównaniu z wątrobą prawidłową (226), a co ważniejsze — zlokalizowana w histonie H2B, który wydaje się być kompleksem histonu z białkiem NHC enzymatycznym, tj. proteazą chromatynową (227). Wykazano, że po 24-godzinnej inkubacji (0,01M bufor Tris, pH 7,6; 37°C) kwasorozpuszczalne produkty degradacji stanowiły 27% histonu H2B z wątroby prawidłowej szczura, a 36% tej frakcji w przypadku wątrobiaka Morrisa 7777.

Rozległe badania chromatyny różnych tkanek nowotworowych prowadzone są od dawna w laboratorium Buscha (61, 228—231), zawsze z użyciem inhibitorów proteaz w postaci DFP (0,1 mM) lub PMSF (1 mM). Dotyczą one zarówno białek NHC ekstrahowanych 0,35M roztworem NaCl z jąder komórkowych przemytych uprzednio zbuforowanym 0,14M roztworem NaCl, jak również z tzw. II frakcji chromatyny, tj. chromatyny odhistonowanej.

Warto zacytować w tabeli 2 wyniki dwukierunkowej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z SDS (61, 62), która pozwoliła wykryć w białkach NHC 6 badanych tkanek kilkadziesiąt (56—84) plam białkowych (228, 231).

Zdaniem Buscha większość plam reprezentuje sobą komponenty wspólne białek NHC, a tylko nieliczne — ilościowo bądź jakościowo odmienne. Elektroforogramy białek z szybko rosnących tkanek (wątroba regenerująca, wątrobiak Novikoffa i mięsakorak Walkera) cechuje się wyraźną obecnością 6 plam białkowych (CP, C21, C25, CR, CS i CT), które są tylko słabo zaznaczone wśród białek NHC prawidłowych nerek i wątroby, a także wątroby szczurów poddawanych działaniu tioacetamidu (związku powodującego hipertrofię i wzmożenie funkcji jąder). Trzy plamy, tj. BA, BP i CBL zostały wykryte tylko w elektroforogramach białek NHC wątroby, a plama CJ' — tylko w nerkach. Natomiast białka CG', CH' i CP' okazały się charakterystyczne dla tkanek nowotworowych.

W związku z zogniskowaną w ostatnich latach uwagą na możliwej roli regulatorowej białek NHC luźno związanych z DNA (232, 233), tj. białek ekstrahowanych 0,35M roztworem NaCl z jąder komórkowych (pozbawionych nukleoplazmy), zajęto się pod kierownictwem Buscha (229, 231) rozpuszczalnymi w fenolu [³²P] fosfoproteinami tej frakcji.

Szczególnie interesujące są badania porównawcze dotyczące znakowanych *in vivo* [^{32}P] fosfoprotein wątrobiaka Novikoffa, a także wątroby prawidłowej, regenerującej oraz u szczurów poddawanych działaniu tioacetamidu (231). Wykazały one obecność 4 białek (CMp, C13p, C21p i CU') tylko w tkance nowotworowej, a białek B6 i B10 — tylko w wątrobie prawidłowej, regenerującej i w zasięgu tioacetamidu. Na elektroferogramach białek NHC tych 2 ostatnich tkanek występują 2 plamy (B23 i CU) obecne w wątrobiaku, ale nie wykryte w wątrobie prawidłowej.

Tabela 2

Niektóre dane z analizy dwukierunkowych elektroferogramów (PAGE—SDS) białek NHCP Polipeptydy o specjalnym znaczeniu w proliferacji i neoplazji (228, 231)

Plama białkowa* (polipeptyd)	Wątroba szczurów			Wątrobiak Novikoffa
	prawidłowa	„tioacetami- dowa”	regenerująca	
Fenolorozpuszczalne fosfoproteiny jądrowe (0,35M NaCl) (231)				
B6	+++	++++	++++	—
B10	+++	++++	++++	—
B23	—	++++	++++	++
CU	—	+	++	+++
CMp	—	—	—	+++
C13p	—	—	—	++
C21p	—	—	—	++
CU'	—	—	—	+++
NHCP silnie związane z DNA (frakcja II chromatyny) (228)				
BA	++++	+++	+	—
BP	+++	++++	++++	—
CBL	++++	++	+++	—
BJ'	—	—	—	—
CG'	—	—	—	+++
CH'	—	—	—	+++
CP'	—	—	—	+++

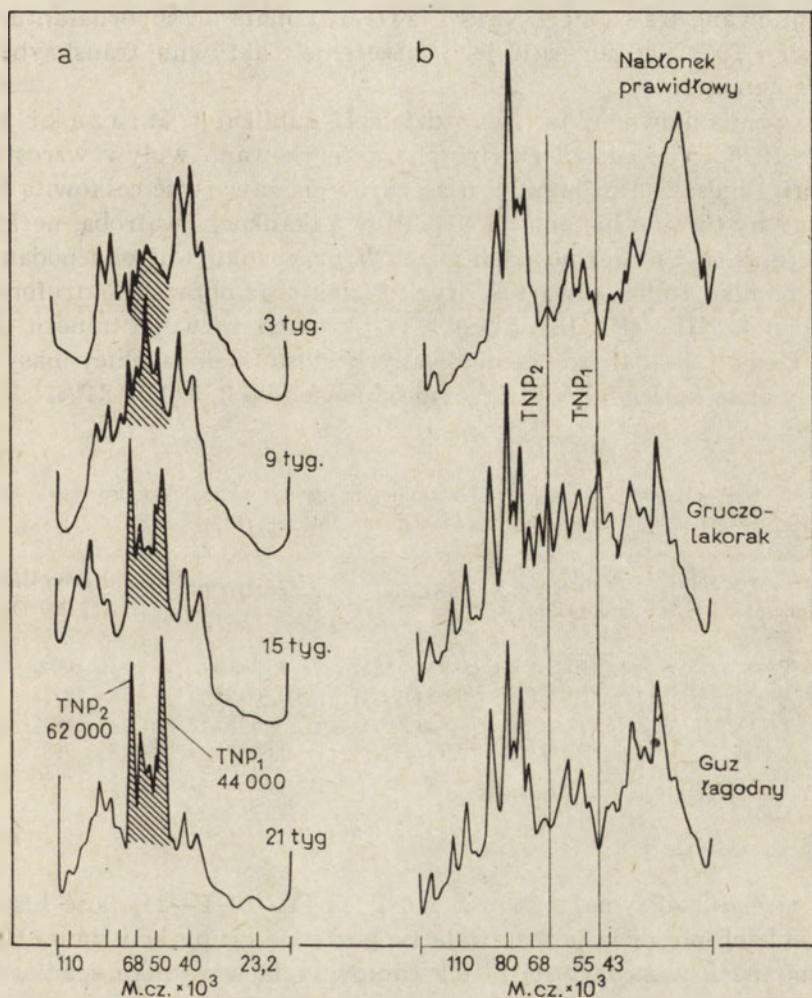
* Klasyfikacja plam wg ich rozmiarów oraz natężenia (gęstości) zabarwienia: ++++ bardzo duże i gęste, +++ mniejsze i gęste, ++ mniej gęste, + śladowe, — brak plamy

Należy przypomnieć (por. rozdz. II), że zastosowanie fenolu powoduje znaczne zateżnienie niektórych białek w fazie fenolowej. Odmienna zawartość głównie białek NHC i alkalilabilnego fosforu cechowała frakcje chromatyny guza puchlinowego Ehrlicha wyekstrahowane roztworami 0,35M NaCl, 2M NaCl — 5M mocznik i pozostałość, w zestawieniu z uzyskanymi z tych ekstraktów białkami fenolorozpuszczalnymi (232). Szczególnie interesującymi z uwagi na wpływ na transkrypcję okazały się

białka NHC luźno związane z DNA (stymulacja) i resztkowe (zahamowanie) (232, 233).

Bardzo intensywne, w porównaniu z kontrolą, włączenie [^3H] tryptofanu w wysokocząsteczkowe polipeptydy niehistonowe (120 000—140 000) zaobserwowano w przypadku neuroblastomy myszy (234).

Wzór elektroforetyczny (PAGE-SDS) i metabolizm (włączenie [^3H] Leu i [^{14}C] Leu) zmienia się w procesie kancerogenezy. Przykładem mogą być wyniki szeroko zakrojonych doświadczeń przeprowadzonych w laboratorium Allfrey'a (235, 236) nad białkami NHC gruczolakoraka indukowanego w okężnicy szczurów cotygodniowym wstrzykiwaniem podskór-



Ryc. 18. Zestawienie profili densytometrycznych (PAGE—SDS) białek NHC luźno związanych z DNA z tkanek nowotworowych i prawidłowych. a) Białka NHC z 4 okresów rozwoju w okężnicy szczura gruczolakoraka indukowanego wstrzykiwaniem DMH (235). b) Białka NHC 3 tkanek jelita grubego u ludzi (236)

nym 1,2-dwumetylohydrazyny (DMH). W puli luźno związanych z DNA białek NHC (ekstrakt w 0,35M NaCl) pojawiają się 2 idywidualne białka nazwane TNP1 (44 000) oraz TNP2 (62 000). Są one jeszcze niewidoczne w densytogramach białek NHC tkanki pobranej w 3 tygodniu, wyraźne w 9 tygodniu, a najwyraźniejsze w 21 tygodniu kancerogenezy (Ryc. 18a). Ale synteza białek NHC okazała się wybitna już po upływie 5 tygodni podawania DMH, a więc na długo przed morfologicznymi objawami uzłóśliwienia tkanki.

Obecność tychże białek została udowodniona w gruczolakoraku innego gatunku, tj. człowieka (236). Nie stwierdzono ich jednak w nabłonku prawidłowym ani w guzach łagodnych jelita grubego (ryc. 18b).

Limitowane trawienie DNazą I (237) uwalniało do supernatantu jedynie białko TNP1, co sugeruje jego sprzężenie z aktywnie transkrybowaną frakcją genomu.

We wzmiankowanej już w rozdziale II publikacji Miazaki i wsp. (122) z 1978 r. po raz pierwszy scharakteryzowano wpływ wzrostu nowotworu (mięsaka Rhodamine) u szczurów na zawartość całkowitą białek chromatyny (w tym histonów i NHCP) w 5 tkankach (wątroba, nerki, śledziona, grasica i mózg) nosiciela guza. W przypadku wątroby podano nawet dynamikę zmian zawartości tych białek oraz obrazu elektroforetycznego białek NHC (PAGE—SDS) w 4 okresach rozwoju tumoru (T—0, T—3, T—11 i T—24), zdeterminowanych stosunkiem ogólnej masy guza do masy ciała nosiciela, wynoszącym odpowiednio 0, 3, 11 i 24^o/_o.

Tabela 3

Wpływ rozwoju mięsaka (Rhodamine) na zawartość białek jądrowych (w mg/mg DNA) wątroby nosiciela (122)

Stadium rozwoju mięsaka*	Białko całkowite	Histon	NHCP	Pasma IID (52 000 D)
T—0	1,85 (100%)	0,93 (100%)	0,78 (100%)	100%
T—3	1,87 (101%)	0,95 (102%)	0,76 (97%)	87%
T—11	1,73 (94%)	0,92 (99%)	0,68 (87%)	89%
T 24	1,66 (90%)	0,90 (97%)	0,65 (83%)	78%

* Stadia rozwoju zdeterminowane stosunkiem:

$$\frac{\text{masa guza}}{\text{masa ciała nosiciela}} \%$$

W okresie maksymalnego wzrostu guza (T—10—T—24) ilość histonów w 5 tkankach nosiciela pozostawała na poziomie grupy kontrolnej (100^o/_o) przy zmianach w zawartości białek całkowitych, w wyniku spadku ilości białek NHC w wątrobie (84 ± 2^o/_o), nerkach (89 ± 6^o/_o) i śledzionie (94 ± 6^o/_o), a nieznacznym wzroście — w grasicy (110 ± 8^o/_o) i mózgu (107 ± 5^o/_o).

Stopniowe obniżenie zawartości białek NHC w wątrobie nosiciela, jakie towarzyszyło rozwojowi nowotworu (Tab. 3), okazało się skorelowane z do-

minującym spadkiem ilościowym komponentu IID (52 000) oraz całości grupy III (30 000—40 000), w tym — pasma IIIG (32 000).

Autorzy zbadali ponadto wpływ endogennej proteazy na białka (w tym NHCP) jąder komórkowych wątroby prawidłowej i nosiciela guza (T—24). Jądra komórkowe były inkubowane bez i w obecności 1 mM DFP (bufor Tris o pH 7,5; 37°C; 6, 18 i 54 h). Inhibitor powodował zahamowanie proteolizy w około 35%. Wstępna analiza elektroforetyczna białek chromosomalnych izolowanych z jąder komórkowych, inkubowanych przez 6 godzin w nieobecności DFP, udowodniła wybiórczą hydrolizę histonu H1 oraz 2 białek NHC, tj. II—A (71 000) i II—B (64 000). Inne białka NHC, włączając pasmo II—D (52 000) i całą grupę III, były stosunkowo odporne na proteolizę w pH 7,5. Zdaniem autorów wyniki te dowodzą, że zaobserwowana przez nich tkankowa specyficzność białek NHC w tkance mięsaka (por. Ryc. 12) oraz w wątrobie nosiciela guza nie jest spowodowana proteolizą.

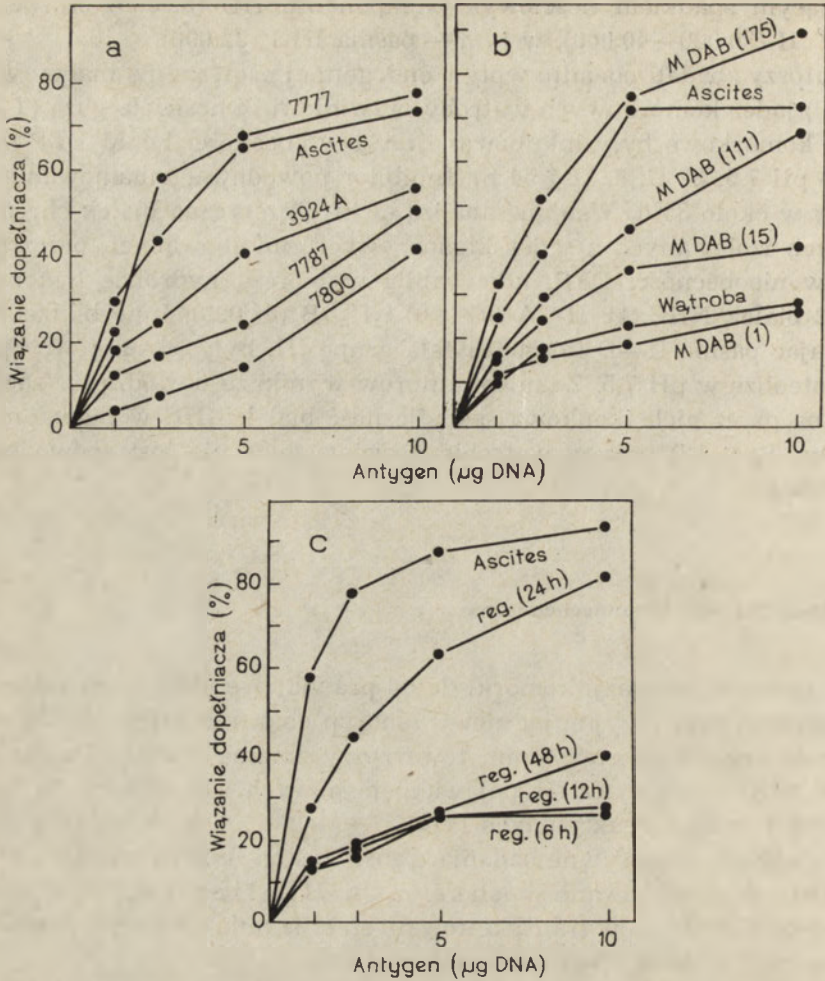
V-2. Specyficzność immunochemiczna

W procesie neoplazji komórki dotąd prawidłowe ulegają transformacji w nowotworowe, przyjmując nowy fenotyp charakterystyczny dla wzrostu złośliwego. Procesowi temu towarzyszy zmiana fenotypu niektórych białek NHC, wyrażająca się pojawieniem nowych ich właściwości immunogennych i immunoreaktywnych (210).

Wyjątkowo intensywne badania transformacji immunochemicznej białek NHC, skoncentrowane w laboratorium Hnilicy (34, 55, 207—217), dotyczyły nowotworów transplantowanych oraz indukowanych chemicznie u szczurów, a także spontanicznych u ludzi.

Większość doświadczeń serologicznych została przeprowadzona z przeciwciałami wytworzonymi z surowicy królika przez wprowadzenie antygeny w postaci odhistonowanej chromatyny z wątrobiaka puchlinowego Novikoffa (*ascites*). Chromatyny 3 tumorów transplantowanych (wątrobiak Novikoffa, AS-30D i mięsakorak Walkera) różniły się tylko nieznacznie między sobą, w reakcji wiązania dopełniacza, ale wybitnie w porównaniu z chromatyną prawidłowej wątroby szczura. Wysłunęto sugestię, że proces nowotworowy zmienia specyficzność oryginalnej tkanki w immunologicznie nowy typ, wspólny dla tumorów transplantowanych (207, por. poz. 5).

Immunoreaktywność chromatyn zmieniała się wraz z indywidualnym tempem wzrostu 4 transplantowanych wątrobiaków Morrisa (Ryc. 19a), tj. w przypadku guzów ubogo zróżnicowanych i szybko rosnących (7777 i 3924 A) była porównywalna z immunoreaktywnością szybko rosnącego wątrobiaka Novikoffa, podczas gdy chromatyny wątrobiaków wolniej ro-



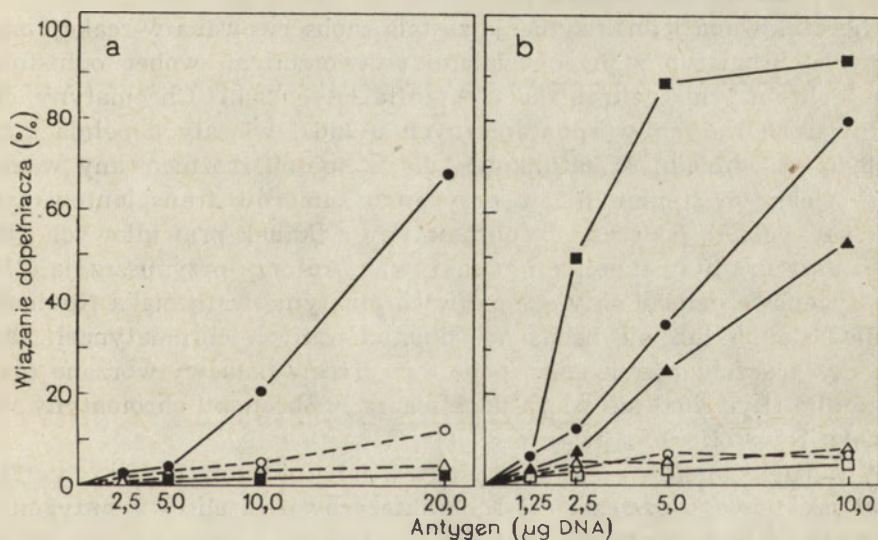
Ryc. 19. Zestawienie krzywych wiązania dopełniacza w obecności przeciwciał przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa przez kompleksy DNA—białko NP a) wątrobiaków Morrisa o różnym tempie wzrostu, b) wątrobiaka indukowanego karmieniem szczurów karcynogenem MDAB przez różne okresy czasu oraz c) wątroby regenerującej w różnych odstępach czasu od częściowej hepatektomii (210)

snących i więcej zróżnicowanych (7800 i 7787) wiązały dopełniacz w mniejszym stopniu.

Transformacji fenotypu komórek prawidłowych w nowotworowe wydaje się towarzyszyć pojawienie się nowych białek chromatynowych, a z uwagi na stosowanie w charakterze immunogenu chromatyn odhistonowanych — białek niehistonowych. Podczas doświadczalnej hepatokarcynogenezy, wywołanej u szczurów karmieniem ich w okresie 175 dni, tzw. 3'MDAB, tj. N,N-dwumetylo-p-/m-tolylazo/aniliną w 10% oleju z kukurydzy (Mazola), zmieniała się stopniowo immunoreaktywność chromatyn,

a w istocie kompleksów białko NP-DNA, badanych co 7 dni na reakcję wiązania dopełniacza (ryc. 19b). Odmienna immunoreaktywność, charakterystyczna dla wzrostu nowotworowego, pojawiała się stosunkowo wcześnie, tj. już po upływie 2 tygodni, osiągając reaktywność odnośnikowej chromatyny wątrobiaka Novikoffa po 111 i 175 dniach karmienia. W pierwszych dniach karmienia reakcja wiązania dopełniacza była taka sama jak w przypadku wątroby prawidłowej szczura.

Dynamika immunoreaktywności chromatyny w hepatokarcynogenezie różni się od zmian będących odpowiedzią komórek wątroby na częściową hepatektomię, a więc w okresie kompensacyjnej hipertrofii tego narządu (Ryc. 19c). Preparaty chromatyny wątroby regenerującej, badane na reakcję wiązania dopełniacza po upływie 6, 12, 24 i 48 godzin od częściowej hepatektomii, cechowały się zróżnicowaną immunoreaktywnością z przeciwciałami przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa, najsilniejszą w 24 godziny od hepatektomii i prawie równą natywnej chromatynie wątrobiaka. Próbkki chromatyny wątroby w okresie 6 i 12 go-



Ryc. 20. Zestawienie krzywych wiązania dopełniacza przez przeciwciała wytworzone przeciwko odhistonowanej chromatynie a) raka płuc u ludzi, b) wątrobiaka Novikoffa w obecności chromatyn różnego pochodzenia, tj. raka płuc u ludzi (●—●), płuca prawidłowego (○—○), wątrobiaka Novikoffa (■—■), prawidłowego gruczołu piersiowego (△—△) w a), zaś w b) — dodatkowo raka gruczołu piersiowego, łożyska i komórek HeLa (△—△), raka gruczołu piersiowego (▲—▲) oraz prawidłowej wątroby szczura (□—□) (214)

dzin regeneracji były istotnie niereaktywne immunologicznie i podobne do chromatyny wątroby prawidłowej. Niewielka immunoreaktywność cechowała też chromatynę po 48 godzinach od hepatektomii a zapewne część

zmian charakterystycznych dla nowotworów może iść na konto szybkiego wzrostu i proliferacji komórek, jaka ma miejsce w 24-godzinnej wątrobie regenerującej (210). Zdaniem Hnilicy i wsp. (216) surowica odpornościowa wyprodukowana wobec odhistonowanej chromatyny wątrobiaka Novikoffa zawiera co najmniej 2 rodzaje przeciwciał: jedne charakterystyczne dla tkanek szybko rosnących, a inne specyficzne dla wzrostu nowotworowego.

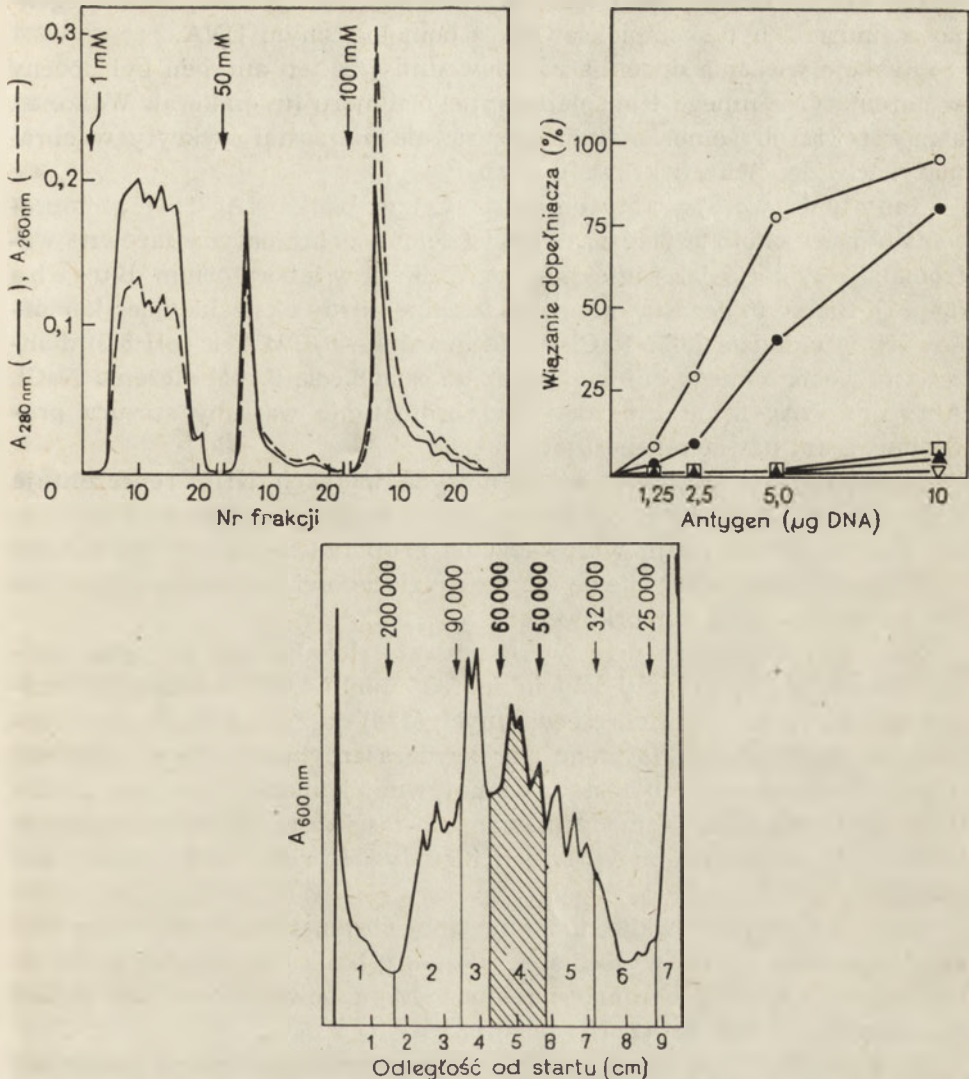
W ostrym kontraście z tymi wynikami są wyniki serologicznych doświadczeń Chiu i wsp. (214) nad spontanicznymi nowotworami u ludzi (rak płaca i gruczołu piersiowego) (Ryc. 20).

Przeciwciała wytworzone wobec odhistonowanej chromatyny, np. raka płuc reagowały wyjątkowo silnie jedynie z chromatyną tego pochodzenia (Ryc. 20a). Wszystkie inne badane chromatyny, a więc: nowotworów spontanicznych u ludzi, w tym złośliwych (rak gruczołu piersiowego) i łagodnych oraz komórek HeLa, zwierzęcych nowotworów transplantowanych (wątrobiak Novikoffa), a także tkanek prawidłowych pochodzenia ludzkiego (płuco, gruczoł piersiowy, łożysko) — nie dawały dodatniej reakcji wiązania dopełniacza.

Nieoczekiwana jednak sytuacja została zaobserwowana w reakcji omawianych chromatyn z przeciwciałami wytworzonymi wobec odhistonowanej chromatyny wątrobiaka Novikoffa (Ryc. 20b). Chromatyny obu złośliwych nowotworów spontanicznych u ludzi wiązały dopełniacz bez względu na odmienność gatunkową, ale w sposób zróżnicowany w znacznie większym stopniu niż w przypadku tumorów transplantowanych (207, por. poz. 5), podczas gdy chromatyny z tkanek prawidłowych człowieka i szczura były zupełnie niereaktywne. Autorzy przypuszczają (214), że antygenowe determinaty obecne w chromatynie wątrobiaka Novikoffa są niedostępne lub nieobecne w odhistonowanych chromatynach raka płuc czy gruczołu piersiowego, ponieważ przeciwciała wytworzone przeciwko nim (Ryc. 20a) nie wiążą dopełniacza w obecności chromatyny wątrobiaka Novikoffa.

W ramach zupełnie niedawnej pracy w laboratorium Hnilicy (215) został częściowo oczyszczony i scharakteryzowany jądrowy antygen w chromatynie wątrobiaka Novikoffa (ryc. 21).

Okazało się nim niejednorodne jeszcze białko o masie 45 000—60 000, wydzielone w wyniku elektroforezy preparatywnej w żelu poliakryloamidowym (ryc. 21c) z wysokocząsteczkowej porcji (25 000—200 000) komponentu, wyeluowanego 50mM buforem fosforanowym w toku chromatografii na hydroksyapatycie (Ryc. 21a) tzw. frakcji UC, tj. pozostałości chromatyny wątrobiaka Novikoffa po wyekstrahowaniu białek niehistonowych luźno związanych z DNA (białek UP). Jedynie ta frakcja, wymywana 50mM buforem fosforanowym, wykazywała immunoreaktywność zbliżoną do rodzimej chromatyny wątrobiaka (ryc. 21b). Wszystkie inne komponenty eluowane z hydroksyapatytu nie wiązały dopełniacza. Oma-



Ryc. 21. Zestawienie danych dotyczących wydzielenia i oczyszczenia białka antygenowego z chromatyny wątrobiaka Novikoffa.

a) Profil frakcjonowania na hydroksypapatycie chromatyny pozbawionej białka UP (elucja buforem fosforanowym o pH 7,0. b) Krzywe wiązania dopełniacza przez przeciwciała przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa w obecności frakcji chromatyny wątrobiaka wyeluowanych z hydroksypapatytu za pomocą 50mM (○—○) oraz 100mM buforu fosforanu potasu (▲—▲), frakcji chromatyny wątroby prawidłowej szczura eluowanej 50mM buforem fosforanowym (□—□), wszystkich innych frakcji z hydroksypapatytu wątrobiaka Novikoffa lub wątroby prawidłowej (▽—▽), o ponadto nierozfrakcjonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa (●—●). c) Wykres z preparatywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym frakcji chromatyny wątrobiaka wyeluowanej z hydroksypapatytu 50mM buforem fosforanowym. Pole zakreskowane odpowiada białku antygenowemu (215)

wiane białko antygenowe, dla okazania jego specyficznego immunogenności, musiało być skompleksowane z homologicznym DNA.

Reakcje wiązania dopełniająca udowodniły, że ten antygen był obecny w chromatynie innego transplantowanego tumoru (mięsakorak Walkera), a nawet wątroby embrionalnej szczura, ale nie został wykryty w chromatynach jego tkanek prawidłowych.

Inny nowotworowy antygen jądrowy, tzw. białko NAg-1, tj. glikoproteina o masie około 26 000, została wydzielona z chromatyny zarówno wątrobiaka Novikoffa jak i mięsakoraka Walkera w laboratorium Buscha (86, 87). Białko to pozostawało rozpuszczalne, kiedy ekstrakt jąder komórkowych w układzie 3,0M NaCl—7,0M mocznik—0,01M Tris (pH 8,0) dializowano wobec samego buforu Tris aż do osiągnięcia 0,15M stężenia NaCl. Antygen NAg-1 nie znaleziono w chromatynie wątroby szczura prawidłowej, ani nawet regenerującej.

Obecność cukrowców w antygenowych białkach NHC reprezentuje nową możliwość modyfikacji ich struktury w uzupełnieniu do fosforylacji, acetylacji, metylacji, wprowadzenia grup tiolowych, czy polimerów ADP-rybozy, a jednocześnie nowy poziom złożoności zagadnienia tych białek w obrębie jądra komórkowego.

Sonda specyficznego przeciwciała pozwala zlokalizować antygeny niehistonowe, zwłaszcza przy użyciu metod immunocytochemicznych bezpośrednich, tj. immunofluorescencyjnych (238) oraz pośrednich, czyli immunoenzymatycznych (system peroksydaza-antyperoksydaza chrzanu) (239). Zastosowanie tych testów do natywnej komórki wyklucza możliwość zniszczenia lub zmodyfikowania właściwości immunologicznych białek NHC na skutek niewłaściwej metody ich izolowania i frakcjonowania.

Przeciwciała przeciwko odhistonowanej chromatynie wątrobiaka Novikoffa reagują *in situ* wysoce specyficznie tylko z chromatyną użytą do immunizacji, a nie z chromatyną innego typu nowotworem (np. HeLa) czy tkanki prawidłowej (217).

Nowotworowa transformacja może być wyrazem głębokich zmian zachodzących podczas różnicowania komórek, któremu towarzyszą dramatyczne zmiany w immunospecyficzności niektórych białek NHC odpowiedzialnych za tkankowo specyficzną regulację genetycznej ekspresji. Zapewne identyfikacja tych białek antygenowych stanowi nieodzowny etap w zrozumieniu mechanizmu kancerogenezy.

VI. Białka NHC enzymatyczne i strukturalne

Zgodnie z przeglądem Steina i wsp. (240) z 1978 r. w bogatej populacji białek NHC znajduje się całą rzeszę enzymów, dających się ująć

w 2 grupy z uwagi na typ substratu, którym mogą być: bądź kwasy nukleinowe, bądź histony i białka NHC.

Do pierwszej grupy zalicza się: polimerazy DNA, polimerazy RNA, nukleazy, ligazy nukleotydomowe, terminalne nukleotydylotransferazy i metylotransferazy. Do drugiej zaś grupy takie enzymy jak: proteazy, fosfo-transferazy (kinazy), metylotransferazy, acetylotransferazy, deacetylazy, polimerazy ADP-rybozylowe, glikohydrolazy poli (ADP-ryboza) a także NMN-adenylotransferazy (241).

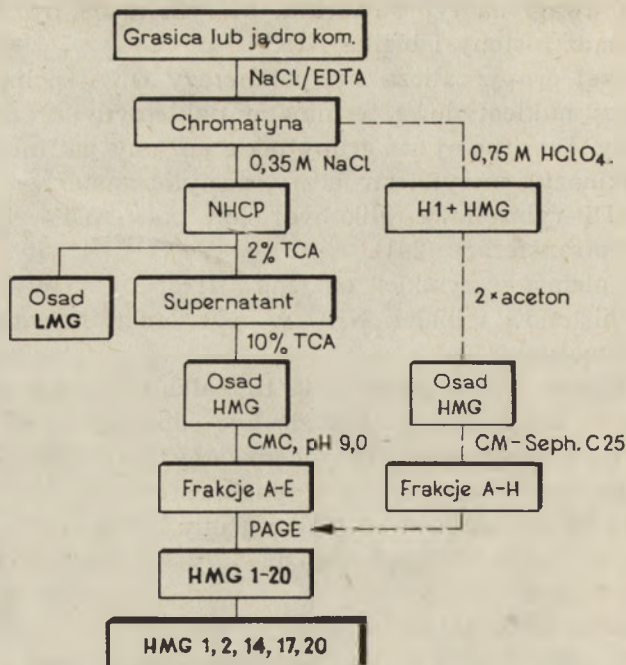
Zadaniem niemal wszystkich enzymów II grupy są post-syntetyczne modyfikacje histonów i białek NHC w celu zmodyfikowania struktury i funkcji chromatyny.

Przeważająca większość białek NHC to białka strukturalne, które wraz z wymienionymi enzymami wydają się być odpowiedzialne za występowanie w profilach densytometrycznych zbadanych dotychczas białek NHC tak wielu pasm wspólnych i różnic w ich zawartości.

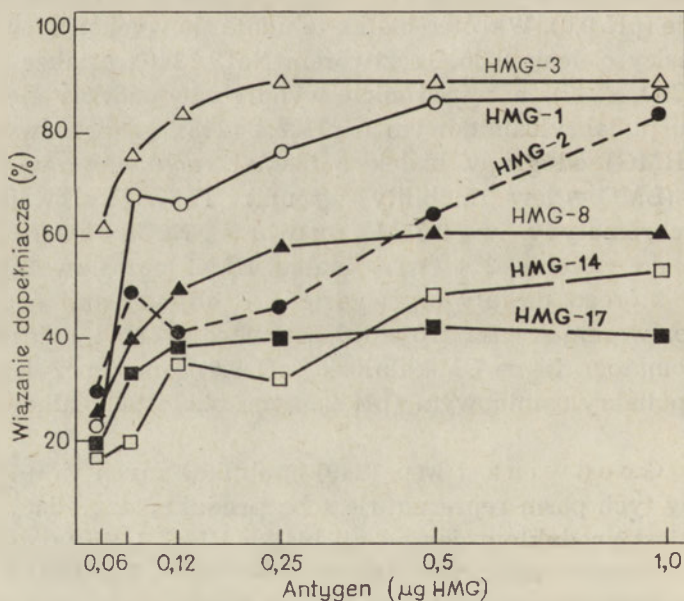
Spośród białek strukturalnych białka grupy HMG, chyba jedyne białka niehistonowe łatwe do wydzielenia, stały się ostatnio przedmiotem intensywnych badań.

Termin białka HMG (*high mobility group*) został wprowadzony przez Johnsa (32, 242) w 1972 r. dla białek wykrytych przez niego jeszcze w 1964 r. (243) jako zanieczyszczenie histonu silnie lizynowego (H1) grasicy cielęcia, odpowiedzialne za wyższą zawartość w preparacie tego histonu aminokwasów kwaśnych (9% zamiast 5% wg Cramptona i wsp. (244)), a także obecność histydyny (245). Zanieczyszczenie to, jako bardziej kwaśne od histonu H1, dawało się usunąć w toku chromatografii na CM-celulozie (pH 9,0). Wkrótce białka te udało się wyekstrahować z chromatyny grasicy cielęcia 0,35M roztworem NaCl (246), a także 0,75M roztworem HClO₄ (247), a wśród nich wyodrębnić podczas elektroforezy w 20% żelu poliakryloamidowym o pH 2,4 (248), grupę o wysokiej ruchliwości (HMG) od grupy białek o niskiej ruchliwości w polu elektrycznym (LMG = low mobility group.) Przy wprowadzeniu do ekstraktu chromatyny w 0,35M roztworze NaCl, kwasu trójchlorooctowego do stężenia 2% (w/v) białka HMG pozostawały w supernatancie, z którego dawały się wydzielić 6 objętościami acetonu (32), lub 10% roztworem kwasu trójchlorooctowego (173), i rozdzielić (247), w toku chromatografii na CM-celulozie (pH 9,0) z następującą elektroforezą w żelu poliakryloamidowym (pH 2,4), na około 20 białkowych pasm (Ryc. 22).

Z badań Goodwina i wsp. (249) opublikowanych w 1978 r. wynika, że szereg tych pasm reprezentuje sobą produkty degradacji, np. białko HMG 3 jest produktem degradacji białka HMG 1, co wydaje się tłumaczyć m.in. identyczną immunoreaktywność HMG 3 i HMG 1 (Ryc. 23) w ramach przeprowadzonych niezależnie w tymże roku pierwszych serologicznych doświadczeń dotyczących białek HMG grasicy cielęcia (250).



Ryc. 22. Schemat izolowania białek HMG (173, 283)



Ryc. 23. Krzywe wiązania dopełniacza przez przeciwsurowicę przeciwko HMG 1 (rozcieńczenie 1:1200) i białka HMG (250)

Badania z laboratorium Johnsa z ostatnich 2 lat doprowadziły do wydzielenia 5 indywidualnych białek HMG grasicy cielęcia lub wieprza, tj. HMG 1, 2, 14, 17, 20. Od 1976 r. białka HMG stały się przedmiotem dowodów innych ośrodków (251—256) zainteresowanych ich łatwą ekstrahowalnością i rozpuszczalnością, a także możliwością uzyskania ich w stanie dużej jednorodności (jedno pasmo w żelu poliakryloamidowym).

Podobnie do histonów nukleosomalnych, a także przeciwciał (245) one wydają się zawierać region niezmienny (N-końcowy) oraz zmienny (C-końcowy). Zostały one wyekstrahowane nie tylko z tkanek ssaków, lecz również z innych źródeł, tj. z tkanek ryb (253, 257), ptaków (254, 255, 258), owadów (251, 252), drożdży i pszenicy (256). Sugeruje się ich obecność również u Procaryota (256).

Niektóre z nich, głównie z grasicy, gruczołów jądrowych pstrąga (253) i erytrocytów ptasich (254, 255, 258) stały się obiektem badania struktury pierwszorzędowej, a nawet wyższego rzędu (259—263). Tabela 4 jest próbą podsumowania dotychczasowych danych o strukturze pierwszorzędowej białek HMG. Ogólnie charakteryzują się one niespotykanym składem aminokwasowym: w przybliżeniu połowa ich reszt to aminokwasy zasadowe (ok. 25% jak w histonach), a także aminokwasy kwaśne (ok. 30%, w odróżnieniu od histonów).

Od 1976 r. datują się badania nad strukturą pierwszorzędową białek HMG (264, 265) uwieńczone rozszyfrowaniem najpierw sekwencji N-końcowej części HMG 17 (75), HMG 1 i HMG 2 (266), HMG 14 (267, 268) oraz HMG—T (trout testis) (253), aż wreszcie w 1977 r. — pierwszej pełnej sekwencji białka niehistonowego, tj. HMG 17 (269). W ubiegłym roku podano N-końcową sekwencję HMG 20, analogiczną do ubikwityny (270) i wręcz niezwykłą kolejność aż 41 wyłącznie aminokwasów kwaśnych wśród 44 reszt C-końcowej części HMG 1 (271).

Rycina 24 podaje pełną sekwencję białka HMG 17, a rycina 25 zestawia poznane fragmenty struktury pierwszorzędowej HMG 1, HMG 2 i HMG—T.

Skład aminokwasowy HMG 17 (75), małego białka o masie 9 247, jest wręcz wyjątkowy nie tylko z uwagi na wysoką zawartość aminokwasów zasadowych (24,3% Lys, 4% Arg) oraz kwaśnych (22,5% Asp + +Glu), ale również fakt, że 3 aminokwasy obojętne (Ala, Pro i Gly) stanowią 42,5% wszystkich aminokwasów, przy braku cysteiny, metioniny, izoleucyny, histydy, tyrozyny, fenyloalaniny i tryptofanu. Wobec braku ostatnich 3 aminokwasów roztwory HMG 17 nie wykazują żadnego pochłaniania w zakresie 260—300 nm (75).

W całkowitej sekwencji 89 reszt aminokwasowych (269) 2/3 cząsteczki od N-końca łańcucha ma charakter wybitnie zasadowy (na 58 aminokwasów — 22 reszty Lys i Arg oraz 7 reszt Glu i Asp). Kontrastuje z nim ujemnie naładowany C-końcowy region cząsteczki, zawierający na 31 reszt tylko 4 aminokwasy zasadowe.

Tabela 4

Zestawienie dotychczasowych danych o strukturze I-rzędowej białek HMG i ubikwiny (Ub)

Tkanka	Frakcja	M.cz. (D)	Ilość amino- kwasów	Asx + Glx (mol %)	Arg + His + Lys (mol %)	Aminokwasy N-końcowe	Aminokwasy C-końcowe	Sekwencja (ilość reszt)	Rok i poz. piśmiennictwa
Grasica cielęcia lub wieprza	HMG 1	28 190	247	29	27	Gly	Lys	N-24— C-44—	1977 (266) 1978 (271)
	HMG 2	28 423	251	27	26	Gly	Lys	N-25—	1977 (266)
	HMG 14			22	27	Pro		N-33—	1978 (268)
	HMG 17	9 247	89	23	28	Pro	Lys	Pełna	1977 (269)
	HMG 20	7 800		26	18	Met		N-20—	1978 (270)
Gruzoły jądrowe pstrąga	Ub	8 400	74	25	17	Met	Arg	Pełna	1975 (284)
	HMG T	28 133	265	22	21	Pro	Lys	N-26—	1977 (253)
	HMG E	28 000		28	24	Ala		50*	
Erytrocyty kaczki i kur- częcia	HMG 1			32	27	Gly		46*	1978 (254)
	HMG 2								
Erytrocyty kurczęcia	HMG 1			30	24				
	HMG 2			28	22				
	HMG 14			24	28				1978 (258)
HMG 17			23	28					

* Ilość [peptydów

W sekwencji HMG 17 zwłaszcza w obszarze N-końcowym stwierdza się wiele zgodności (269) z histonami H1 (272) oraz H6, inaczej histonem T z gruczołów jądrowych pstrąga (273), a także z histonem H5 erytrocytów kurczęcia (274).

Homologie w regionach N-końcowych sekwencji białek HMG 1 i HMG 2 grasicy cielęcia (75) oraz ich odpowiednika z gruczołów jądrowych pstrąga, tj. HMG—T (253), zwanego poprzednio komponentem R (257) — uwidocznione są na rycinie 25.

HMG-1	¹ Gly	Lys	Gly	⁵ Asp	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	¹⁰ Gly
HMG-2	Gly	Lys	Gly	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Gly
HMG-T	Pro	Gly	Lys	Asp	Pro	Asn	Lys	Pro	Lys	Gly
HMG-1	¹¹ Lys	Met	Ser	Ser	¹⁵ Tyr	Ala	Phe	Phe	Val	²⁰ Gln
HMG-2	Lys	Met	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Phe	Val	Gln
HMG-T	Lys	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Phe	Phe	Val	Ala
HMG-1	²¹ Thr	Arg	Arg	Glu	²⁵ -Lys ₃	Asx ₁₂	Glx ₂₉		
HMG-2	Thr	Arg	Arg	Ala	Glu					
HMG-T	Val	Arg	Arg	Glx	Glx	His				

Ryc. 24. Zestawienie dotychczasowych danych o sekwencji aminokwasowej HMG 1 (266, 271), HMG 2 (266) i HMG-T (253)

Pro	Lys	Arg	Lys	Ala	Glu	Gly	Asp	Ala	Lys
Gly	Asp	Lys	Ala	Lys	Val	Lys	Asp	Glu	Pro
Gln	Arg	Arg	Ser	Ala	Arg	Leu	Ser	Ala	Lys
Pro	Ala	Pro	Pro	Lys	Pro	Glu	Pro	Lys	Pro
Lys	Lys	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Gly	Glu	Lys
Val	Pro	Lys	Gly	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Asp
Ala	Gly	Lys	Asx	Gly	Asx	Asx	Pro	Ala	Glx
Asx	Gly	Asx	Ala	Lys	Thr	Asx	Glx	Ala	Glx
Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Gly	Asp	Ala	Lys	

Ryc. 25. Sekwencja aminokwasowa białka HMG 17 (269)

One tłumaczą podobieństwo zachowania się elektroforetycznego w żelu poliakryloamidowym HMG 1 i HMG 2 wyizolowanych przez zespół Johnsona (245) z 3 tkanek (grasica, wątroba, nerki) 3 gatunków (cieleń, szczur, królik), z erytrocytów kurczęcia (245, 258), a ponadto z pszenicy i drożdży (256).

Na brak tkankowej i gatunkowej specyficzności białek HMG 1 i HMG 2 grasicy, wątroby i nerek cielęcia, a także grasicy i erytrocytów kurczęcia oraz erytrocytów kaczki wskazują również doświadczenia grupy Vidali'ego (255) z 1978 r. Dotyczą one białek HMG z grasicy cielęcia i erytrocytów kaczki. Poza analizą w żelu poliakryloamidowym, autorzy po-

dają wyniki jonowymiennej chromatografii na kationicie, oznaczenia składu aminokwasowego, N-końcowych aminokwasów i mapę tryptycznych peptydów. Co prawda zespół *Vidali'ego* (255) znalazł w erytrocytach kaczki i kurczęcia poza HMG 1 i HMG 2 trzecie większe białko, które oznaczył jako HMG—E, uznając je za unikalne dla erytrocytów jądrzastych. Bardzo wnikliwe doświadczenia zespołu *Johnsa* (258) również z 1978 r., przeprowadzone na erytrocytach kurczęcia, przemawiają jednak przeciw koncepcji tkankowej i gatunkowej specyficzności białek HMG.

Zawartość białek HMG 1 i HMG 2, wyliczona przez zespół *Johnsa* (245, 260) wynosi 10^5 — 10^6 cząsteczek na jedno jądro komórkowe, podczas gdy tylko kilka molekuł białek regulatorowych przypada na 1 gen strukturalny (245).

Od 1974 roku bada się interakcję białek HMG, głównie HMG 1 i HMG 2 z DNA (174, 175, 275) i histonami (245). *Johns* i wsp. sugerują, że jest to tylko niespecyficzne wiązanie między zasadowymi aminokwasami, a resztami fosforanowymi DNA.

Badania konformacji cząsteczki HMG 17 (261), przeprowadzone z zastosowaniem dichroizmu kołowego, podczerwieni i magnetycznego rezonansu jądrowego nie wykazały, w przeciwieństwie do HMG 1 i HMG 2 (259, 260), jakiegokolwiek uporządkowania struktury II czy III rzędu. One potwierdzają jonową naturę oddziaływania z DNA, a nawet wskazują na segment cząsteczki HMG 17 wiążący się z DNA, tj. obszar między resztami aminokwasowymi w pozycjach 15 i 40 (ryc. 24).

Warto dodać, że w białkach HMG 1 i HMG 2 stwierdzono obecność α -helikalnego zwinięcia łańcucha polipeptydowego w zakresie od 1/3 do 1/2 cząsteczki (175). Białka te wykazują silne powinowactwo do histonów (254), zwłaszcza do histonu H 1 (275).

Interesujący jest wpływ tych białek NHC, przypuszczalnie strukturalnych, na proces transkrypcji (245). W przeciwieństwie do histonów, nie okazują one żadnego oddziaływania na matrycową aktywność DNA, nawet przy stosunku białko/DNA = 5. Zdaniem autorów fakt ten może być wytłumaczony bądź 1) brakiem podobnego do histonów silnego powinowactwa białek HMG do DNA, bądź 2) pozostawieniem w roztworze kompleksu DNA z białkami HMG. Już od dawna *Hoare* i *Johns* (276, 277) lansują koncepcję godzącą w wyniki całej rzeszy badaczy, a mianowicie, że zahamowanie matrycowej aktywności DNA przez histony jest po prostu wynikiem strącenia kompleksu histon—DNA i niedostępności matrycy dla polimerazy RNA. Ważne jest stwierdzenie, że rozpuszczalny kompleks DNA—HMG 1 ma tę samą aktywność matrycową, co czysty DNA. Wydaje się to sugerować, że DNA całkowicie pokryty białkami HMG może ulegać transkrypcji.

Zespół *Johnsa* (278) był pierwszym, który metodami elektroforetycznymi w żelu poliakryloamidowym wykrył obecność 4 białek HMG

(1, 2, 14 i 17) w mononukleosomach grasicy cielęcica. Do dziś kontrowersyjną jednak jest sprawa udziału tych białek w aktywnych regionach chromatyny, sugerowana przez Levy'ego i Dixona (279) dla gruczołów jądrowych pstrąga, grupę Allfrey'a (254) dla erytrocytów kaczki, a nawet na wcześniejszych etapach przez zespół Johnsa (245). W dociekliwych badaniach erytrocytów jądrzastych kurczęcia z ubiegłego roku (280) wycofał się on jednak z poprzedniego stanowiska, dowodząc braku białek HMG w produktach trawienia chromatyny DNazą, która zgodnie z pracami Weintrauba i Groudine'a (237) ma selektywnie degradować DNA genów aktywnie transkrybowanych. Odnosi się wrażenie, że w polemice zespołów Allfrey'a i Johnsa jak narazie — słuszność jest po stronie tego ostatniego. W „*note in proof*” dołączonej do niedawnej jego publikacji (280) dodaje, że nawet zastosowanie buforu EDTA o niskiej sile jonowej, który odróżniał warunki doświadczeń obu zespołów, większość białek HMG (1, 2, 14 i 17) pozostaje związana z fragmentami chromatyny o rozmiarach mono- i polinukleosomów.

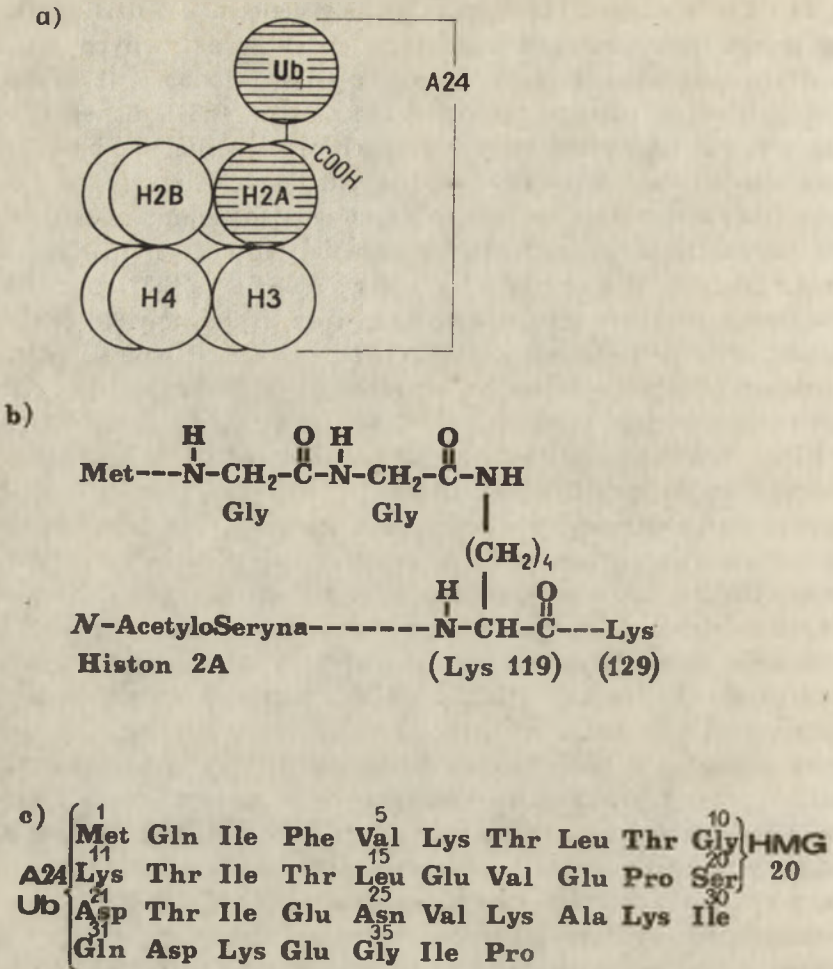
Dalsze badania są niezbędne do rozstrzygnięcia sprawy specyficzności białek HMG i ich występowania w regionach aktywnej chromatyny.

Zapewne ogromnie pomocne okażą się metody immunologiczne. Wstępne badania immunoenzymatyczne (281) przy użyciu przeciwsurowicy królika przeciwko białkom HMG 1 i HMG 2 grasicy wieprza oraz zsynchronizowanych hodowli różnych linii komórkowych (grasicy i nerek wieprza, myszy, jajników chomika chińskiego, HeLa), także białek HMG 1 i HMG 2 grasicy królika i cielęcica pozwoliły już stwierdzić niewykrywalne dotąd jakościowe różnice gatunkowe między tymi białkami. Zlokalizowano je w chromosomach podczas mitozy, a także wykryto, skorelowane z cyklem komórkowym, nieznaczne zmiany w ich reaktywności z systemem peroksydaza — antyperoksydaza. Zmiany te wydają się być wyrazem różnic w antygenowych determinantach HMG 1 i HMG 2 oraz w dostępności tych miejsc antygenowych podczas różnych faz cyklu komórkowego.

Ze stosunku molowego (1:50) białek HMG 1 i HMG 2 do całości histonów przypuszcza się, że w przybliżeniu 1 cząsteczka HMG 1 i HMG 2 przypada na 10 nukleosomów (282). Oddziaływanie tych białek na konfigurację heliksu DNA (rozwiniecie lub wyższego rzędu zwinięcie) przemawia za ważną ich rolę w strukturze, a przez to i funkcji chromatyny.

Ostatnią sensacją w biochemii białek chromatyny jest wykrycie w nukleosomach (285, 286) tzw. białka A24 o wręcz niespotykanej rozgałęzionej strukturze w kształcie litery „Y”, a zawierającego 2 N-terminalne zakończenia polipeptydowe na jedno C-końcowe. Złożone jest ono z histonu H2A i białka NHC, którego C-terminalny peptyd Gly-Gly łączy się kowalencyjnie wiązaniem izopeptydowym z ϵ -aminową grupą lizyny w pozycji 119 histonu H2A (ryc. 26b).

Jest ono najciekawsze i najlepiej scharakteryzowane spośród szeregu



Ryc. 26. Zestawienie danych dotyczących udziału białka A24 w strukturze nukleosomu (270, 284—285). a) Rozgałęziona cząsteczka białka A24 (kule zakreskowane) wmontowana w oktameryczny rdzeń nukleosomu złożony z dimerów H2A, H2B, H3 i H4. Część histonowa białka A24 zajmuje miejsce cząsteczki H2A w rdzeniu nukleosomalnym, podczas gdy ubikwityna znajduje się na zewnątrz rdzenia (286). b) 2 polipeptydy białka A24 połączone ze sobą wiązaniem izopeptydowym między glicyną z NHCP i ϵ -aminową grupą lizyny w pozycji 119 histonu H2A (285). c) N-końcowa sekwencja 37 reszt białka A24 (285), identyczna z ubikwityną (284) i białkiem HMG 20 (270)

indywidualnych białek NHC jądrowych i jąderkowych, a otrzymywanych od 1973 r. przez zespół B u s c h a (153, 229, 285—296) z tkanek o wzroście prawidłowym i patologicznym. Zawartość jego spadała najszybciej w czasie hipertrofii jąderki wątroby szczura, indukowanej tioacetamidem (289) lub procesem regeneracji wątroby (290), co wskazywało na udział w represji genów jąderkowych.

Białko A24 daje się ekstrahować 0,4N roztworem H_2SO_4 wraz z histonami, stanowi niemal 1,9% totalnej sumy histonów H2A + H2B + H3 + H4. Ilość jego w histonie H2A jest obliczana na 3—4% (245) do 10% (286). Zawiera niemal równą ilość aminokwasów kwaśnych i zasadowych (153), tryptyczne i chymotryptyczne peptydy histonu H2A jak również dodatkowe, należące do białka NHC (291), a wreszcie niezablokowaną N-końcową sekwencję 37 reszt (ryc. 26c) obok N-terminalnej acetyloseryny z pełną sekwencją histonu H2A (285, 292).

Pierwszymi, którzy dostrzegli identyczność sekwencji tych 37 aminokwasów białka A24 z N-końcowym fragmentem ubikwityny, 74-aminokwasowego polipeptydu o charakterze hormonu (284), byli Hunt we współpracy z Małgorzatą D a y h o f f (297), która od 1966 r. jest redaktorem 5 tomów „Atlasu Sekwencji i Struktury Białek” (298).

Ubikwityna, poprzednio „tymina” (299), tymopoetyna (300), a wreszcie UBIP (*ubiquitous immunopoietic polypeptide*), została wykryta niemal przypadkowo przez Goldsteina z Bostonu (299, 302) w ramach jego wieloletnich prac nad doświadczalną miastenią (*myasthenia gravis*), w którym to niedowładzie mięśni zaburzeniu przewodnictwa impulsów w synapsach nerwowo-mięśniowych towarzyszy z reguły uszkodzenie grasicy. W 1974 r. wydzielono ją w stanie wysokiej czystości z pełnego homogenatu grasicy wołu (chromatografia na SP-Sephadex, HPT i QAE-Sephadex ekstraktu w 0,1M roztworze dwuwęglanu amonu) (299), a w rok później — metodami immunoizotopowymi (z $[^{125}J]$ UBIP jako II antygenem) — wykryto we wszystkich badanych tkankach ssaków, ptaków, ryb oraz wyższych roślin, w hodowanych komórkach prawidłowych i nowotworowych, a ponadto w drożdżach i bakteriach (np. *E. coli*, *Clostridium histolyticum*) (301). W doświadczeniach *in vitro* tymopoetyna obniżała transmisję impulsów w stykach nerwowo-mięśniowych, ale przede wszystkim stymulowała różnicowanie prekursorów immunocytów grasicy, a nawet śledziony oraz szpiku, i to bez względu na gatunek, w limfocyty T (*thymus-derived*), podczas gdy ubikwityna z innych tkanek — odpowiednią transformację w limfocyty zarówno typu T, jak i B (*bone marrow-derived*). Ten stymulatorowy wpływ wydawał się być spowodowany aktywacją cykazy adenylowej, prawdopodobnie poprzez wiązanie ubikwityny z β -adrenergicznymi receptorami w błonie komórek docelowych (300, 301). Funkcjonowanie ubikwityny *in vivo*, chociaż nadal nieustalone, zapewne jest podstawowego znaczenia dla wszystkiego, co żyje, z powodu uniwersalnej obecności oraz niespotykanie konserwatywnej struktury pierwszorzędowej (284, 301). Stałość sekwencji aminokwasowej ubikwityny z tak odległych ewolucyjnie źródeł jak grasicca wołu i łodyga selera, daje się porównać jedynie z konserwatywnością molekularną histonów H4, H3 i H2A, a nawet jest wyższego rzędu z uwagi na występowanie tego białka nie tylko u *Eucaryota*, ale i u *Procaryota*.

I oto ten niezwykle uniwersalny polipeptyd okazał się niehistonowym fragmentem wmontowanym w strukturę chromatyny. Hunt i Dayhoff zastanawiając się nad różnicą (ok. 4550) między masą cząsteczkową białka A24 (ok. 27 000) oraz sumaryczną masą histonu H2A (14 000), i ubikwityny (8451), wyrażają przypuszczenie, że w pełnej sekwencji białka A24 zostanie wykryty dalszy ciąg od 38. do 74. aminokwasu ubikwityny, a także jakiś hydrofilowy peptyd łącznikowy (297).

Zespół Buscha zidentyfikował izopeptydowe wiązanie białka NHC z histonem H2A (285) i zaproponował model rdzenia nukleosomalnego z cząsteczką A24 (286) (Ryc. 26a). Co więcej, pokusił się o zlokalizowanie (294) białka A24, ewentualnie jego fragmentów we frakcjach chromatyny wzbogaconych (supernatant S2) oraz ubogich (osady P1 i P2) w transkrybowane sekwencje DNA, a uzyskanych za pomocą techniki DNaza II — 2mM MgCl₂, opracowanej w laboratorium Bonnera (303). Zaskakującym było stwierdzenie metodą dwukierunkowej elektroforezy (62) obecności białka A24, wraz z nukleosomalnymi histonami, we frakcjach P1 i P2, a wolnej ubikwityny — w supernatancie zawierającym chromatynę aktywną w procesie transkrypcji. Wydaje się prawdopodobne, że sprzężenie ubikwityny z histonem H2A zmienia konformację chromatyny w kierunku obniżenia jej matrycowej aktywności, a rozszczepienie cząsteczki białka A24 — wzmaga w niej proces transkrypcji, zwiększając dostępność chromatyny dla polimerazy RNA bądź bezpośrednio, bądź przez wzrost stężenia ubikwityny. Białko A24 jako całość ulega ADP-rybozylacji kilkakrotnie efektywniej niż histon H2A (85), co uzasadnia przypuszczenie, że ta post-translacyjna kowalencyjna modyfikacja może być zaangażowana w represorową funkcję białka A24.

N-końcowa sekwencja ubikwityny została ostatnio odnaleziona w oznaczonej kolejności pierwszych 20 aminokwasów białka HMG 20 grasicy cielęcia (270) (por. Tab. 4), a jej pełna sekwencja — w indywidualnym białku niehistonowym (S), jakie obok HMG—T (253) dało się wyekstrahować 0,35M roztworem NaCl z chromatyny gruczołów jądrowych pstrąga (304). Podczas limitowanego trawienia tej chromatyny mikrokokalną nukleazą uwalniały się do supernatantu zarówno HMG—T jak i białko S (wolna ubikwityna), co przemawiało za ich występowaniem w łącznikowych regionach między nukleosomalnych (304).

Kto wie, czy to uniwersalne białko, wykryte obecnie w chromatynie, a nie będące histonem, doskonale zakonserwowane w procesie ewolucji molekularnej, dla którego sugeruje się również uniwersalne biologicznie oddziaływanie na cyklazę adenylową błony komórkowej (300, 301), nie odgrywa kluczowej roli w procesie różnicowania komórek i zróżnicowanej ekspresji genu (304).

Niezbędne są dalsze dociekliwe doświadczenia w celu rozszyfrowania udziału białek niehistonowych w strukturze a przez to i funkcji chroma-

tyny, zagadnienia — które z każdym rokiem stają się coraz bardziej skomplikowane, ponieważ zawrotny postęp badań odśladania z roku na rok coraz to bardziej nieoczekiwane elementy wspaniałej maszyny aparatu genetycznego.

Zaakceptowano do druku 27.03.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Bartkowiak J., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 263—296.
2. Kłyszejko-Stefanowicz L., Bartkowiak J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 347—388.
3. Lipińska A., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 145—164.
4. Phillips D. M. P., (1971), *Histones and Nucleohistones*, Plenum Press, London.
- 4a. Kiliańska Z., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1973), *Post. Biochem.*, **19**, 533—558.
5. Kiliańska Z., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 31—50.
6. Kańska-Brudzyńska K., Walter Z., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 157—173.
7. Rakowicz-Szulczyńska E. M., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 189—209.
8. Famulski K. S., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 379—397.
9. Wieland E., (1978), *Post. Biol. Kom.*, **5**, 217—232.
10. Krajewska W., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 177—194.
11. Kiliańska Z., Kłyszejko-Stefanowicz L., (1978), *Post. Biochem.*, **24**, 431—442.
12. Horst A., (1976), *Post. Biol. Kom.*, **3**, 127—153.
13. Choraży M., (red.), (1978), *Genom organizmów zwierzęcych struktura i transkrypcja*, Monografie Biochemiczne, Nr 30, str. 1—123, PWN, Warszawa.
14. Niedźwiedzka A., Kaliński A., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 175—188.
15. Michalska J., (1977), *Post. Biol. Kom.*, **4**, 371—391.
16. Hübner H., Kononowicz A. K., (1977), *Post. Biol. Kom.*, **4**, 339—370.
17. Lilienfield L., (1893), *J. Physiol. Chem.*, **18**, 1472.
18. Mirsky A., Pollister A. W., (1946), *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117—147.
19. Patel G. L., Wang T. Y., (1964), *Exp. Cell Res.*, **34**, 120—130.
20. Wang T. Y., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1220—1226.
21. Kłyszejko-Stefanowicz L., Polanowska Z., (1971), *Post. Biochem.*, **17**, 601—629.
22. Wang T. Y., (1966), *J. Biol. Chem.*, **241**, 2913—2917.
23. Marushige K., Brutlag D., Conner J., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3149—3155.
24. Gilmour R. S., Paul J., (1969), *J. Mol. Biol.*, **40**, 137—139.
25. Bekhor J., Kung G. M., Bonner J., (1969), *J. Mol. Biol.*, **39**, 351—364.
26. Benjamin W., Gellhorn A., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 262—268.
27. Hill R. J., Poccia D. L., Doty P., (1971), *J. Mol. Biol.*, **61**, 445—462.

28. Arnold E. A., Young K. E., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 482—496.
29. Elgin S. C. R., Bonner J., (1972), *Biochemistry*, **11**, 772—781.
30. Steel W. J., Busch H., (1963), *Cancer Res.*, **23**, 1153—1163.
31. Shelton K. R., Allfrey V. G., (1970), *Nature*, **228**, 132—134.
32. Goodwin G. H., Sanders C., Johns E. W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **38**, 14—19.
33. Patel G. L., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron J. L., Jeter J. R., Jr., str. 30—57, Academic Press, London.
34. Chiu J.-F., Hunt M., Hnilica L. S., (1975), *Cancer Res.*, **35**, 913—919.
35. Krivcov G. G., Bogdanow A. A., (1970), *Mol. Biol.*, **4**, 422—427.
36. Umanskiy S. R., Tokarskaja W. J., Zotova R. N., Migusina W. J., (1971), *Mol. Biol.*, **5**, 270—279.
37. Levy S., Simpson R. T., Sober H. A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1547—1554.
38. Mackay M., Hilgartner C. A., Dounce A. L., (1968), *Exp. Cell. Res.*, **49**, 533—557.
39. Wilson E. M., Spelsberg T. C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 145—154.
40. Yoshida M., Shimura K., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **263**, 690—696.
41. Okazaki T., Kornberg A., (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 259—268.
42. Simon J. H., Becker W. M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta.*, **454**, 154—171.
43. Kikuchi H., Sato S., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **532**, 113—121.
44. Shaw L. M. J., Huang R. C. C., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4530—4542.
45. Graziano S. L., Huang R. C. C., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4470—4476.
46. Van den Broek H. W. J., Noodén L. D., Sevall J. S., Bonner J., (1973), *Biochemistry*, **12**, 229—236.
47. Faulhaber J., Bernardi G., (1967), *Biochim. Biophys. Acta*, **140**, 561—564.
48. MacGillivray A. J., Cameron A., Krauze R. J., Rickwood D., Paul J., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 384—402.
49. Rickwood D., MacGillivray A. J., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **51**, 593—601.
50. Bhorjee J. S., Pederson T., (1976), *Biochim. Biophys. Acta.*, **418**, 154—159.
51. Chaudhuri S., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **322**, 155—165.
52. Monahan J. J., Hall R. H., (1973), *Can. J. Biochem.*, **51**, 709—720.
53. Langan T. A., (1967), w *Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis*, red. Königsberger V. V., Bosch L., str. 223—242, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
54. Teng C. S., Teng C. T., Allfrey V. G., (1971), *J. Biol. Chem.* **246**, 3597—3609.
55. Chiu J.-F., Hnilica L. S., (1977), w *Chromatin and Chromosome structure*, red., str. 193—254, Academic Press, London.
56. Raymond S., Wang Y., (1960), *Analyt. Biochem.*, **1**, 391—396.
57. Shapiro A. L., Venuela E., Maizel Jr., J. V., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **28**, 815—820.
58. Weber K., Osborn M., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406—4412.
59. Laemmli U. K., (1970), *Nature*, **227**, 680—685.
60. Kaltschmidt E., Wittman H. G., (1970), *Analyt. Biochem.*, **30**, 401—412.
61. Yeoman L. C., Taylor C. W., Jordan J. J., Busch H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1067—1076.
62. Busch G. J., Yeoman L. C., Taylor C. W., Busch H., (1974), *Physiol. Chem. Phys.*, **6**, 1—10.
63. Gronow M., Griffiths G., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 340—344.

64. Gronow M., Thackrah T. M., (1978), *Experientia*, **34**, 430.
65. Barret R., Gould H. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **294**, 165—171.
66. MacGillivray A. J., Rickwood D., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 181—190.
67. O'Farrel P. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007—4021.
68. Jackowski G., Suria D., Liew C. C., (1976), *Can. J. Biochem.*, **54**, 9—14.
69. Peterson J. L., McConkey E. H., (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 548—554.
70. Elgin S. C. R., Stamph W. E., (1975), w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Foundation Symposium, t. 28, str. 113—130, Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
71. Fleischer-Lambropoulos H., Pollow K., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 773—780.
72. Stein G. S., Stein J. S., Kleinsmith C. J., (1975), *Scientific American*, **232**, 46—57.
73. Garrard W. T., Pearson W. R., Wake S. K., Bonner J., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 50—57.
74. Candido E. P. M., Honda B. M., Baillie D. L., (1976), *FEBS Letters*, **61**, 260—262.
75. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 72—78.
76. Hacha R., Fredricq E., (1975), *Eur. J. Biochem*, **52**, 83—92.
77. Kleinsmith L. J., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron J. L., Jeter J. R. Jr., str. 103—135, Academic Press, London.
78. Berendes H. D., Helmsing P. J., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron J. L., Jeter J. R., Jr., str. 191—212, Academic Press, London.
79. Kadohama N., Anderson K. M., (1977), *Canad. J. Biochem.*, **55**, 513—520.
80. Thakur M. K., Ratna Das, Kanungo M. S., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 828—831.
81. Bronow M., Thackrah T., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 377—386.
82. Gronow M., Lewis F. A., (1975), *Exp. Cell. Res.* (1975), **93**, 225—229.
83. Ochalska-Czepulis M., Bitny-Szlachto S., (1977), *Int. J. Biochem.*, **8**, 831—834.
84. Tanigawa Y., Kawamura M., Shimoyama M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 406—412.
85. Okayama H., Hayaishi O., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **84**, 755—762.
86. Yeoman L. C., Jordan J. J., Busch R. K., Taylor C. W. Savage H. E., Busch H., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 3258—3262.
87. Davis F. M., Busch R. K., Yeoman L. C., Busch H., (1978), *Cancer Res.*, **38**, 1906—1915.
88. Valmet E., (1969), *Science Tools*, **16**, 1.
89. Rodriguez L. V., Becker F. F., (1976), *Arch. Biochem. Biophys*, **173**, 438—447.
90. Montagna R. A., Rodriguez L. V., Becker F. F., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 617—624.
91. Rodriguez L. V., Becker F. F., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 428—437.
92. Frenster J., (1965), *Nature*, **206**, 680—683.
93. Tsanev R., Hadjiolov D., (1978), *Z Krebsforsch.*, **91**, 237—247.
94. Luboń H., Tyrawska-Spychałowa D., (1978), *Post. Biol. Kom.*, **6**, 31—49.

95. Davis R. H., Copenhaver J. H., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 473—477.
96. Elgin S. C. R., Bonner J., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4440—4447.
97. Wu F. C., Elgin S. C. R., Hood L. E., (1973), *Biochemistry*, **12**, 2792—2797.
98. Elgin S. C. R., Boyd J. B., Hood L. E., Wray W., Wu F. C., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 821—833.
99. Elgin S. C. R., Stumph W. E., (1975) w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Foundation Symposium, t. **28**, str. 113—130 Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
100. Silver L. M., Elgin S. C. R., (1978), w *The Cell Nucleus*, tom. 5, red. Busch H., str. 215—262, Academic Press, London.
101. Rickwood D., Riches P. G., MacGillivray A. J., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **299**, 162—171.
102. Russev G., Anachkova B., Tsanev R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 253—257.
103. Djondjurov L. P., Ivanova E. C., Tsanev R. G., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **77**, 545—553.
104. Koleva St., Tsanev R. G., (1978), *Cell Differentiation*, **7**, 83—88.
105. Yeoman L. C., Seeber S., Taylor Ch. W., Fernbach D. J., Falletta J. M., Jordan J. J., Busch H., (1976), *Exp. Cell. Res.*, **100**, 47—55.
106. Fujitani H., Holoubek V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1300—1305.
107. Fujitani H., Holoubek V., (1974), *Experientia*, **30**, 474—476.
108. Fujitani H., Holoubek V., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 547—554.
109. Platz R. D., Kleinsmith L. J., (1976), *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**, 9—18.
110. Bhorjee J. S., Pederson T., (1976), *Analyt. Biochem.*, **71**, 393—404.
111. Platz R. D., Hnilica L. S., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 222—227.
112. Davis R. H., Copenhaver J. H., Carver M. J., (1975), *Int. J. Biochem.*, **6**, 399—404.
113. Chatterjee R., Narayanaswami A., (1977), *Indian J. Biochem. Biophys.*, **14**, 251—254.
114. LeSturgeon W. M., Totten R., Forer A., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron J. W., Jeter J. B., Jr., str. 59—102, Academic Press, London.
115. Rubin R. W., Hill M. C., Hepworth P., Boehmer J., (1976), *J. Cell Biol.*, **68**, 740—751.
116. Allfrey V. G., Inoue A., Karn J., Johnson E. M., Good R. A., Hadden J. H., (1975), w *The Structure and Function of Chromatin*, Ciba Foundation Symposium, t. **28**, str. 199—228, Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
117. Leibovitch M. P., Tichonicky L., Kruh J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 623—629.
118. Blüthmann H., (1978), *Molec. Biol. Rep.*, **4**, 97—100.
119. Platz R. D., Stein G. S., Kleinsmith L. J., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 735—740.
120. Jeter J. R., Jr, Cameron J. L., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron I. L., Jeter J. R., Jr., str. 213—245, Academic Press, London.
121. Stein G. S., Hunter G., Lavie L., (1974), *Biochem J.*, **139**, 71—76.
122. Miyazaki K., Hagiwara H., Nagao Y., Matuo Y., Horio T., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 135—143.

123. Hagiwara H., Nagao Y., Miyazaki K., Nakamura T., Horio T., (1977), *Proc. Japan, Biochem. Soc., 50th Ann. Meet.*, **49**, 702 (cyt. wg poz. 122).
124. Douvas A. S., Harrington C. A., Bonner J., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3902—3906.
125. Douvas A. S., Bakke A., Bonner J., (1977), w *The Molecular Biology of the Mammalian Genetic Apparatus*, red. Ts'o P., str. 143—163, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
126. Comings D. E., Harris D. C., (1975), *Exp. Cell Res.*, **96**, 161—179.
127. Comings D. E., Harris D. C., (1976), *J. Cell Biol.*, **70**, 440—452.
128. Jockusch B. M., Becker M., Hindennach I., Jockusch M., (1974), *Exp., Cell Res.*, **89**, 241—246.
129. LeStourgeon W. M., Forer A., Lang L. Z., Bertram J. S., Rusch H. P., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 529—552.
130. Comings D. E., Okada T. A., (1976), *Exp. Cell Res.*, **103**, 341—360.
131. Lazarides E., Weber K., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2268—2272.
132. Watterson D. M., Van Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2711—2715.
133. Sanger J. W., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2451—2455.
134. Cande W. Z., Lazarides E., McIntosh J. A., (1977), *J. Cell Biol.*, **72**, 552—567.
135. Corces V. G., Avila J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **83**, 529—535.
136. Goldstein L., Ko Ch., Errick J., (1977), *Cell Biol. Int. Rep.*, **1**, 511—515.
137. Gilbert W., Mueller-Hill B., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **56**, 1891—1898.
138. Riggs A. D., Bourgeois S., Newby R. F., Cohn M. J., (1968), *J. Mol. Biol.*, **34**, 365—368.
139. Ptashne M., (1967), *Nature*, **214**, 232—234.
140. Allfrey V. G., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron I. L., Jeter J. R., Jr., str. 2—27, Academic Press, London.
- 140a. Bloom K. S., Anderson J. N., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4446—4450.
141. Litman R. M., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6222—6233.
142. Alberts B. M., Amodio F. J., Jenkins M., Gutmann E. D., Ferris F. J., (1968), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **33**, 289—305.
143. Gilham P. T., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2809—2813.
144. Kleinsmith L. J., Heidema J., Carroll A., (1970), *Nature*, **226**, 1025—1026.
145. Cavalieri L. F., Carroll E., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **67**, 807—812.
146. Rickwood D., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **269**, 47—50.
147. Schaller H., Nüsslein C., Bonhoeffer F. J., Kurz C., Nietzschmann J., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **26**, 474—481.
148. Blüthmann H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **70**, 233—240.
149. Kleinsmith L. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5648—5653.
150. Blüthmann H., (1978), *Molec. Biol. Rep.*, **4**, 33—37.
151. Blüthmann H., Mrozek S., Gierer A., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 315—326.
152. Tiselius A., Hjertén S., Levin O., (1966), *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 132—135.
153. Goldknopf I. L., Taylor C. W., Baum R. M., Yeoman L. C., Olson O. J., Prestayko A. W., Busch H., (1975), *J. Biol., Chem.*, **250**, 7182—7187.
154. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2124—2132.

155. Wang T. Y., Johns E. W., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **124**, 176—183.
156. Kaplowitz P. B., Platz R. D., Kleinsmith L. J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **229**, 739—748.
157. Caifa P., Allegra P., Ferraro A., Barra D., Biagioni S., Turano C., (1977), *Bull. Mol. Biol. Med.*, **2**, 165—171.
158. McCleary A. R., Noodén L. D., Kleinsmith L. J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5199—5205.
159. Conner B. J., Comings D. E., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **532**, 122—136.
160. Noodén L. D., Van den Broeck H. W. J., Sevall J. S., (1973), *FEBS Letters* **29**, 326—328.
161. Lapeyre J.-N., Bekhor I., (1976), *J. Mol. Biol.*, **104**, 25—58.
162. Gadski R. A., Chae C.-B., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3812—3817.
163. Patel G. L., Thomas T. L., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 2524—2528.
164. Patel G. L., Thomas T. L., (1975), w *Chromosomal Proteins and their Role in Regulation of Gene Expression*, red. Stein G. S., Kleinsmith L. J., str. 249—264, Academic Press, London.
165. Chiu J.-F., Wang S., Fujitani H., Hnilica L. S., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4552—4558.
166. Rickwood D., MacGillivray J., (1977), *Exp. Cell Res.* **104**, 287—292.
167. Birnie G. D., Rickwood D., Hell A., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 283—294.
168. Umansky S. R., Kovalev Yu. J., Tokarskaya V. I., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **383**, 242—254.
169. Sevall J. S., Cockburn A., Savage M., Bonner J., (1975), *Biochemistry*, **14**, 782—789.
170. Thomas T. L., Patel G. L., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1481—1489.
171. Blüthmann H., (1978), *Mol. Cell Biochem.*, **19**, 147—153.
172. Blüthmann H., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 469—476.
173. Goodwin G. H., Johns F. W., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 215—219.
174. Shooter K. V., Goodwin G. H., Johns E. W., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **47**, 263—270.
175. Goodwin G. H., Shooter K. V., Johns E. W., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 427—433.
176. Georgiev G. P., (1969), *J. Theor. Biol.*, **25**, 473—490.
177. Gierer A., (1973), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **38**, 951—961.
178. Davidson E. H., Britten R. J., (1973), *Q. Rev. Biol.*, **48**, 565—613.
179. Vaughan S. T., Comings D. E., (1973), *Exp. Cell Res.*, **80**, 265—274.
180. Fougère C., Ruiz F., Ephrussi B., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 330—334.
181. Peterson J. A., Weiss M. C., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 571—575.
182. Gurdon J. B., (1970), *Proc. Roy Soc. London B*, **176**, 303—314.
183. Johnson J. D., John T. St., Bonner J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **378**, 424—438.
184. Magun B. E., (1976), *Exp. Cell Res.*, **103**, 219—231.
185. Magun B. E., (1974), w *Acidic Proteins of the Nucleus*, red. Cameron I. L., Jeter J. R., Jr., str. 137—158, Academic Press, London.
186. Stein G. H., (1976), *Exp. Cell Res.*, **99**, 115—125.
187. Chae C.-B., Smith M. C., Morris H. P., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1468—1474.
188. Jost E., Lennox E., Harris H., (1975), *J. Cell Sci.*, **18**, 41—65.

189. Harris H., Watkins J., (1965), *Nature*, **205**, 640—646.
190. Salas J., Green H., (1971), *Nature New Biol.*, **229**, 165—169.
191. Fox T. O., Pardee A. B., (1971), *J. Biol. Chem.*, 6159—6165.
192. Brehm S. P., Hoch S. O., Hoch J. A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 24—31.
193. Hoch S. O., McVey E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1881—1887.
194. Parsons R. G., Hoch S. O., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 1—8.
195. Alberts B. M., Frey L., (1970), *Nature*, **227**, 1313—1318.
196. Sigal N., Delius H., Kornberg T., Geffer M. L., Alberts B. M., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 3537—3541.
197. Banks G. R., Spanos A., (1975), *J. Mol. Biol.*, **93**, 63—77.
198. Hotta Y., Stern H., (1971), *Nature, New Biol.*, **234**, 83—86.
199. Phillips A. P., (1968), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 393—399.
200. Herrick G., Alberts B., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2124—2132, 2133—2141.
201. Thomas T. L., Patel G. L., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 4364—4368.
202. Duguet M., de Recondo A.-M., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1660—1666.
203. Wasserman E., Levine L., (1961), *J. Immunol.*, **87**, 290—295.
204. Stollar B. D., Ward M., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 1261—1266.
205. Chytil F., Spelsberg T. C., (1971), *Nature New Biol.*, **233**, 215—218.
206. Wakabayashi K., Hnilica L. S., (1972), *J. Cell Biol.*, **55**, 271.
207. Wakabayashi K., Hnilica L. S., (1973), *Nature, New Biol.*, **242**, 153—155.
208. Wakabayashi K., Wang S., Hord G., Hnilica L. S., (1973), *FEBS Letters*, **32**, 46—48.
209. Chiu J.-F., Craddock C., Morris H. P., Hnilica L. S., (1974), *FEBS Letters*, **42**, 94—97.
210. Chiu J.-F., Wakabayashi K., Craddock C., Morris H. P., Hnilica L. S., (1974), w *The Cell Cycle Controls*, red. Padilla G. M., Zimmerman A. M., Cameron I. C., str. 309—318, Academic Press, London.
211. Wakabayashi K., Wang S., Hnilica L. S., (1974), *Biochemistry*, **13**, 1027—1032.
212. Wakabayashi K., Wang S., Hnilica L. S., (1973), w *Fogarty Internatl. Center Symposium on Poly/ADP-ribose*, NIH, str. 261—273, Bethesda.
213. Wang S., Chiu J.-F., Kłyszczko-Stefanowicz L., Fujitani H., Hnilica L. S., Ansevin A. T., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1471—1475.
214. Chiu J.-F., Hnilica L. S., Chytil F., Orrahood J. T., Rogers L. W., (1977), *J. Nat. Cancer. Inst.*, **59**, 151—154.
215. Fujitani H., Chiu J.-F., Hnilica L. S., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **75**, 1943—1946.
216. Hnilica L. S., Chiu J.-F., Hardy K., Fujitani H., Briggs R., (1978), w *The Cell Nucleus*, red. Busch H., t. 5, str. 307—331, Academic Press, London.
217. Campbell A. M., Briggs R. C., Zimmer M. S., Krajewska W. M., Chiu J.-F., Hnilica L. S., (1978), w *Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects*, red. Ruddon, str. 369—384, Elsevier North Holland. Inc., Amsterdam.
218. Hardy K., Chiu J.-F., Beyer A. L., Hnilica L. S., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5825—5831.
219. Krajewska W. M., Briggs R. C., Campbell A. M., Chiu J.-F., Hnilica L. S., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 114a.
220. Krajewska W. M., Hardy K., Briggs R. C., Chiu J.-F., Hnilica L. S., (1978), 7th Int. Cell Cycle Conf., Knoxville.
221. Zardi L., Lin J. C., Baserga R., (1973), *Nature New Biol.*, **245**, 211—213.

222. Zardi L., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 231—238.
223. Kono N., Shima I., Ohta G., (1977), *J. Biochem.*, **81**, 1549—1555.
224. Spelsberg T. C., Mitchell W. M., Chytil F., Wilson E. M., O'Malley B. W., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **312**, 765—778.
225. Brown R. W., Clark R. W., Chiu J.-F., Stubblefield E., (1977), *Exp. Cell Res.*, **104**, 207—213.
226. Krajewska W., Lipińska A., Kiliańska Z., Kłyszajko-Stefanowicz L., (1977), *Acta Biochim. Pol.*, **24**, 127—132.
227. Lipińska A., Krajewska W., Kłyszajko-Stefanowicz L., Krawczyk Z., (1978), 12 th FEBS Meeting Abstracts, nr 2142, Drezno.
228. Yeoman L. C., Taylor C. W., Jordan J. J., Busch H., (1975), *Exp. Cell Res.*, **91**, 207—215.
229. Prestayko A. W., Crane P. M., Busch H., (1976), *Biochemistry*, **15**, 414—421.
230. Ezrailson E. G., Olson M. O. J., Guetzow K. A., Busch H., (1976), *FEBS Letters*, **62**, 69—73.
231. Ganpath N., Prestayko A. W., Busch H., (1977), *Cancer Res.*, **37**, 1290—1300.
232. Montagna R. A., Wang T. Y., (1976), *Cancer Res.*, **36**, 3138—3142.
233. Kostraba N. C., Montagna R. A., Wang T. Y., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 1548—1555.
234. Zornetzer M. Š., Stein G. S., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 3119—3123.
235. Boffa L. C., Vidali G., Allfrey V. G., (1975), *Cancer Res.* **36**, 2356—2363.
236. Boffa L. C., Allfrey V. G., (1977), *Cancer*, **40**, 2584—2591.
237. Weintraub H., Groudine M., (1976), *Science*, **193**, 848—856.
238. Yeoman L. C., (1978), w *The Cell Nucleus*, red. Buch H., t. 5 str. 263—306, Academic Press, London.
239. Nakane P. K., Pierce G. B., (1967), *J. Cell Biol.*, **33**, 307—318.
240. Stein G. S., Stein J. L., Thompson J. A., (1978), *Cancer Res.* **38**, 1181—1201.
241. Cantarow W., Stollar B. D., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 26—34 oraz 34—40.
242. Goodwin G. H., Johns E. W., (1972), *FEBS Letters*, **21**, 103—104.
243. Johns E. W., (1964), *Biochem. J.*, **92**, 55—59.
244. Crampton C. F., Stein W. H., Moore S., (1957), *J. Biol. Chem.*, **225**, 363—386.
245. Johns E. W., (1975), w *The structure and Function of Chromatin*, Ciba Foundation Symposium, t. 28, str. 95—112, Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
246. Goodwin G. H., Nicolas R. H., Johns E. W., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 280—291.
247. Sanders C., Johns E. W., (1974), *Biochem. Soc. Trans.*, **2**, 547—550.
248. Johns E. W., (1967), *Biochem. J.*, **104**, 78—82.
249. Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 233—242.
250. Bustin M., Hopinks R. B., Isenberg I., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1694—1699.
251. Almagre C. R., Rudkin G. T., Cohen L. H., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2038—2048.

252. Franco L., Montero F., Rodrigues-Molina J. J., (1977), *FEBS Letters.*, **78**, 317—320.
253. Watson D. C., Peters E. H., Dixon G. H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **74**, 53—60.
254. Vidali G., Boffa L. C., Allfrey V. G., (1977), *Cell*, **12**, 409—415.
255. Sterner R., Boffa L. C., Vidali G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3830—3836.
256. Spiker S., Mardian J. K. W., Isenberg I., (1978), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **82**, 129—135.
257. Marushige K., Dixon G. H., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 5799—5805.
258. Rabbani A., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **81**, 351—358.
259. Cary P. D., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., Javaherian K., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 583—590.
260. Baker C., Isenberg I., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1645—1649.
261. Abercrombie B. D., Kneale G. D., Crane-Robinson C., Bradbury E. M., Goodwin G. H., Walker J. M., Johns E. W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 173—177.
262. Javaherian K., Amini S., (1977), *Biochim. Biophys. Acta.*, **478**, 295—304.
263. Javaherian K., Amini S., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1385—1391.
264. Walker J. M., Shooter K. V., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 88—93.
265. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 461—469.
266. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., Wietzes P., Gaastra W., (1977), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **9**, 220—223.
267. Goodwin G. H., Rabbani A., Nicolas R. H., Johns E. W., (1977), *FEBS Letters.*, **80**, 413—416.
268. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Int. J. Peptide Protein Res.*, **11**, 301—304.
269. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 461—468.
270. Walker J. M., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *FEBS Letters*, **90**, 327—330.
271. Walker J. M., Hastings J. R. B., Johns E. W., (1978), *Nature*, **271**, 281—282.
272. Dixon G. H., Candido E. P. M., Honda B. M., Lauie A. J., MacLeod A. R., Suag M. T., (1975), Ciba Foundation Symposium, t. **28**, str. 229—250, Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
273. Huntley G., Dixon G. H., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 4916—4919.
274. Greenaway P. J., Murray K., (1971), *Nature, New Biol.*, **229**, 233—238.
275. Yu S. S., Li H. J., Goodwin G. H., Johns E. W., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 497—502.
276. Hoare T. A., Johns E. W., (1970), *Biochem. J.*, **119**, 931—932.
277. Hoare T. A., Johns E. W., (1971), *Biochim. Biophys. Acta.*, **247**, 408—411.
278. Goodwin G. H., Woodhead J. L., Johns E. W., (1977), *FEBS Letters*, **73**, 85—88.
279. Levy B. W., Wang N. C., Dixon G. H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 2810—2814.
280. Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 279—284.

281. Smith B. J., Robertson D., Birbeck M. S. C., Goodwin G. H., Johns E. W., (1978), *Exp. Cell Res.*, **115**, 420—423.
282. Javaherian K., Liu L. F., Wang J. C., (1978), *Science*, **199**, 1345—1346.
283. Sanders C., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1034—1042.
284. Schlesinger D. H., Goldstein G., Niall H. D., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2214—2218.
285. Goldknopf I. L., Busch H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 864—868.
286. Goldknopf I. L., French M. E., Musso R., Busch H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5492—5495.
287. Ballal N. R., Busch H., (1973), *Cancer Res.*, **33**, 2737—2743.
288. Orrick L. R., Olson M. O. J., Busch H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1316—1320.
289. Ballal N. R., Goldknopf I. L., Goldberg D. A., Busch H., (1974), *Life Sci.*, **14**, 1835—1845.
290. Ballal N. R., Kang Y.-J., Olson M. O. J., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5921—5925.
291. Goldknopf I. L., Taylor Ch. W., Baum R. M., Yeoman L. C., Olson M. O. J., Prestayko A. W., Busch H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7182—7187.
292. Olson M. O. J., Goldknopf I. L., Guetzow K. A., James G. T., Hawkins T. C., Mays-Rothberg C. J., Busch H., (1976), *J. Biol. Chem.* **251**, 5901—5903.
293. Busch H., Ballal N. R., Rao M. R. S., Choi Y. C., Rothblum L. C., (1978), w *The Cell Nucleus*, red. Busch H. t. 5, str. 415—468, Academic Press, London.
294. Goldknopf I. L., French M. F., Daskal Y., Busch H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 786—793.
295. James G. T., Yeoman L. C., Matsui S., Goldberg A. H., Busch H., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2384—2389.
296. Catino J. J., Yeoman L. C., Mandel M., Busch H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 983—987.
297. Hunt L. J., Dayhoff M. O., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 951—960.
298. Dayhoff M. O., (red.) (1976), *Atlas of Protein Sequence and Structure*, t. 5., National Biomedical Research Foundation, Washington.
299. Goldstein G., (1974), *Nature*, **247**, 11—14.
300. Basch R. S., Goldstein G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1474—1478.
301. Goldstein G., Hemmerling U., Boyse E. A., Schlesinger D. H., Niall H. D., (1975), *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 11—15.
302. Goldstein G., Whittingham S., (1966), *Lancet*, **ii**, 315—318.
303. Gottesfield J. M., Garrard W. T., Bagi G., Wilson R. F., Bonner J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 2193—2197.
304. Watson D. C., Levy B. W., Dixon G. H., (1978), *Nature*, **276**, 196—198.

KAROL TAYLOR *), ALINA TAYLOR **)

Wykorzystanie fragmentów DNA bakteriofaga λ w konstrukcji wektorów plazmidowych dla klonowania genów. Mapa restrykcyjna λ DNA

The Use of Bacteriophage λ Fragments in the Construction of Plasmid Vectors for Gene Cloning. Included: Restriction Map of λ DNA

Spis treści

Wstęp

- I. Elementy regulacji transkrypcji DNA bakteriofaga λ
- II. Mapa fizyczna DNA bakteriofaga λ
 - II-1. Mapa genetyczna
 - II-2. Mapa restrykcyjna
- III. Konstrukcja plazmidów zawierających fragmenty λ DNA
- IV. Uwagi końcowe

Contents

Introduction

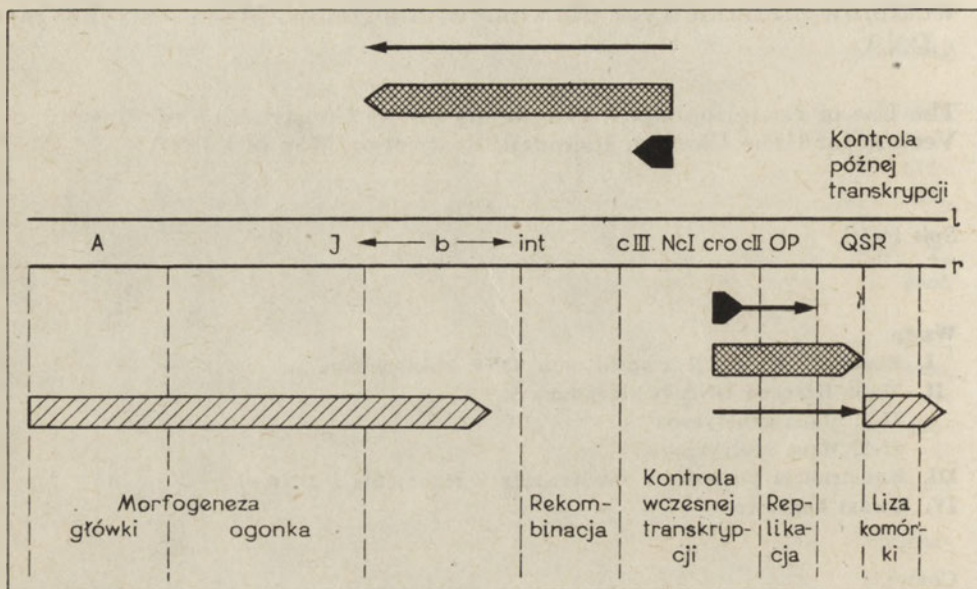
- I. Regulatory elements of λ DNA transcription
- II. Physical map of λ DNA
 - II-1. Genetic map
 - II-2. Restriction map
- III. Construction of plasmids containing λ DNA fragments
- IV. Concluding remarks

Bakteriofag λ jest ulubionym dzieckiem biologii molekularnej. W wielu dziedzinach badanie tego pozornie nieskomplikowanego „organizmu” torowało drogę nowym ideom, a różne przyczyny, między innymi dobra znajomość genetyki tego wirusa sprawiają, że jest on chętnie stosowanym narzędziem badawczym. Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji jest właśnie jedną z dziedzin biologii molekularnej, która wiele zaw-

*) Prof. dr hab., **) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk

Autorzy uczestniczą w realizacji problemu 09.7. koordynowanego przez Instytut Biochemii i Biofizyki P.A.N.

dzięcza badaniom rozwoju faga λ w komórce gospodarza — *Escherichia coli* (1). W genomie λ występują liczne elementy kontroli transkrypcji (Ryc. 1): są to geny (*cI*, *cro*) determinujące syntezę białek represorowych i sekwencje nukleotydowe zdolne do wiązania tych białek (operatory); są to sekwencje rozpoznawane przez RNA-polimerazę gospodarza, wiążące ją, i te, od których startuje transkrypcja; występują one w tandemie i tworzą jednostki funkcjonalne (promotory); są to wreszcie sekwencje decydujące o terminacji transkrypcji (terminatory) i geny (*N*, *Q*) determi-



Ryc. 1. Uproszczona mapa fizyczna genomu faga λ , skonstruowana na podstawie pomiarów heterodupleksów DNA w mikroskopie elektronowym (2).

Komplementarne pasma λ DNA oznaczone są literami l (transkrypcja na lewo) i r (transkrypcja na prawo). Rejony DNA transkrybowane podczas różnych etapów rozwoju litycznego faga λ (3) przedstawione są poziomymi strzałkami. Strzałki zakreślane przedstawiają najwcześniejszą syntezę RNA, prowadzoną przez białka gospodarza. Strzałki zakreślane przedstawiają w której białko fagowe N aktywuje transkrypcję rejonów *cIII-int-b* i *cII-O-P-Q*. Strzałki zakreślane przedstawiają późny etap syntezy RNA, w którym białko Q aktywuje transkrypcję rejonów *S-R* i *A-J*. W tym czasie białko Cro hamuje już transkrypcję wczesną. Ponieważ λ DNA występuje w formie kolistej lub konkatemerycznej przez większą część rozwoju wewnątrzkomórkowego, właściwą jednostką późnej transkrypcji może być rejon *S-R-A-J*. Rycina z pracy (4), zmodyfikowana.

nujące syntezę białek znoszących efekt działania niektórych terminatorów. Dzięki niedawno opracowanym, efektywnym metodom sekwencjonowania DNA, sekwencja nukleotydowa większości elementów kontroli transkrypcji λ DNA została ustalona i można mieć nadzieję, że w ciągu najbliższych miesięcy ten etap zostanie zakończony.

Powstająca na naszych oczach nowa gałąź biologii molekularnej, inżynieria genetyczna, wykorzystując bakteriofaga λ jako jeden z wektorów do klonowania dowolnych genów, w tym i genów eukariotycznych. Gdy ce-

lem włączenia obcego genu do genomu λ jest osiągnięcie maksimum ekspresji tego genu, ogromnym ułatwieniem przy projektowaniu rekombinacji *in vitro* jest znajomość kontroli transkrypcji λ DNA. W efekcie można doprowadzić do tego, że po zakażeniu *E. coli* tak skonstruowanym rekombinantem faga λ białko determinowane przez gen wklonowany stanowi znaczną część syntetyzowanych przez bakterie białek (5, 6, 7, 8). Inną klasę wektorów do klonowania genów stanowią plazmidy (9, 10), autonomicznie replikujące się jednostki dziedziczności pozachromosomalnej, które, w odróżnieniu od wirusów, mogą istnieć wyłącznie wewnątrz komórki. Tu znajomość regulacji transkrypcji jest wciąż jeszcze niewielka, a obserwowana ekspresja genu wklonowanego do plazmidu jest wypadkową działania słabo poznanych czynników. Pomimo tego, już w pierwszych próbach zastosowania inżynierii genetycznej do przemysłowej produkcji polipeptydów zwierzęcych potrzebnych medycynie użyto właśnie plazmidy bakteryjne (11). Być może, zakażenie bakterii fagiem λ , tak proste w laboratorium, przedstawia pewne problemy w skali przemysłowej, chociaż niewymagająca dodatkowych manipulacji hodowla drobnoustrojów syntetyzujących pożądaną substancję jest bez wątpienia w warunkach przemysłowych procesem dobrze opanowanym technologicznie.

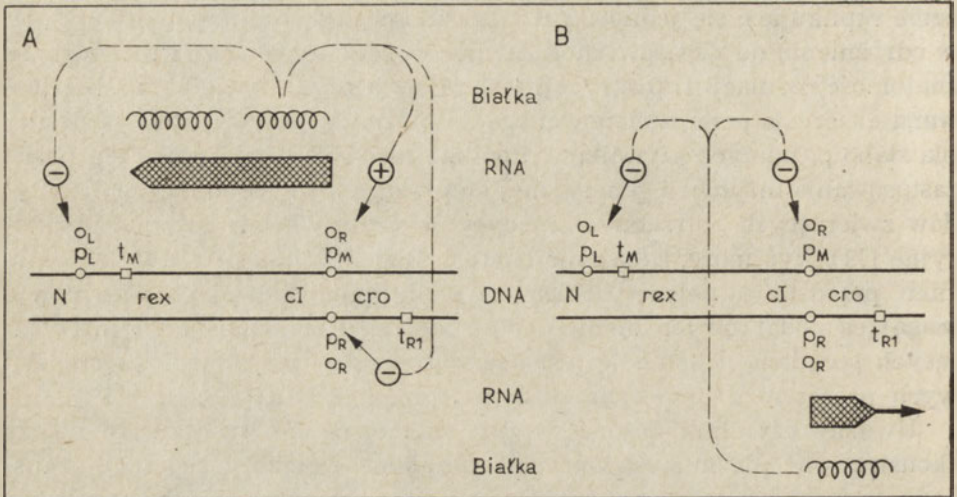
Uważny czytelnik dojdzie w tym momencie do wniosku, że należy skonstruować plazmid, zawierający pożądaną elementy regulacji transkrypcji pochodzące od bakteriofaga λ . Do tego samego wniosku doszło już kilku badaczy, a wyniki ich pracy zostaną przedstawione w niniejszym artykule. Przedtem jednak zostanie przedstawiony pokrótce aktualny stan wiedzy o elementach regulacji transkrypcji λ DNA. Najcenniejszą częścią artykułu jest, zdaniem autorów, załączona mapa fizyczno-genetyczna DNA bakteriofaga λ z zaznaczonymi miejscami cięcia przez endonukleazy restrykcyjne. Właśnie wiadomości zawarte w tej mapie umożliwiają wybór odpowiedniego fragmentu λ DNA do różnych celów, między innymi do konstrukcji plazmidu z odpowiednim układem regulacji transkrypcji.

I. Elementy regulacji transkrypcji DNA bakteriofaga λ

W cyklu życiowym bakteriofaga λ istotną rolę odgrywają dwa białka represorowe, determinowane przez geny *ci* i *cro*. Oba białka oddziałują na te same miejsca operatorowe o_L i o_R , przy dużym stężeniu hamując transkrypcję z zachodzących na te operatory promotorów p_L , p_M i p_R (12). Ciekawie przedstawia się regulacja transkrypcji przy małym stężeniu represora. Wtedy białko represorowe *ci*, utrzymując blokadę transkrypcji z promotorów p_L i p_R , aktywuje transkrypcję operonu *ci—rex*, startującą z promotora p_M (13) (Ryc. 2A). Występuje tu więc układ samoregulujący, zapewniający stałe stężenie represora *ci*. Sytuacja taka występuje, gdy λ DNA („profag”) jest zintegrowany z chromosomem gospodarza (bakterii

„lizogennej”): żadne geny fagowe (z wyjątkiem *ci* i *rex*) są nie wyrażane i profag ulega replikacji, jako część chromosomu bakteryjnego.

Białko represorowe Cro zaczyna przejawiać swą aktywność od zablokowania transkrypcji zachodzącej z promotorów p_L i p_M (Ryc. 2B). Zablokowanie transkrypcji startującej w promotorze p_R następuje dopiero przy dużym stężeniu Cro. Zatem i w tym przypadku zachodzi sprzężenie zwrot-



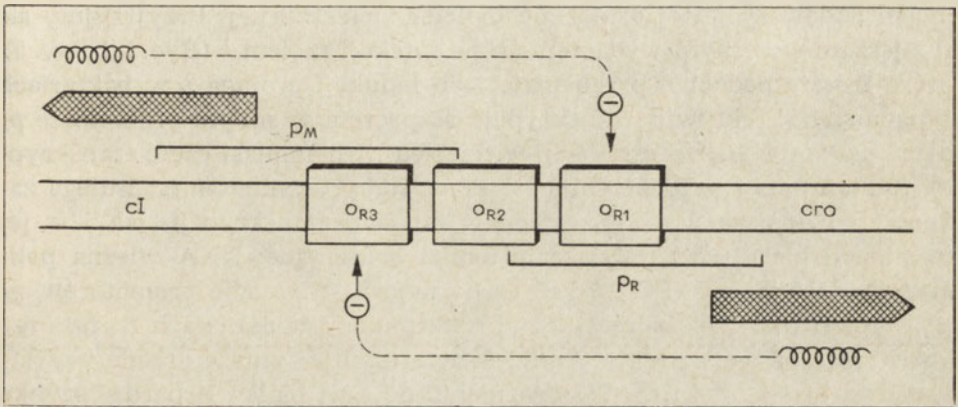
Ryc. 2. Regulacja transkrypcji λ DNA przez białka represorowe, determinowane przez geny *ci* i *cro*.

Miejsca wiążące represor, to operatory o_L i o_R . Miejsca inicjacji transkrypcji, to promotory p_M , p_L (w lewo) i p_R (w prawo). Zaznaczono również miejsca terminacji transkrypcji, terminatory t_M i t_R . Znak „-” oznacza blokowanie transkrypcji, znak „+” aktywację transkrypcji. (A) Przy umiarkowanym stężeniu represora *ci* transkrypcja z promotorów p_L i p_R jest zablokowana, a transkrypcja z p_M zaktywowana; dopiero wysokie stężenie białka *ci* blokuje transkrypcję operonu *ci-rex*. (B) Umiarkowane stężenie represora Cro blokuje transkrypcję z promotorów p_L i p_M , dopuszczając do pewnej transkrypcji z promotora p_R , wysokie dopiero stężenie *Cro* blokuje tę transkrypcję. Układ A występuje, gdy λ DNA jest zintegrowany z chromosomem bakterii lizogennej (profag), układ B — gdy λ DNA replikuje się jako plazmid.

ne: represor reguluje własną syntezę. Stałe, niewielkie stężenie represora Cro jest niezbędne do utrzymania λ DNA w stanie replikującego się autonomicznie plazmidu λ (14). Cro kontroluje znajdujący się w tym samym operonie rejon replikacyjny *ori*—*O*—*P*; w efekcie replikacja plazmidu λ zachodzi wolniej od replikacji faga λ — plazmid replikuje się zgodnie z podziałami komórkowymi. Natomiast w toku rozwoju litycznego bakteriofaga λ zadaniem białka Cro jest zahamowanie niepotrzebnej już, a nawet szkodliwej ekspresji genów „wczesnych”.

Warto zwrócić uwagę na to, że działając (przy małym stężeniu) na ten sam operator o_R , każdy z dwu represorów wywołuje odmienne efekty: represor *ci* hamuje transkrypcję genu *cro* zachodzącą z p_R , a represor Cro hamuje transkrypcję genu *ci* zachodzącą z p_M . Ten wzajemny antagonizm dwu represorów faga λ można wyjaśnić w oparciu o budowę miejsca

p_M — o_R — p_R (15) (Ryc. 3). Operator o_R składa się z trzech sekwencji polindromowych. Każda z nich liczy 17 par zasad i wiąże dimeryczne białko cI . Na sekwencje te (o_{R1} , o_{R2} , o_{R3}) zachodzą promotory p_R i p_M . Represor cI wykazuje największe powinowactwo do miejsca o_{R1} , a najmniejsze do o_{R3} . Przy małym stężeniu represora zablokowane jest więc tylko o_{R1} , co uniemożliwia dostęp RNA-polimerazy do promotora p_R i, tym samym, transkrypcję genu cro . Cro wykazuje natomiast największe powinowactwo do miejsca o_{R3} , a więc przy małym stężeniu represor Cro związany z o_{R3} nie zezwala RNA-polimerazie na transkrypcję genu cI startującą z p_M .



Ryc. 3. Rejon DNA bakteriofaga λ zawierający operator o_R , w powiększeniu.

Jego części składowe: o_{R1} , o_{R2} i o_{R3} to podobne do siebie sekwencje nukleotydowe. Na sekwencje te zachodzą sekwencje promotorów p_R i p_M . Pozostałe oznakowanie jak w Ryc. 1. i 2. Białko represorowe cI wykazuje największe powinowactwo do o_{R1} , blokując transkrypcję cro . Białko represorowe Cro wykazuje największe powinowactwo do o_{R3} , blokując transkrypcję cI . Rycina z pracy (15), zmodyfikowana.

Oprócz przedstawionych wyżej promotorów p_L i p_R transkrypcji wczesnej: najwcześniejszej (ang. *immediate-early*) i wczesnej-opóźnionej (ang. *delayed-early*) (Ryc. 1), niezle scharakteryzowany jest promotor p_R transkrypcji późnej (16,17). Ten wyjątkowo silny promotor odgrywa istotną rolę w rozwoju litycznym faga, umożliwiając ekspresję genów lizy (S , R) oraz genów determinujących syntezę główek i ogonków potomstwa fagowego (rejon A — J).

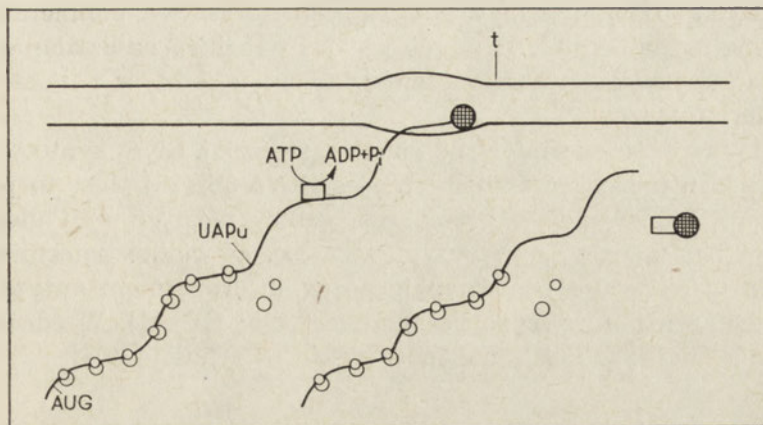
Na dość wczesnym etapie po zakażeniu bakterii bakteriofagiem λ dochodzi do wyboru dalszej drogi rozwoju; alternatywą dalszej autonomicznej replikacji i rozwoju litycznego jest integracja λ DNA z chromosomem bakteryjnym. Ważną rolę odgrywa tu aktywacja ekspresji genów cI i int : represor cI pośrednio hamuje dalszą replikację λ DNA i ekspresję genów późnych, a białko Int (18) bierze udział w integracyjnej rekombinacji λ DNA z DNA $E. coli$. Wiadomo, że na prawo od int znajduje się dodatkowy promotor p_I , który zapewnia wzmoczoną ekspresję tego genu po zakażeniu bakterii fagiem (19). Wiadomo również, że bardzo intensywna

transkrypcja genu *cI* po zakażeniu zachodzi z promotora p_E (20). Dobrze udokumentowany jest udział genów *cII* i *cIII* w aktywacji ekspresji genów *cI* i *int*. W przypadku represora *cI* mechanizm działania białek *cII/cIII* polega prawdopodobnie na aktywacji promotora p_E lecz nie można wykluczyć alternatywnego mechanizmu — antyterminacji transkrypcji startującej z p_O (21).

Pozytywna regulacja transkrypcji λ DNA w dużej mierze polega na zjawisku antyterminacji, które, choć dobrze poznane od strony genetycznej, wciąż czeka na wyjaśnienie podstaw biochemicznych. Antyterminatorowa rola genu *N* faga λ jest najlepiej poznana i stanowi najważniejszy model badawczy w tej dziedzinie biologii molekularnej. Przyjrzyjmy się raz jeszcze wczesnym wydarzeniom po infekcji fagiem λ (Ryc. 1 i Ryc. 5), które zresztą podobnie przebiegają i po indukcji profaga λ w bakteriach lizogennych. Efektywna transkrypcja rozpoczęta w silnym promotorze p_L ulega prawie w 100% terminacji w miejscu t_L , natomiast część transkrypcji zainicjowanej w p_R przebija się przez słaby terminator t_{R1} i ulega zakończeniu dopiero w t_{R2} . Zarówno w inicjacji transkrypcji, jak i w jej terminacji biorą udział wyłącznie białka bakteryjne: DNA-zależna polimeraza RNA *E. coli* (EC 2.7.7.6) rozpoznająca sekwencje promotorów p_L i p_R , oraz białko „ro” biorące udział w terminacji w miejscach t_L , t_{R1} i t_{R2} . Powstający najwcześniejszy λ mRNA determinuje syntezę przede wszystkim dwu białek: *N* i *Cro*. W odróżnieniu od *Cro*, białko *N* bardzo szybko manifestuje swoją aktywność. W wyniku jego działania RNA-polimeraza przestaje rozpoznawać sygnały terminacji w t_L , t_{R1} i t_{R2} . Dwie fale transkrypcji przesuwają się: z p_L w lewo, aż do rejonu *b*, z p_R w prawo, aż do genu *Q* włącznie. Ta zależna od białka *N* transkrypcja nosi nazwę wczesnej-opóźnionej. Gen *N* w sposób pośredni aktywuje replikację λ DNA, do której niezbędna jest (i) ekspresja genów *O* i *P*, a także (ii) transkrypcja miejsca *ori*, lub zachodząca w jego pobliżu (22, 23).

Opierając się głównie na wynikach badań genetycznych, został zaproponowany mechanizm terminacji transkrypcji zachodzącej przy współudziale białka „ro” (24), przedstawiony schematycznie na Rycinie 4. W bakteriiach *E. coli*, tak jak we wszystkich organizmach prokariotycznych, transkrypcja jest ściśle sprzężona z translacją. Bezpośrednio po inicjacji transkrypcji, do krótkiego jeszcze, świeżo zsyntetyzowanego łańcucha mRNA przyłączają się od końca 5' rybosomy, które przesuując się wzdłuż niego syntetyzują łańcuch polipeptydowy. Jeden, lub więcej kodonów nonsensownych — UAA (ochre), UAG (amber) lub UGA (opal) — występujących w mRNA tam gdzie kończy się odczyt genu, jest elementem sygnału terminacji translacji. Jest to sygnał do dysocjacji rybosomów i uwolnienia zsyntetyzowanego łańcucha polipeptydowego. Po zakończeniu transkrypcji ostatniego z genów operonu, polimeraza dalej syntetyzuje mRNA, póki nie dotrze do sekwencji terminatorowej. Tuż przed tym miejscem, jak się okazało z badań *in vitro*, polimeraza wyraźnie zwalnia

swój bieg wzdłuż DNA, co prawdopodobnie ma związek z występującymi tam palindromowymi sekwencjami. Sądzi się, że białko „ro” wiąże się z wolnym od rybosomów odcinkiem mRNA i, wykorzystując swą aktywność RNA-zależnej ATPazy, przesłizguje się wzdłuż tego odcinka i do-



Ryc. 4. Model terminacji transkrypcji zachodzącej z udziałem białka „ro”.

Linia falista przedstawia mRNA, kółka zaczernione — RNA-polimerazę, kółka puste — rybosomy, prostokąty — cząsteczki białka „ro”. AUG jest kodonem inicjacji, a UAPu — kodonem terminacji syntezy łańcucha polipeptydowego. Białko „ro” przesuwa się (kosztem energii hydrolizy ATP) wzdłuż wolnego od rybosomów mRNA i dogania RNA-polimerazę, która zwolniła biegu w miejscu terminatorowym t. W wyniku wzajemnego oddziaływania tych dwu białek dochodzi do terminacji transkrypcji i uwolnienia zsyntetyzowanego łańcucha mRNA. Rycina z pracy (26), zmodyfikowana.

gania polimerazę w miejscu terminatorowym. Istnieją dane genetyczne, silnie sugerujące wzajemne oddziaływanie RNA-polimerazy i białka „ro” związanego z mRNA (25). W wyniku tego oddziaływania dochodzi zapewne do terminacji transkrypcji i uwolnienia łańcucha mRNA.

Mutacyjna zamiana jednej zasady może doprowadzić do powstania kodonu nonsensownego. Mutacja tego typu inaktywuje funkcję zmutowanego genu: translacja ulega terminacji wewnątrz genu doprowadzając do syntezy niekompletnego polipeptydu. Niektóre z tych mutacji wykazują dodatkowo tzw. efekt polarności: zmniejszają lub likwidują ekspresję wszystkich genów operonu znajdujących się od miejsca mutacji do terminatora transkrypcji, (ang. *downstream*). Wydaje się, że i w tym wypadku dysocjacja rybosomów w nowo—utworzonym kodonie nonsensownym i ujawnienie się dłuższego odcinka mRNA wolnego od rybosomów jest sygnałem włączającym do akcji białko „ro” i wywołującym przedwczesną terminację transkrypcji. Szczególnie interesującym jest fakt, że białko N bakteriofaga λ znosi efekt polarności we wszystkich zbadanych do tej pory przypadkach.

Choć białko determinowane przez gen N faga λ zostało zidentyfikowane (27) i opracowano metody oznaczania jego aktywności, nie zostało

ono jeszcze wyizolowane. Najbardziej prawdopodobny mechanizm działania białka N, oparty na badaniach genetycznych, przedstawia się następująco: białko to działa na RNA-polimerazę, lecz nie na wolny enzym, tylko na taki, który już rozpoczął transkrypcję. Miejsce działania, lub wiązania się białka N z RNA-polimerazą zostało zlokalizowane metodami genetycznymi — znajduje się w pobliżu promotora. RNA-polimeraza zmodyfikowana działaniem białka N nie jest już wrażliwa na działanie białka „ro” i transkrypcja ulega zakończeniu dopiero w jednym z niezależnych od „ro” terminatorów.

Jedyną wyraźnie zdefiniowaną klasą cząsteczek λ RNA, syntetyzowaną *in vitro* pod nieobecność białka „ro” jest RNA 6S (28). Jest to produkt transkrypcji inicjowanej w promotorze genów późnych p'_R i ulegającej terminacji bez udziału „ro”. Przypuszcza się, że białko determinowane przez gen Q aktywuje transkrypcję późną mechanizmem antyterminacji — przedłużenia transkrypcji zachodzącej z p'_R (10, 11). W odróżnieniu od białka N, białko Q faga λ nie znosi efektu polarności (29).

II. Mapa fizyczna DNA bakteriofaga λ

II-1. Mapa genetyczna

Przed wklonowaniem pożądanego genu (elementu kontroli transkrypcji) faga λ do wektora plazmidowego, należy dysponować informacjami (i) w jakim miejscu λ DNA się on znajduje i (ii) jaką endonukleazę restrykcyjną należy zastosować, by wyciąć go możliwie „czysto”.

Najnowszy zespół informacji pierwszego rodzaju zawarty jest w pracy Echolsa i Murialdo (30). Dane przedstawione w tej publikacji w formie tabeli są podstawą naszej mapy fizycznej genomu bakteriofaga λ (Ryc. 5, część górna). Wspomniani wyżej autorzy podają przybliżone współrzędne każdego genu na mapie, a więc położenie jego lewej i prawej granicy, w odniesieniu do długości cząsteczki DNA faga λ (100%), zawierającej około 47 000 par nukleotydowych (31). Współrzędne te pochodzą z badań elektronomikroskopowych heterodupleksów, zrenaturowanych cząsteczek DNA w których jedna z nici wykazuje scharakteryzowane genetycznie delecje, oraz z badań masy cząsteczkowej białek kodowanych przez określone geny faga λ . Z założenia, że trzy nukleotydy kodują jeden aminokwas i że średnia masa reszty aminokwasowej wynosi 107 wynika, że np. białko o masie cząsteczkowej 16 760 jest kodowane przez gen, który na mapie fizycznej zajmuje 1% długości λ DNA. Echols i Murialdo zwracają uwagę na to, że pewne rejony λ DNA są „przesyccone”, tzn. kodują większą liczbę aminokwasów, niż to wynika z liczby nukleotydów.

Sugerują oni, że jest to przesycenie pozorne, wynikające z błędów oznaczania masy cząsteczkowej białek faga λ metodą elektroforezy w żelu akryloamidowym z siarczanem dodecyłu. W istocie, masy cząsteczkowe zarówno represora cI (32) jak i represora Cro, oznaczone ze znanej sekwencji aminokwasowej, były niższe (33, 34). To samo dotyczyło głównego białka ogonka, determinowanego przez gen V, którego masa cząsteczkowa została obliczona ze składu aminokwasowego (35). Anormalnej ruchliwości białek faga λ w żelu akryloamidowym z siarczanem dodecyłu poświęcona została ostatnio oddzielna praca (36). Echols i Murialdo przyjmowali, że w niektórych przypadkach masa cząsteczkowa białka jest niższa (o 3 do 10%) niż to wynika z analizy elektroforetycznej i wtedy gen białko to determinujący mieści się pomiędzy sąsiednimi genami. Przedstawiony problem staje się jednak mniej istotny, gdy przyjąć na podstawie najnowszych badań, że cząsteczka λ DNA składa się nie z 47 000, lecz z 49 000 par nukleotydowych (P. Philippsen i R. W. Davis, cyt. wg 37), a co za tym idzie, gen zajmujący 1% długości λ DNA może kodować białko o masie cząsteczkowej 17 480. Pomimo tej poprawki (o 4,3%), pozostaje wyraźne przesycenie rejonu *gam-kil*. Być może występuje tu zjawisko translacji z przesuniętej fazy odczytu, a więc kodowanie dwu białek przez jeden gen, znane z badania fagów Φ X174 (38) i G4 (39). Echols i Murialdo (30) podają współrzędne genu z dokładnością do $\pm 0,2\%$ długości λ DNA. Mniej dokładnie określone jest — według nich — położenie następujących genów:

p_1 , *redX*, *kil*, *cIII*, *ral*, t_L , t_M , *rex*, t_{R2} , p'_R , *S*, *R*

Po ukazaniu się artykułu przeglądowego wyżej wymienionych autorów ukazała się praca, dotycząca miejsc terminacji transkrypcji startującej z promotora p_L (40). Wykazano w niej, że oprócz terminatora t_L (aktualnie t_{L1}) występują dwa nowe terminatory t_{L2} i t_{L3} . Terminator t_{L1} został zlokalizowany bardziej na lewo, w miejscu o współrzędnej 71,1%, co sprawia, że granica genu *ral* w Ryc. 5 uległa skorygowaniu z prawej strony. W pracy tej zostały określone również współrzędne terminatorów t_{L2} (68,9%) i t_{L3} (64,4%). Lokalizacja t_{L2} wymagała niewielkiej (o 0,1%) korekty lewej granicy genu *cIII*. Należy jednak zwrócić uwagę, że mapa rejonu *att—N* przedstawiona przez Szybalskich (41) nie zgadza się z mapą Echolsa i Murialdo (30); Salstrom i Szybalski (40) uważają w związku z tym, że terminator t_{L3} mieści się w genie *redX* (*exo*), a terminator t_{R2} w genie *cIII*.

Zgodnie z wynikami analizy restrykcyjnej rejonu $Q—p'_R$ (17) promotor p'_R został przez nas przesunięty w lewo, na miejsce o współrzędnej 92,2% λ DNA.

R. Young, M. Syvanen i wsp. (informacja bezpośrednia) wykryli nowy gen, *Rz*, biorący udział w końcowym etapie cyklu życiowego

faga λ — lizie komórki. Gen ten mieści się w przedziale od 95,1⁰/₀ do 97,9⁰/₀ λ DNA, a więc na prawo od genu *R*, który determinuje syntezę tzw. endolizyny faga λ . Być może dwa działające na mureinę enzymy lizatu komórek *E. coli* po zakażeniu fagiem λ — endopeptydaza (42) i transglikozylaza (43) są determinowane przez geny *Rz* i *R*.

Masy cząsteczkowe białek kodowanych przez geny lizy: *S*, *R* i *Rz* nie zostały określone eksperymentalnie. Black i Hogness (44) wyizolowali „lizozym faga λ ”, jako białko o masie cząsteczkowej 17 900 (45) nie wiadomo jednak, jaka jest swoistość tego enzymu, oraz który gen go koduje. Nieznane są masy cząsteczkowe dwu innych białek „późnych” — *Nu1* i *I*, a także kilku białek „wczesnych” — *xis*, *kil*, *cIII*, *ral*. Natomiast wyniki uzyskane dla białka syntetyzowanego *in vitro* i kodowanego przez gen *O* zostały potwierdzone *in vivo* w minikomórkach: to białko replikacyjne posiada masę cząsteczkową 34 000 (46).

Brak miejsca nie pozwala na opisywanie funkcji wszystkich genów; w poprzednim rozdziale zostały omówione jedynie te, które odgrywają rolę w regulacji transkrypcji. Zainteresowanego czytelnika odsyłamy do ostatniego artykułu przeglądowego (30).

Istnieje wiele naturalnych mutantów delecyjnych, insercyjnych lub substytucyjnych faga λ . Mutanty te mogą być dogodnym materiałem wyjściowym przy klonowaniu fragmentów λ DNA do wektorów plazmidowych. Najbardziej znane są delecje w nieistotnych dla rozwoju faga regionach *b* (np. $\lambda b2$ od 45,3 do 57,3⁰/₀) (47) i *ninR*, pomiędzy *P* i *Q* (np. $\lambda nin5$ od 83,7 do 89,5⁰/₀) (48). Ostatnio coraz więcej wiadomo o lokalizacji poszczególnych sekwencji insercyjnych (IS) i transpozonów w różnych miejscach λ DNA (49, 50, Young i Syvanen, informacja bezpośrednia). Nawet bardzo długie fragmenty λ DNA mogą być zastąpione DNA bakteryjnym (np. $\lambda pbio256$ od 57,3 do 72,5⁰/₀) (41), (np. $\lambda pgal8$ od 42,4 do 57,3⁰/₀ i $\lambda plac5$ od 39,5 do 48,0⁰/₀) (50), bez uszkodzenia funkcji istotnych dla rozmnażania się faga λ . Dodatkową możliwość stwarzają hybrydy faga λ z innymi fagami lambdoidalnymi (z fagiem P22 włącznie), w których fragment λ DNA został wymieniony na spełniający podobne funkcje fragment DNA faga pokrewnego. Najbardziej znane są tu $\lambda imm434$ (od 73,5 do 79,1⁰/₀) i $\lambda imm21$ (od 71,1 do 79,8⁰/₀) (1). Oczywiście wymienione mutacje mogą usuwać istniejące w λ DNA miejsca atakowane przez endonukleazy restrykcyjne, lecz (z wyjątkiem delecji) mogą także wprowadzać nowe takie miejsca. Należy się tu również liczyć z usuwaniem elementów regulacji transkrypcji faga λ , jak i z wprowadzaniem nowych promotorów i terminatorów. W niniejszym artykule jesteśmy w stanie zaledwie wskazać na to zagadnienie, dzięki któremu bakteriofag λ jest szczególnie bogatym źródłem elementów kontroli ekspresji genów. Dla zachowania przejrzystości naszej mapy λ DNA nie wprowadzamy do Ryc. 5 informacji o współrzędnych poszczególnych delecji, insercji i substytucji.

II-2. Mapa restrykcyjna

Przejdźmy z kolei do problemu wyboru właściwego enzymu do wycięcia pożądanego fragmentu λ DNA. W ostatnich kilku latach byliśmy, i jesteśmy nadal, świadkami izolacji endonukleaz restrykcyjnych z drobnoustrojów różnych gatunków (51). Enzymy te (endonukleazy restrykcyjne typu II) przecinają cząsteczkę DNA w miejscach, o ściśle określonych sekwencjach nukleotydowych. W wyniku działania określonej endonukleazy restrykcyjnej na zespół identycznych cząsteczek DNA (np. λ DNA) powstaje więc szereg jednorodnych klas fragmentów DNA. Masy cząsteczkowe fragmentów DNA z poszczególnych klas określa się bądź mierząc wobec odpowiednich standardów ich ruchliwość elektroforetyczną, bądź też ich długość w mikroskopie elektronowym. Stosując różne podejścia eksperymentalne, można znaleźć kolejność, w jakiej „restrykcyjne” fragmenty występowały w wyjściowej, niezdegradowanej cząsteczce DNA. Otrzymana w ten sposób mapa restrykcyjna DNA mówi więc nam, w których miejscach liniowej cząsteczki zachodzi cięcie określoną endonukleazą restrykcyjną. DNA bakteriofaga λ jest najczęściej stosowanym substratem do scharakteryzowania nowowyizolowanej restryktazy, zwłaszcza wtedy, gdy swoiste dla enzymu sekwencje nukleotydowe nie występują zbyt często i, co za tym idzie, ilość powstających fragmentów DNA nie jest zbyt duża. Pomimo tego do tej pory ukazała się tylko jedna praca kompilacyjna, podająca zbiorczo, w formie mapy, efekt działania na λ DNA czterech endonukleaz restrykcyjnych: *HindIII*, *HpaI*, *BamHI* i *EcoRI* (50). Zapełnienie tej właśnie luki (Ryc. 5) jest zasadniczym celem niniejszego artykułu.

Warto zdać sobie sprawę ze stopnia dokładności, z jaką podawane są informacje dotyczące miejsc λ DNA przecinanych przez endonukleazy restrykcyjne. Uważa się, że oznaczanie długości w mikroskopie elektronowym jest obciążone najmniejszym błędem, i uzyskane w ten sposób mapy restrykcyjne *EcoRI* (52) i *HindIII* (53) stanowiły nieraz układ odniesienia przy sporządzaniu map restrykcyjnych innych enzymów. Dopiero jednak poznanie pełnej sekwencji jednoniciowego DNA faga Φ X174, który składa się z 5386 nukleotydów (38), pozwoliło na zastosowanie jego dwuniciowej formy replikacyjnej (RFII), jako bezwzględного standardu długości. Ważnym było również to, że długość jego cząsteczki była zbliżona do przeciętnej długości fragmentu restrykcyjnego λ DNA. Porównanie położenia miejsc cięcia, uzyskanych tą metodą (54, Philippson i Davis, cyt. wg 37) z wcześniej uzyskanymi wartościami dla *EcoRI* (52) i *HindIII* (53) przedstawione jest w tabeli 1.

Mniej dokładną, choć częściej stosowaną metodą oznaczania masy cząsteczkowej fragmentu λ DNA jest elektroforeza w żelu akryloamidowym lub agarozowym. Już w 1975 r. wykazano, że lepszą zgodność po-

między ruchliwością elektroforetyczną, a wielkością fragmentu DNA daje elektroforeza agarozowa (52). Stosując odpowiednie warunki elektroforezy, można było doprowadzić do liniowej zależności między ruchliwością elektroforetyczną a logarytmem masy cząsteczkowej (55). Masa określonego fragmentu λ DNA, oznaczona na podstawie tej zależności, może być jednak obciążona dość znacznym błędem, gdyż specyficzny skład zasad, a może nawet specyficzna sekwencja nukleotydowa może wpływać na ruchliwość elektroforetyczną (56, 57). Gdy DNA z delecyjnych lub substytucyjnych mutantów λ służy jako substrat, to dołącza się błąd oznaczania granic delecji lub substytucji w mikroskopie elektronowym. Biorąc dodatkowo pod uwagę błąd zawarty w oznaczeniu masy cząsteczkowej stosowanych standardów, Robinson i Landy (55) oceniali, że dokładność metody elektroforetycznej nie jest lepsza od $\pm 10\%$ masy fragmentu, a więc np. w przypadku fragmentu o długości 10% λ DNA może wynosić co najmniej $\pm 1\%$ λ DNA. Dopiero ostatnio dostępne są bezwzględne standardy mas cząsteczkowych DNA w postaci fragmentów restrykcyjnych DNA formy RFII faga Φ X 174 (38) lub plazmidu pBR322 (58).

Tabela 1

Porównanie współrzędnych (% długości λ DNA) miejsc cięcia DNA faga λ endonukleazą restrykcyjną, oznaczanych przy pomocy mikroskopu elektronowego wg 52, 53, 54

<i>EcoRI</i>	44,5	54,3	65,6	81,0	93,1		
	44,3	54,16	65,67	81,01	92,90		
<i>HindIII</i>	48,5	52,2	56,8	76,5	77,6	77,8	91,2
	48,0	52,03	56,63	76,24	77,38	77,66	91,17

Z przedstawionej wyżej analizy wynika, że mapy restrykcyjne niektórych enzymów na rycinie 5 mogą być obciążone dość znacznym błędem. Dla bardziej precyzyjnego zlokalizowania interesującego nas cięcia należałoby określić jego odległość od najbliższych miejsc cięcia *EcoRI* lub *HindIII*, badając masę/długość powstających fragmentów wobec standardów bezwzględnych.

Rycina 5 zawiera z konieczności tylko te informacje, które dotyczą endonukleaz restrykcyjnych tnących λ DNA na niewielką liczbę fragmentów. Endonukleazy wytwarzające wielką liczbę małych fragmentów zostały wykorzystane do analizy niektórych specjalnie interesujących rejonów λ DNA. Badania te z reguły stanowiły wstęp do określenia sekwencji nukleotydowej danego rejonu λ DNA, i w odnośnych publikacjach znajdują się odpowiednie szczegółowe mapy restrykcyjne.

W mapach tych zlokalizowane są, i to z większą precyzją, niektóre cięcia endonukleolityczne przedstawione na rycinie 5.

Poznano już sekwencję nukleotydomą rejonu zawierającego miejsce *att*, tak istotne dla rekombinacji pomiędzy λ DNA a DNA *E. coli* (59, 60, 83); zaawansowane są prace nad sekwencją genu *N* (N. Franklin, informacja bezpośrednia). Przedmiotem intensywnych badań była sekwencja $p_{L}o_{L}$ —*rex*—*cI*— $p_{M}o_{R}p_{R1}$ (13, 61, 62, 63, 64), a okolicom terminatora t_{R1} obejmującym część genów *cro* i *cII* została poświęcona oddzielna praca (65). W dwu ośrodkach zajęto się miejscem inicjacji replikacji λ DNA, *ori*, leżącym wewnątrz genu *O* (66, 67). Poznana została również całkowita sekwencja genów *cro* i *cII* (68), a sekwencja genu *P* czeka na opublikowanie (E. S c h w a r z, informacja bezpośrednia). A więc pełna sekwencja od genu *N* do genu *P* (około 10% λ DNA) została rozszyfrowana. Został zmapowany rejon Q — p'_{R} i oznaczono sekwencję nukleotydomą odcinka determinującego początek transkrypcji późnej (17). Ostatnio poznano jeszcze krótkie sekwencje w pobliżu obu końców liniowej cząsteczki λ DNA (69).

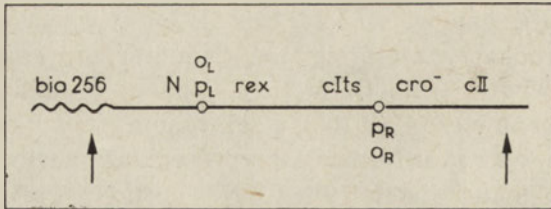
Wprowadzenie nowych, efektywnych metod sekwencjonowania DNA (70) umożliwiła szybkie postępy w tej dziedzinie. Na przykład J. G. S u t c l i f f e z pracowni W. G i l b e r t a pisze (71), że sekwencję genu oporności na ampicylinę plazmidu pBR322 (1100 par nukleotydomych) oznaczył w okresie od marca do sierpnia 1977 roku. Porównanie zaś sekwencji nukleotydomowej z sekwencją aminokwasową, ustaloną przez innych autorów nastąpiło 25 sierpnia 1977 (przy herbatce), wykazując pełną zgodność. Wydaje się więc, że poznanie pełnej sekwencji nukleotydomowej λ DNA nie jest sprawą dalekiej przyszłości. W oparciu o znajomość sekwencji swoistych dla każdej endonukleazy restrykcyjnej, będzie można wtedy sporządzić pozbawioną błędów mapę restrykcyjną λ DNA.

III. Konstrukcja plazmidów zawierających fragmenty λ DNA

W rozdziale tym pragniemy przedstawić dwa przykłady wykorzystania elementów kontroli transkrypcji λ DNA dla zwiększenia ekspresji genu wklonowanego w wektor plazmidowy. Znamienne jest to, że dotychczas one prac opublikowanych niedawno, w 1978 roku.

W pierwszej z nich (72) autorzy zamierzali wykorzystać silny promotor p_{L} faga λ , antyterminatorową aktywność białka *N*, a także możliwość włączania/wyłączania transkrypcji startującej z p_{L} przy pomocy termolabilnego represora *cIts*. Endonukleaza *EcoRI* wycina z λ DNA fragment (od 65,7 do 81,0%), zawierający rejon N — $p_{L}o_{L}$ —*cI* (Ryc. 5), lecz fragment ten zawiera również gen *kil*, którego produkt wytwarzany w nadmiarze jest zabójczy dla komórki gospodarza. W mutancie substytucyjnym λ *pbio256* rejon λ DNA (od 57,3 do 72,5%) obejmujący gen *kil*, zastąpiony jest DNA bakteryjnym; miejsce cięcia *EcoRI* określone współrzędną 65,7% oczywiście zanika, pojawia się natomiast nowe, w pobliżu 71%.

Te „strategiczne” rozważania doprowadziły do wyboru DNA faga λ *pbio256cIts^{cro}-* jako substratu endonukleazy *EcoRI* (Ryc. 6); mutacja w genie *cro* miała na celu uniknięcie hamowania transkrypcji przez białko Cro.



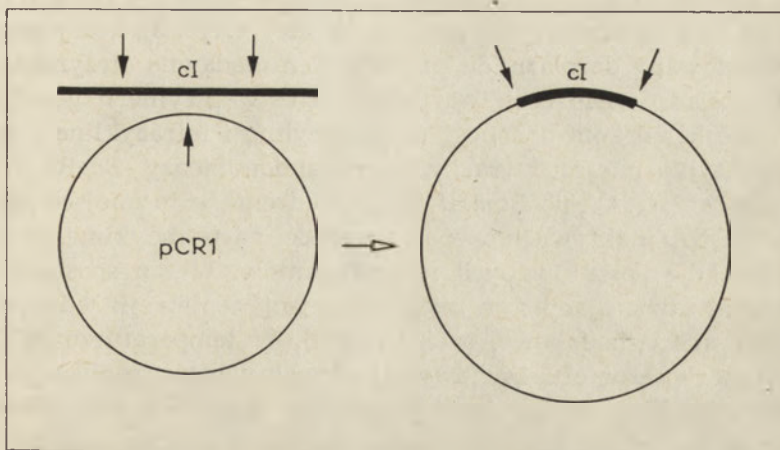
Ryc. 6. Fragment λ DNA wycinany endonukleazą *EcoRI* (strzałki) z DNA bakteriofaga λ *pbio256cIts^{cro}-*.

Objaśnienie symboli w tekście.

Jako wektor plazmidowy wybrany został pCR1, plazmid występujący w stosunkowo dużej ilości kopii w komórce *E. coli*, nadający jej oporność na antybiotyk kanamycynę i posiadający tylko jedno miejsce wrażliwe na endonukleazę *EcoRI*. Mieszanie produktów trawienia obu DNA: λ *pbio256cIts^{cro}-* i pCR1 potraktowano ligazą polinukleotydową. Komplementarne w stosunku do siebie, kohezyjne końce fragmentów DNA wytworzone działaniem *EcoRI* mogły się więc połączyć wiązaniami kowalencyjnymi. W tym wypadku koliste, zdolne do replikacji struktury mogły się wytworzyć (i) przez rekonstrukcję kolistego DNA plazmidu pCR1, bądź (ii) przez włączenie do tego plazmidu (w miejscu swoistym dla *EcoRI*) dowolnego fragmentu λ DNA. W czasie inkubacji takiej mieszaniny z odpowiednio przygotowanymi bakteriami, pewna ilość cząsteczek DNA wnika do komórek, gdzie może replikować się i manifestować swoją obecność (transformacja). Przez posiew na podłoże zawierające kanamycynę wyselekcjonowano kanamycyno-oporne transformanty zawierające plazmid pCR1 i jego pochodne. Represor *cI* nadaje bakteriom oporność na zakażenie bakteriofagiem λ , zatem przez kolejny posiew na podłoże przesycone zawiesiną tego faga wyselekcjonowano te komórki, które zawierały plazmid pCR1 z wklonowanym fragmentem λ DNA zawierającym gen *cI* (Ryc. 7).

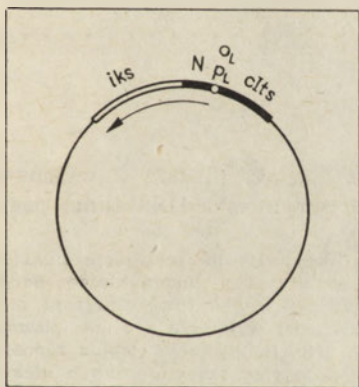
Podobny tok myślenia i manipulacji laboratoryjnych doprowadził do uzyskania szczepu bakteryjnego, zawierającego plazmid pCR1 z wklonowanym genem *iks* — nazwijmy tak, dla uproszczenia, gen, którego ekspresja miała zostać zwiększona. Oba skonstruowane *in vitro* plazmidy zostały namnożone i wyizolowane w ilościach preparatywnych. W każdym z nich na krańcach wklonowanego fragmentu DNA istniały miejsca wrażliwe na *EcoRI*, zatem podziałanie tym enzymem na mieszaninę obu plazmidów doprowadziło do wytworzenia trzech liniowych fragmentów DNA: *iks*, N — p_L O_L —*cIts*, oraz pCR1. Jednym z produktów kolejnego działania

ligazą polinukleotydomą był kolisty DNA plazmidowy, w którym fragment λ DNA sąsiadował z fragmentem zawierającym gen *iks* w orientacji przedstawionej na rycinie 8.



Ryc. 7. Klonowanie fragmentu λ DNA (linia pogrubiona) zawierającego gen *cI* do plazmidu pCR1.

Strzałki wskazują na sekwencje nukleotydowe wrażliwe na endonukleazę *EcoRI*: 5'G|AATTC3' 3'CTTAA|G5'



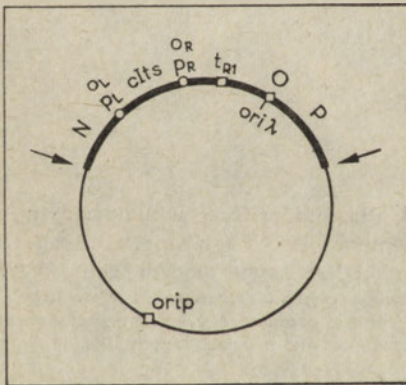
Ryc. 8. Plazmid pCR1 z wklonowanym fragmentem λ DNA (*N-p_LO_L-cIts*) i fragmentem DNA zawierającym gen *iks*. Inaktywacja cieplna represora *cI* wywołuje transkrypcję z promotora *p_L* przyczyniającą się do zwiększonej ekspresji genu *iks*.

Bakterie zawierające ten złożony plazmid syntetyzowały bardzo intensywnie białko *Iks*, zwłaszcza w podwyższonej temperaturze. Autorzy udowodnili, że wynikało to (i) z występowania genu *iks* w kilkudziesięciu kopiach na komórkę i (ii) z intensywnej transkrypcji startującej z silnego promotora *p_L* w warunkach inaktywacji cieplnej represora *cI*. Białko *N* faga λ powodowało, że RNA-polimeraza nie reagowała na sygnały terminacji znajdujące się na drodze od *p_L* do genu *iks* o długości około 3000 par nukleotydowych (6% λ DNA).

W drugiej publikacji, którą zamierzamy przedstawić dla przykładu (73), autorzy wklonowali do plazmidu pBR322 rejon replikacyjny λ DNA,

ori—*O*—*P*, a elementy transkrypcji λ DNA, *N*—*p_L**O_L*—*cIts*—*o_R**p_R* zostały wykorzystane do aktywacji replikacji z *ori* λ , a tym samym do zwiększenia ilości kopii skonstruowanego z pBR322 plazmidu.

Przy pomocy endonukleazy *Bam*HI został wycięty z λ DNA fragment (od 71,3 do 86,5%) zawierający rejon od *N* do *P* (Ryc. 5), który następnie został wklonowany do plazmidu pBR322. Ten niedawno otrzymany plazmid (74) posiada wiele cech wartościowych w inżynierii genetycznej, m.in. nadaje komórkom oporność na ampicylinę i tetracyklinę i zawiera po jednym tylko miejscu wrażliwym na endonukleazy *Eco*RI, *Hind*III, *Bam*HI, *Sal*I i *Pst*I. Cięcie *Bam*HI i wprowadzenie w to miejsce „obcego” fragmentu DNA inaktywuje operon oporności na tetracyklinę, co bardzo ułatwia selekcję poszukiwanych rekombinantów. W ten sposób powstał więc plazmid zawierający dwa miejsca inicjacji replikacji: jedno plazmidowe, *orip*, a drugie fagowe, *ori* λ (Ryc. 9). W temperaturze 32°C, gdy wytwarzany represor *cIts* zachowywał swą aktywność, replikacja z *ori* λ nie zachodziła. Plazmid mógł się replikować jedynie z *orip*. Natomiast po przeniesieniu do 42°C, inaktywacja represora *cIts* umożliwiała transkrypcję z *p_L* i *p_R*, syntezę antyterminatorowego białka *N*, które przedstawionym już w rozdziale I mechanizmem aktywowało replikację z *ori* λ . I rzeczywiście, autorzy stwierdzali znacznie większą liczbę kopii skonstruowanego przez siebie plazmidu w podwyższonej temperaturze.



Ryc. 9. Plazmid pBR322 z wklonowanym fragmentem λ DNA (linia pogrubiona).

Strzałki wskazują na sekwencje nukleotydowe wrażliwe na endonukleazę *Bam*HI. W obniżonej temperaturze inicjacja replikacji zachodzi wyłącznie z *origin* plazmidu pBR322, *orip*. Inaktywacja cieplna represora *cI* wywołuje ciąg reakcji, których efektem jest aktywacja replikacji startującej z *ori* λ .

Genem, którego ekspresję zamierzano wielokrotnie w oparciu o przedstawioną wyżej strategię, był gen *xth* *E. coli*, determinujący syntezę egzonukleazy III. Upřednio autorzy stwierdzili, że gen ten występuje w jednym z fragmentów DNA *E. coli*, otrzymanych działaniem endonukleazy *Bam*HI. Dla zwiększenia szans izolowania pożądanego rekombinanta, z poprzednio opisanego plazmidu (Ryc. 9) usunięto jedno z dwu miejsc wrażliwych na *Bam*HI; pożądaną delecję otrzymano stosując odpowiednie endonukleazy restrykcyjne. Po wklonowaniu genu *xth* do tak skonstruowanego plazmidu okazało się, że bakterie zawierające ten plaz-

mid wytwarzają w 42°C 125 razy więcej egoz nukleazy III od bakterii zawierających gen *xth* zlokalizowany w chromosomie.

IV. Uwagi końcowe

Oczywistym jest, że inne elementy kontroli transkrypcji λ DNA i inne sposoby ich sprzężenia mogą być wykorzystane w przyszłości do osiągnięcia możliwie najwyższej ekspresji wklonowanego genu. Można się spodziewać, że np. wyjątkowo silny promotor genów późnych, p'_R odegra tu istotną rolę. Z pewnością dalszy rozwój badań pójdzie drogą „czystego” wycinania krótkich fragmentów zawierających wyłącznie interesujący element transkrypcji (a więc np. promotor, bez znajdujących się w pobliżu terminatorów) i łączenia tych fragmentów ze sobą. Być może, interesującym byłby np. układ $cIts-O_R p_R-Q-p'_R$.

Ekspresja genu zależy nie tylko od regulacji transkrypcji tego genu, ale i od tych wszystkich mało poznanych procesów, którym podlega mRNA przed, w czasie i po translacji, oczywiście również i od regulacji translacji. Wydaje się, że i w tej dziedzinie biologia molekularna i inżynieria genetyczna będą mogły skorzystać ze swego ulubionego obiektu badawczego — faga λ .

Nietrwałość większości prokariotycznych mRNA może zmniejszać efektywność ekspresji odpowiednich genów. Pomędzy genami *xis* i *redX* znajduje się rejon *hin*, który odgrywa rolę w stabilizacji mRNA faga λ (D. Court, cyt. wg 50) a obserwacje z naszej pracowni sugerują, że λ mRNA syntetyzowany w zakażonych fagiem minikomórkach jest wyjątkowo trwały.

Zastanawiająca jest również nadzwyczaj efektywna i selektywna synteza niektórych białek — składników dojrzałej cząstki fagowej. Na przykład białko kodowane przez gen *D* syntetyzowane jest 870 razy efektywniej od białka genu *A* (75). Nie wiadomo, co jest przyczyną tak efektywnej syntezy białka *d*. Z innych modeli wiadomo, że dla wydajnej translacji konieczne jest występowanie w mRNA miejsca wiążącego rybosomy, postulowanego po raz pierwszy przez Shine i Dalgarno (76). W *E. coli* miejsce to obejmuje kodon inicjacji translacji AUG (lub GUG) i sekwencję komplementarną do sekwencji końca 3' rybosomalnego RNA 16s. Poznane do tej pory sekwencje Shine-Dalgarno (SD) składają się z 3—9 nukleotydów i poprzedzają kodon inicjacji translacji o 3—12 nukleotydów. W pierwszej z publikacji przedstawionych w poprzednim rozdziale (72) autorzy sugerują możliwość występowania sekwencji SD przed genem *iks*, co może tłumaczyć wyjątkowo wydajną ekspresję tego genu w plazmidzie przedstawionym na Ryc. 8. Sekwencje takie znaleziono i w λ DNA, można się zatem spodziewać, że fragmenty restrykcyjne λ DNA z sekwencjami SD znajdą zastosowanie w inżynierii genetycznej.

Coraz bliższa realizacji wydaje się idea wykorzystania szybko zwiększającej się puli krótkich fragmentów restrykcyjnych DNA o znanej sekwencji nukleotydowej do chemicznej syntezy fragmentów o zaprogramowanej sekwencji. Swoiste dla prokariota elementy kontroli transkrypcji/translacji występujące w tych fragmentach możnaby na przykład wiązać metodami chemicznymi z genem uzyskanym na drodze syntezy w jedną funkcjonalną całość. Być może, będzie można w ten sposób ominąć przeszkody stojące na drodze klonowania i właściwej ekspresji genów eukariotycznych w bakteriach.

Na zakończenie pragniemy przyznać, że nie tylko DNA bakteriofaga λ służy jako źródło elementów kontroli transkrypcji w konstrukcji wydajnych wektorów plazmidowych. Jako przykład pięknej, precyzyjnej pracy może służyć tu wklonowanie silnego promotora *lac* (operonu fermentacji laktozy) do plazmidu pMB9 (77). Genem, którego ekspresja uległa zwielokrotnieniu był gen *ci* bakteriofaga λ !

Zaakceptowano do druku 22.03.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Szybalski W., (1978), *Postępy Mikrobiologii* **17**, 153—179.
2. Fiantdt M., Hradecna Z., Lozeron H. A., Szybalski W., (1971), w *The Bacteriophage Lambda*, red. Hershey A. D., str. 329—334, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. York.
3. Taylor K., Hradecna Z., Szybalski W., (1967), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **57**, 1618—1625.
4. Grzesiuk E., Taylor K., (1977), *Virology* **83**, 329—336.
5. Moir A., Brammar W. J., (1976), *Molec. Gen. Genet.* **149**, 87—99.
6. Hopkins A. S., Murray N. E., Brammar W. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **107**, 549—569.
7. Panasenko S. M., Cameron J. R., Davis R. W., Lehman I. R., (1977), *Science* **196**, 188—189.
8. Kelley W. S., Chalmers K., Murray N. E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 5632—5636.
9. Collins J., (1977), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **78**, 122—170.
10. Timmis K. N., Cohen S. N., Cabello F. C., (1978), w *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, t. 6, red. Hahn F. E., str. 1—58, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. York.
11. Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A. D., Heyneker H. L., Bolivar F., Boyer H. W., (1977), *Science* **198**, 1056—1063.
12. Takeda Y., Folkmanis A., Echols H., (1977), *J. Biol. Chem.* **252**, 6177—6183.
13. Ptashne M., Backman K., Humayun M. Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. T., (1976), *Science* **194**, 156—161.
14. Podhajska A., (1979), *Postępy Mikrobiologii*, wysłane do druku.
15. Johnson A., Meyer B. J., Ptashne M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 1783—1787.
16. Roberts J. W., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 3300—3304.

17. Sklar J., Yot P., Weissman S. M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 1817—1821.
18. Kikuchi Y., Nash H. A., (1978), *J. Biol. Chem.* **253**, 7149—7157.
19. Oppenheim A., Oppenheim A. B., (1978) *Molec. Gen. Genet.* **165**, 39—45.
20. Jones M. O., Fischer R., Herskowitz I., Echols H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 150—154.
21. Honigman A., Hu S.-L., Chase R., Szybalski W., (1976), *Nature* **262**, 112—116.
22. Skalka A. M., (1977), *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **78**, 201—237.
23. Hobom G., Grosschedl R., Lusky M., Scherer G., Schwarz E., Kössel H., (1978), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**, w druku.
24. Adhya S., Gottesman M., (1978), *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 967—991.
25. Das A., Merrill C., Adhya S., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 4828—4837.
26. Adhya S., Gottesman M., de Crombrugge B., Court D., (1976), w RNA Polymerase, red. Losick R., Chamberlin M., str. 719—730. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. York.
27. Shaw J. E., Jones B. B., Pearson M. L., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 2225—2229.
28. Rosenberg M., Weissman S., de Crombrugge B., (1975), *J. Biol. Chem.* **250**, 4755—4764.
29. Dambly C., Court D., Brachet P., (1976), *Molec. Gen. Genet.*, **148**, 175—182.
30. Echols H., Murialdo H., (1978), *Microbiol. Revs.* **42**, 577—591.
31. Davidson N., Szybalski W., (1971), w *The Bacteriophage Lambda*, red. Hershey A. D., str. 45—82, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. York.
32. Sauer R. T., Anderegg R., (1978), *Biochemistry* **17**, 1092—1100.
33. Hsiang M. W., Cole R. D., Takeda Y., Echols H., (1977), *Nature* **270**, 275—277.
34. Roberts T. M., Shimatake H., Brady C., Rosenberg M., (1977), *Nature* **270**, 274—275.
35. Katsura I., Tsugita A., (1977), *Virology* **76**, 129—145.
36. Belfort M., (1978), *J. Virology* **28**, 270—278.
37. Philippsen P., Kramer R. A., Davis R. W., (1978), *J. Mol. Biol.* **123**, 371—386.
38. Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., Coulson A. R., Fiddes J. C., Hutchinson III C. A., Slocombe P. M., Smith M., (1977), *Nature* **265**, 687—695.
39. Shaw D. C., Walker J. E., Northrop F. D., Barrell B. G., Godson G. N., Fiddes J. C., (1978), *Nature* **272**, 510—515.
40. Salstrom J. S., Szybalski W., (1978), *Virology* **88**, 252—262.
41. Szybalski E., Szybalski W., (1974), *Biochimie* **56**, 1497—1503.
42. Taylor A., (1971), *Nature* **234**, 144—145.
43. Taylor A., Das B. C., van Heijenoort J., (1975), *Eur. J. Biochem.* **53**, 47—54.
44. Black L. W., Hogness D. S., (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 1968—1975.
45. Tsugita A., (1971), w *The Enzymes*, t. 5, wyd. 3, red. Boyer P. D. str. 343—411, Academic Press, New York, London.
46. Lipińska B., Podhajka A., Taylor K., wysłana do druku.
47. Fiandt M., Honigman A., Rosenvold E. C., Szybalski W., (1977), *Gene* **2**, 289—293.

48. Szybalski E. H., Honigman A., Rosenfold E. C., Fian dt M., Szybalski W., (1977), *Gene* **2**, 295—297.
49. Szybalski W., (1977), w DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, red. Bukhari A. J., Shapiro J. A., Adhya S. L., str. 583—590, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
50. Gottesman S., Adhya S., (1977), w DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes, red. Bukhari A. J., Shapiro J. A., Adhya S. L., str. 713—718, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
51. Roberts R. J., (1976), *Crit. Rev. Biochem.* **4**, 123—164.
52. Thomas M., Davis R. W., (1975), *J. Mol. Biol.* **91**, 315—328.
53. Wellauer P. K., Reeder R. H., Carroll D., Brown D. D., Deutch T., Higashinakagawa T., David I., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 2823—2827.
54. Hobom G., Philippsen P., (1979), *Gene*, (w druku).
55. Robinson L. H., Landy A., (1977), *Gene* **2**, 1—31.
56. Zeiger R. S., Salomon R., Dingman W., Peacock A. C., (1972), *Nature New Biology* **238**, 65—68.
57. Zeiger R. S., Salomon R., Dingman C. W., Peacock A. C., (1974), *Biochemistry* **16**, 3388—3393.
58. Sutcliffe J. G., (1978), *Nucl. Acid Res.* **5**, 2721—2728.
59. Landy A., Ross W., (1977), *Science* **197**, 1147—1160.
60. Davies R. W., Schreier P. H., Büchel D. E., (1977), *Nature* **270**, 757—760.
61. Walz A., Pirrotta V., Ineichen K., (1976), *Nature* **262**, 665—669.
62. Humayun Z., Jeffrey A., Ptashne M., (1977), *J. Mol. Biol.* **112**, 265—277.
63. Humayun Z., (1977), *Nucl. Acid Res.* **4**, 2137—2143.
64. Sauer R. T., (1978), *Nature* **276**, 301—302.
65. Rosenberg M., Court D., Shimatake H., Brady C., Wulff D. L., (1978), *Nature* **272**, 414—423.
66. Denniston-Thompson K., Moore D. D., Kruger K. E., Furth M. E., Blattner F. R., (1977), *Science* **198**, 1051—1056.
67. Scherer G., (1978), *Nucl. Acid Res.* **5**, 3141—3156.
68. Schwarz E., Scherer G., Hobom G., Kössel H., (1978), *Nature* **272**, 410—413.
69. Nichols B. P., Donelson J. E., (1978), *J. Virol.* **26**, 429—434.
70. Maxam A., Gilbert W., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 560—564.
71. Sutcliffe J. G., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 3737—3741.
72. Hedgpeth J., Ballivet M., Eisen H., (1978), *Molec. Gen. Genet.* **163**, 197—203.
73. Rao R. N., Rogers S. G., (1978), *Gene* **3**, 247—263.
74. Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene P. J., Betlach M. C., Heynecker H. L., Boyer H. W., (1977), *Gene* **2**, 95—113.
75. Ray P. N., Pearson M. L., (1974), *J. Mol. Biol.* **85**, 163—175.
76. Shine J., Dalgarno L., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 1342—1346.
77. Backman K., Ptashne M., (1978), *Cell* **13**, 65—71.
78. Murray K., Murray N. E., (1975), *J. Mol. Biol.* **98**, 551—564.
79. Robinson L. H., Landy A., (1977), *Gene* **2**, 33—54.
80. Perricaudet M., Tiollais P., (1975), *FEBS Letters* **56**, 7—11.
81. Haggerty D. M., Schleif R. F., (1976), *J. Virol.* **18**, 659—663.
82. Botchan P., (1976), *J. Mol. Biol.* **105**, 161—176.

83. Kamp D., Kahmann R., Zipser D., Roberts R. J. (1977), *Mol. Gen. Genet.* **154**, 231—248.
84. Smith D. J., Blattner F. R., Davies J., (1976), *Nucl. Acid Res.* **3**, 343—353.
85. Chater K., (1977), *Nucl. Acid Res.* **4**, 1989—1998.
86. Rosenfold E., Honigman A., (1977), *Gene* **2**, 273—288.
87. Hughes S. G., (1977), *Biochem. J.* **163**, 503—509.
88. McParland R. H., Brown L. R., Pearson G. D., (1976), *J. Virol.* **19**, 1006—1011.
89. James P. M., Sens D., Natter W., Moore S. K., James E., (1976), *J. Bacteriol.* **126**, 487—500.
90. Pirrotta V., (1976), *Nucl. Acid Res.* **3**, 1747—1760.

ANONS REDAKCJI

Oprócz artykułów monograficznych omawiających wąskie tematy oraz artykułów przeglądowych referujących szersze zagadnienia *Postępy Biochemii* publikują krótkie noty informujące o nowych ważnych osiągnięciach biochemii.

Redakcja prosi Autorów o nadsyłanie takich zwięźle i syntetycznie napisanych not o objętości 2 do 4 stron maszynopisu, przypominając równocześnie o konieczności ograniczania objętości artykułów monograficznych i przeglądowych do 25 stron tekstu i uzyskania pisemnej zgody wydawnictw i autorów na przedruk dokumentacji z prac źródłowych.

IWONA SKRZYPEK-OSIECKA *

Receptory hormonów peptydowych

Receptors of Peptide Hormones

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Występowanie receptorów w komórce
- III. Właściwości chemiczne receptorów
- IV. Oddziaływania hormon-receptor
- IV-1. Charakterystyka wiązania hormonu przez receptor
- IV-2. Wpływ hormonów peptydowych na rozmieszczenie i aktywność receptorów
- IV-3. Degradacja hormonu związanego z receptorem
- IV-4. Współdziałanie receptorów a wiązania hormonów peptydowych
- V. Praktyczne aspekty badań nad receptorami hormonów peptydowych
- VI. Wiązanie hormonu przez receptor a skutek biologiczny
- VI-1. Błonowy mechanizm wiązania hormonów peptydowych
- VI-2. Wewnątrzkomórkowy mechanizm wiązania hormonów peptydowych

Contents:

- I. Introduction
- II. Intracellular location of hormone receptors
- III. Chemical properties of hormone receptors
- IV. Hormone-receptor interactions
- IV-1. Characteristics of hormone binding to the receptor
- IV-2. Effects of peptide hormone on distribution and activity of receptors
- IV-3. Degradation of hormone bound to its receptor
- IV-4. Interactions of receptors and peptide hormone binding
- V. Practical aspects of investigation of the peptide hormone receptors

* Mgr, Zakład Biochemii, Instytutu Biofarmacji Akademii Medycznej, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — cykliczny adenozyńmonofosforan; cGMP — cykliczny guanozyńmonofosforan; GDP — guanozyńdwofosforan; GTP — guanozyńtrójfosforan.

VI. Hormone binding and biological effect

VI-1. Membrane mechanism of peptide hormone binding

VI-2. Intracellular mechanism of peptide hormone binding

I. Wstęp

Terminem receptory komórkowe hormonów określa się składniki komórki zdolne do wybiórczego rozpoznawania i wiązania hormonów. Połączenie z receptorem komórkowym stanowi pierwszy etap w działaniu hormonów. Dla wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania hormonów peptydowych dokładne poznanie oddziaływań hormon-receptor ma zatem zasadnicze znaczenie. Obserwowany w ostatnich latach szybki rozwój biochemii hormonów wiąże się z opracowaniem nowych metod badawczych, między innymi otrzymywania i charakteryzowania składników komórko-

Tabela 1

Występowanie receptorów hormonów peptydowych

Hormon	Tkanka	Piśmiennictwo
Angiotensyna	nerka, nadnercza	11, 12, 13
Bradykinina	aorta, macica, jelito	14
Choriogonadotropina	jądro, jajnik	15—19
Epidermalny czynnik wzrostu	fibroblasty	20
Folitropina	jądro	21—24
Gastryna =	mięśnie gładkie żołądka	25, 26
Glukagon	wątroba, trzustka	27, 28, 29
Insulina	wątroba, komórki tłuszczowe, limfocyty, łożysko, fibroblasty, mięśnie	30—42
Kalcytonina	nerka, kość	43
Kortykotropina	nadnercza	44, 45
Luliberyna	przysadka	46
Lutropina	jądro, jajnik	15—19, 47
Czynnik wzrostu nerwu	zwoje układu sympatycznego	48
Ocytocyna (oksytocyna)	pęcherz, macica, sutki	49—55
Parathormon	nerka	56—60
Prolaktyna	gruczoł mlekowy	61—64
Somatostatyna	mózg, przysadka, serce, mięśnie, żołądek, płuca, macica, nerka, śledziona, ślinianka	66a
Somatomedyna	łożysko, monocyty	65, 66
Somatotropina	limfocyty, wątroba	67, 68
Tyreoliberyna	przysadka	69—72
Tyreotropina	tarczycyca	73—78
Wazoaktywny peptyd jelita	wątroba, komórki tłuszczowe	79
Wazopresyna	nerka	80,81

wych (1) oraz preparatów hormonów o wysokim stopniu oczyszczenia jak również ich znakowanych radioizotopami pochodnych (2, 3).

W r. 1955 Hechter sformułował zasadę, zgodnie z którą związanie hormonu przez receptor wyzwała szereg reakcji składających się na biologiczny efekt działania hormonu (4). W cztery lata później Berson i Yalow opracowali metodę radioimmunologiczną, pozwalającą na oznaczanie małych ilości hormonów (5), co znacznie przyspieszyło rozwój badań nad mechanizmem ich działania.

W następnych latach ukazały się prace Pastana (6), i Cuatrecasasa (7), które na długi okres czasu ugruntowały przekonanie, że hormony peptydowe nie wnikają do wnętrza komórek, zaś działanie ich ogranicza się do kontaktu z powierzchnią błony komórkowej, gdzie zlokalizowane są swoiste białka receptorowe. Odkrycie przez Sutherlanda cyklicznego AMP i wykazanie jego roli w działaniu wielu hormonów stanowiło potwierdzenie teorii receptorowej (8). Działanie receptorów błonowych można było wyjaśnić opierając się na mozaikowym modelu budowy błony komórkowej przedstawionym przez Singera i Nicolsona (9).

Jeszcze do niedawna uważano, że hormony peptydowe nie wnikają do wnętrza komórki. Nowsze doniesienia (10) o występowaniu receptorów wewnątrzkomórkowych i przechodzeniu hormonów peptydowych przez błonę komórkową spowodowały rewizję utartych poglądów. Tym niemniej obecny stan wiedzy o strukturze i funkcji receptorów zawdzięczamy głównie badaniom receptorów umieszczonych na zewnątrz komórek. Wykaz tkanek, w których wykryto receptory hormonów peptydowych zamieszczono w tabeli 1.

II. Występowanie receptorów w komórce

Jak już wspomniano na wstępie, do niedawna powszechnie sądzono, że receptory hormonów peptydowych w tkankach docelowych występują wyłącznie na powierzchni komórek.

Wykazanie (7), że insulina połączona kowalencyjnie z agarozą, a więc niezdolna do przenikania przez błonę komórkową ze względu na znaczne rozmiary cząsteczki, wywołuje zwiększenie utleniania glukozy oraz hamowanie stymulowanej hormonalnie lipolizy w izolowanych komórkach tłuszczowych szczura, uważano za najważniejszy argument na rzecz występowania receptorów w błonie komórkowej. Brak obecności receptorów insuliny na powierzchni „odwróconych” pęcherzyków z błon adipocytów wskazywał także na występowanie receptorów na zewnętrznej powierzchni ich błony (82).

W preparatach błon komórek wątrobowych i tłuszczowych przygotowywanych metodą *freeze etching* (kriorytowania) miejsca wiążące insu-

linę odpowiadały receptorom tkwiącym w podwójnej warstwie lipidowej błony. Zlokalizowano je za pomocą insuliny znakowanej ferrytyną (83, 84). Okazało się, że receptory insuliny w błonach hepatocytów rozmieszczone są nierównomiernie, tworząc w niektórych miejscach skupiska, gdzie wiąże się od 3 do 12 cząsteczek hormonu. Średnia gęstość rozmieszczenia wynosiła około 90 receptorów na μm^2 powierzchni błony komórkowej. Możliwość zastosowania znakowanych przeciwciał antyreceptorowych do wykazania obecności receptorów insuliny w błonie komórkowej również przemawiała za występowaniem receptorów na powierzchni komórek (85). Podobnie interpretować należy fakt, że wzrostowi aktywności 5'-nukleotyduazy, enzymu będącego znacznikiem błon komórkowych towarzyszy wzrost ilości receptorów w otrzymanywanych preparatach z błon hepatocytów (86).

Ostatnio pojawiło się jednak wiele doniesień o receptorach insuliny występujących także wewnątrz komórek, między innymi w jądrach (87), w błonach retikulum endoplazmatycznego szorstkiego i gładkiego (88, 89), w aparacie Golgi'ego (90, 91), w mitochondriach (92). Goldfine i wsp. (10) inkubowali hodowane *in vitro* limfocyty ludzkie IM-9 z [^{125}J]insuliną wieprzową. Wyliczono, że ponad połowa odnalezionej radioaktywności występowała w błonach komórkowych pozostała zaś w jednakowym stosunku w cytosolu i jądrach komórkowych. Stwierdzono również, że w jądrach hepatocytów insulina wiązała się głównie z błoną jądrową (93). Co więcej stwierdzono także, że insulina połączona z agarozą powoduje odpowiedź komórkową stukrotnie słabszą niż natywny hormon (94, 95). Wykazano ponadto, że podczas kontaktu tego kompleksu z błoną komórkową ma miejsce przechodzenie insuliny do wnętrza komórki (96), wbrew dotychczasowym poglądom.

Przypuszcza się obecnie, że receptory wszystkich hormonów peptydowych mogą występować wewnątrz komórek; uważa się też, że wszystkie hormony mogą przenikać przez błonę komórkową. Stwierdzono na przykład, że cząsteczki parathormonu mogą wnikać do wnętrza komórek kanalikula nerkowego i gromadzić się w mitochondriach (97). Wewnątrz ludzkich fibroblastów wykazano również obecność epidermalnego czynnika wzrostowego (98), a w komórkach gruczołu mlekowego — obecność prolaktyny (99). Gonadotropina wiązana jest przez jądra, mitochondria, mikrosony i cytosol komórek ciała żółtego (100), a ponieważ preparaty tych frakcji nie wykazywały zanieczyszczeń błonami komórkowymi (brak aktywności 5'-nukleotyduazy), wnioskowano o występowaniu receptorów gonadotropiny we wszystkich wymienionych strukturach komórkowych. Opisano również odmienne parametry wiązania z hormonem i różne własności immunologiczne receptorów występujących na powierzchni i wewnątrz komórek spowodowało przewrót w podejściu do problemu czynności biologicznej hormonów peptydowych.

III. Właściwości chemiczne receptorów

Receptory hormonów peptydowych są wrażliwe na działanie enzymów proteolitycznych, ponieważ zawierają składnik białkowy. Białka receptorowe stanowią zaledwie od 0,0001 do 0,001% wszystkich białek komórkowych, stąd ich wyodrębnienie i poznanie własności fizyko-chemicznych jest niełatwe. Informacje o właściwościach i budowie cząsteczek receptorowych uzyskiwano często drogą pośrednią, badając wpływ różnych czynników na przebieg wiązania hormonu z receptorem. Na przykład w przypadku receptorów glukagonu (101, 102), kortykotropiny (103), gonadotropiny (104, 105) oraz tyreoliberyny (70) zaobserwowano obniżone wiązanie hormonu przez receptor po działaniu nań fosfolipazy. Wskazuje to na obecność składnika lipidowego w cząsteczce receptora lub na wpływ lipidów błony komórkowej na wiązanie receptora z hormonem. Przeprowadzony do roztworu receptor gonadotropiny poddany działaniu chlorowodoru guanidyny rozdziela się na kolumnach z Sepharose 4B na dwa składniki: białkowy i lipidowy. Odłączenie fragmentu lipidowego wiąże się z utratą zdolności receptora do łączenia się z hormonem. Dodanie do białka receptorowego lipidów wyekstrahowanych z błon komórkowych (zwłaszcza fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanalaminy) przywraca zdolność wiązania hormonu. Wydaje się, że kwaśne fosfolipidy błony komórkowej odgrywają pewną rolę w rozpoznawaniu hormonu przez receptor, natomiast lipidy obojętne przyczyniają się do utrwalenia określonej konformacji cząsteczki receptora gonadotropiny (106). Enzymy rozkładające cukrowcowe składniki błon — neuraminidaza oraz β -galaktozydaza powodują uszkodzenie receptora insuliny uniemożliwiające związanie hormonu (107). Receptory te można oczyścić stosując metodę chromatografii powinowactwa na ConA-Sepharose. Przytoczone fakty świadczą o glikoproteidowej strukturze receptorów insuliny. Cukrowce wchodzą również w skład receptorów gonadotropiny (108) i tyreotropiny (109). Receptor tyreotropiny traci aktywność po trawieniu neuraminidazą i wybarwia się w żelu poliakryloamidowym barwnikami swoistymi zarówno dla białek jak i cukrowców.

Hamujący wpływ tetranitrometanu oraz dwuazowych pochodnych tetrazolu na wiązanie insuliny pozwala przypuszczać, że uczestniczą w nim reszty tyrozyny i tryptofanu białka receptorowego (110). Podobnie obserwowany wpływ para-chlorortęciobenzoenu i N-etylomidu kwasu maleinowego na wiązanie hormonu przez receptor wskazuje na znaczenie grup sulfhydrylowych w tym procesie, co opisano w przypadku receptorów kortykotropiny (103), oksytocyny (51) i gonadotropiny (17).

Znany jest ciężar cząsteczkowy tylko kilku receptorów. Wynosi on od 100 tys. do 200 tys. (porównaj tabela 2). Stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyłu lub ograniczoną proteolizę uzyskiwano dane wskazujące na niższy ciężar cząsteczkowy

receptorów. Uważa się to za następstwo dysocjacji receptorów na podjednostki, zwłaszcza, że w warunkach sprzyjających dysocjacji obserwowano zmianę promienia Stokesa badanych cząsteczek.

Jak wynika z przedstawionego skrótoowo przeglądu właściwości chemicznych receptorów, do najlepiej scharakteryzowanych należą receptory insuliny, gonadotropiny, glukagonu, prolaktyny i tyreotropiny.

Tabela 2

Właściwości chemiczne receptorów hormonów peptydowych

Hormon	Charakter chemiczny	Masa cząsteczkowa	Piśmiennictwo
Kortykotropina	lipoproteid	6 000 000 ^a	44, 45
Glukagon	lipoproteid	190 000 (90 000) ^c (20 000) ^c	111, 27 112
Gonadotropina	glikolipoproteid	194 000 (90 000) ^b	18
Insulina	glikoproteid	300 000 (135 000) ^b (75 000) ^c	113, 114
Prolaktyna	białko	220 000	115
Tyreotropina	glikoproteid	166 000 (75 000) ^d (24 000) ^d	109

a — wartości uzyskane dla receptorów wykazujących znaczne zanieczyszczenia błonami komórkowymi; b — wartość uzyskane po elektroforezie w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem siarczanu dodecyli; c — wartości uzyskane po roizdziale na kolumnach z agarozą; d — wartości uzyskane po przeprowadzeniu ograniczonej proteolizy.

IV. Oddziaływania hormon-receptor

W badaniach oddziaływań hormon-receptor bardzo użytecznym narzędziem są znakowane hormony. Najczęściej stosowanym znacznikiem jest radioizotop ¹²⁵J ze względu na najdogodniejszy okres półtrwania i możliwość uzyskiwania preparatów o wysokiej aktywności właściwej (86, 116). Próbowano również znakować peptydy węglem ¹⁴C (117) i trytem (118). Oprócz radioizotopów do znakowania hormonów peptydowych używa się ferrytyny i barwników fluorescencyjnych (83, 119). Ostatnio opracowano metody znakowania wielu hormonów peptydowych przy pomocy związków fotolabilnych. Poddanie fotolizie kompleksów takich pochodnych z receptorem powoduje nieodwracalne znakowanie miejsc wiążących podstawnikami, które można zidentyfikować na podstawie pomiarów radioaktywności lub fluorescencji (120, 121).

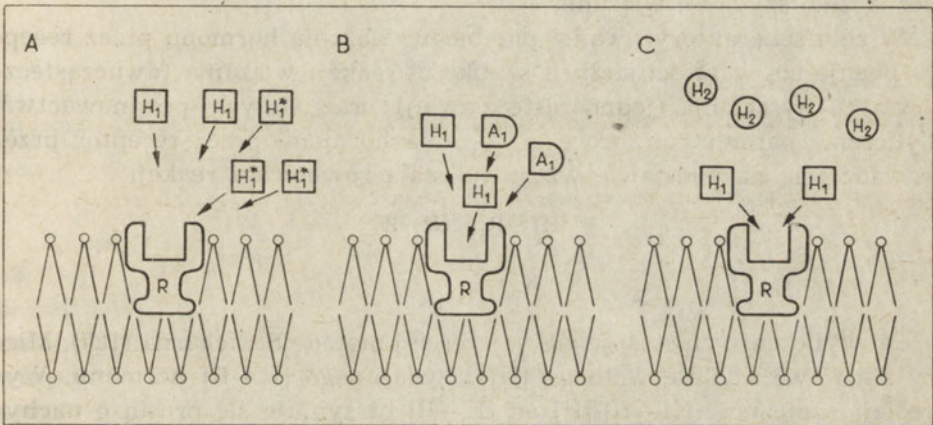
Oddziaływania hormon-receptor nie ograniczają się do rozpoznawania hormonu przez receptor i jego związania; w następstwie tego procesu mogą zachodzić dalsze, istotne dla biologicznej funkcji hormonu zjawiska, jak przechodzenie składników kompleksu hormon-receptor do wnętrza komórki lub ich degradacja. Zaobserwowano także zjawisko kooperacji

między cząsteczkami receptorów zlokalizowanymi w błonie komórkowej.

Badania oddziaływań hormon-receptor są w tej chwili dziedziną budzącą wielkie zainteresowanie i — mimo znacznych jeszcze luk — pozwalają na precyzyjniejsze niż dotychczas określenie mechanizmu działania hormonów.

IV.1. Charakterystyka wiązania hormonu przez receptor

Oddziaływanie hormonu z receptorem cechuje: swoistość strukturalna i przestrzenna, wysokie powinowactwo i odwracalność wiązania. Swoistość oddziaływania hormonu z receptorem wykazano na podstawie przebiegu wiązania znakowanych hormonów i analogów przez preparaty receptorów (122, 123). Proces ten przedstawiono schematycznie na rycinie 1.



Ryc. 1. Sposoby badania swoistości wiązania hormonu przez receptor.

A — hormon znakowany radioizotopem H_1^* współzawodniczy z natywnym hormonem H_1 o miejsce wiążące receptora R.

B — analog hormonu A_1 współzawodniczy z hormonem H_1 o miejsce wiążące receptora R.

C — hormon H_2 o odmiennej budowie nie współzawodniczy z hormonem H_1 o miejsce wiążące receptora R.

Istotnym czynnikiem w powstawaniu połączeń między białkowym fragmentem cząsteczki receptora i peptydową cząsteczką hormonu jest ich wzajemny układ przestrzenny. Metodą analizy rentgenowskiej i dichroizmu kołowego Pullen i Lindsay (124) wykazali, że połączenie cząsteczki insuliny z receptorem następuje tylko wówczas gdy przybiera ona pewną określoną konformację.

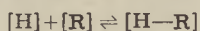
Obszar cząsteczki insuliny odpowiedzialny za wiązanie z receptorem zawiera dużą liczbę reszt hydrofobowych i jest identyczny w hormonach otrzymanywanych z tkanek różnych zwierząt. Połączenie hormonu luteini-

zującego z receptorem wymaga również dopasowania przestrzennego, do uzyskania którego niezbędne są obydwie podjednostki hormonu (125).

W badaniach wiązania hormonu przez receptor należy uwzględnić zjawisko nieswoistej adsorpcji hormonu na błonach (126). Wiązanie hormonu przez receptor jest procesem odwracalnym. Znakowany hormon oddysocjowuje z kompleksu hormon-receptor po rozcieńczeniu mieszaniny reakcyjnej lub po dodaniu nadmiaru nieznakowanego hormonu. Proces ten można przyspieszyć przez podwyższenie temperatury. Wysokie powinowactwo receptora do hormonu zapewnia jego działanie biologiczne przy niskich stężeniach hormonu (10^{-10} M i mniejszych).

Szybkość wiązania hormonu przez receptor zależy od stężenia hormonu, stężenia receptora, temperatury, pH i czasu trwania inkubacji. Optymalna temperatura wynosi na ogół 25°C — 37°C , a optimum pH leży w granicach 7,0—7,4. Jedynie wiązanie tyreotropiny przez błony komórek tarczycy przebiega przy pH 5,5. Jakkolwiek optymalna temperatura wiązania jest wyższa niż 20°C , obniżenie temperatury nawet do 4°C obniża tylko nieznacznie szybkość wiązania.

W celu scharakteryzowania przebiegu wiązania hormonu przez receptor podaje się wartości stałych szybkości reakcji wiązania (dwucząsteczkowej) i dysocjacji (jednocząsteczkowej) oraz stałych powinowactwa. Wyliczenie parametrów procesu wiązania hormonu przez receptor przeprowadza się na podstawie wzoru na stałą równowagi reakcji:



$$K = \frac{[\text{H}-\text{R}]}{[\text{H}][\text{R}]}$$

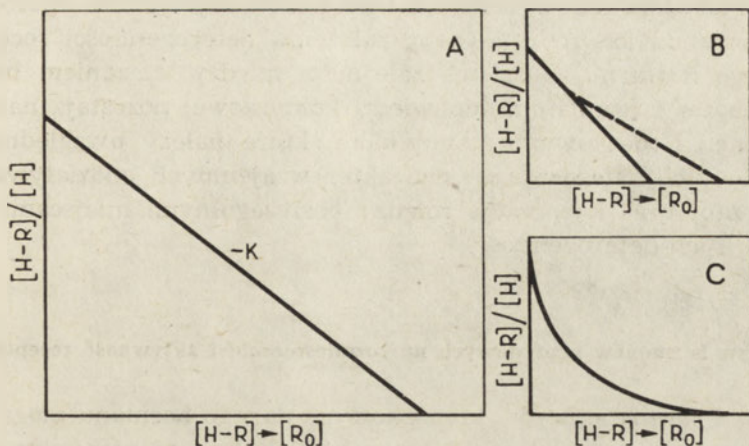
Do wyliczeń tych stosuje się najczęściej metodę Scatcharda (127). Mierzy się wówczas ilość wolnego [H] i związanego [H—R] hormonu. Wykreślając zależność $[\text{H}-\text{R}]/[\text{H}]$ od [H—R] otrzymuje się prostą o nachyleniu $-K$ (Rycina 2A). Punkt przecięcia się krzywej z osią odciętych wyznacza stężenie wysycające, a zatem jest miarą całkowitej ilości miejsc wiążących — $[\text{R}_0]$.

Prostoliniowy wykres Scatcharda obserwuje się w przypadkach gdy: jedna cząsteczka hormonu łączy się z jedną cząsteczką receptora, wszystkie receptory są homogenne i nie występują żadne wzajemne oddziaływania między receptorami.

Z przebiegu wykresu Scatcharda można wnioskować o heterogenności miejsc wiążących. W takich przypadkach krzywa ma charakter wieloskładnikowy (27) (rycina 2B). Odstępstwa od liniowego przebiegu krzywej (rycina 2C) pojawiają się również na skutek zmian powinowactwa do hormonu sąsiadującego ze sobą miejsc wiążących w wyniku zachodzącej między nimi kooperacji (128).

Poszczególne badacze podają różne wartości niektórych parametrów wiązania hormonu przez receptor. Na przykład Cuatrecasas (37)

wyliczył stałą powinowactwa receptora insuliny jako równą $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, inni zaś badacze wartości $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (133), i $1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (86). Źródłem tych rozbieżności może być odmienna interpretacja nieliniowego wykresu Scatcharda.



Ryc. 2. Wykres Scatcharda.

[H] — stężenie hormonu, [R] — stężenie receptora, [H-R] — stężenie kompleksu hormon-receptor, [K] — stała równowagi lub powinowactwa. [A] — liniowy, B i C — najczęściej spotykane rodzaje odchyłeń od liniowego wykresu Scatcharda.

Liczba receptorów danego hormonu w różnych tkankach wynosić może od 2000 do 100 000 na komórkę. Początkowo przypuszczano (129), że odpowiedź hormonalna jest wprost proporcjonalna do liczby receptorów związanych z hormonem i maksymalną reakcją powoduje wysycenie wszystkich receptorów w komórce. Taką interpretację przyjmowali na przykład Goldfine i wsp.; opisali oni wiązanie insuliny przez komórki grasicy, któremu towarzyszyło proporcjonalne do ilości związanego hormonu uwalnianie kwasu γ -aminomasłowego (130). Liczne są jednak dane wskazujące, że maksymalny efekt fizjologiczny występuje już przy bardzo małej liczbie zajętych receptorów. Dufau zaobserwowała największą intensywność steroidogenezy w jądrach, gdy zajęty był zaledwie 1% obecnych w komórkach receptorów gonadotropiny (131). Podobne wyniki uzyskano badając kortykotropinę (132), insulinę (133) i tyreotropinę (134). Sugerują one możliwość występowania w komórce pewnego nadmiaru receptorów zwanych „zapasowymi” („*spare*” receptors), nie znamy jednak dotąd ich roli. Według Rodbarda (135) komórki reagują na pobudzenie hormonalne zgodnie z zasadą „wszystko albo nic”, jeżeli liczba zajętych receptorów przekracza pewną wartość progową. Prawdopodobieństwo połączenia hormonu z receptorem zależy od stężenia hormonu i receptora. Przy dużej liczbie receptorów stężenie hormonu potrzebne dla szybkiego osiągnięcia wartości progowej będzie mniejsze. Duża liczba receptorów

komórkowych ma być w tym ujęciu czynnikiem warunkującym wysoką czułość komórki na bodziec hormonalny. Wykazano też zależność między szybkością wiązania insuliny przez receptory a stanem metabolicznym komórki (136).

Przypuszcza się, że odpowiedź komórki na sygnał hormonalny może być zróżnicowana nie w zależności od liczby zajętych receptorów, ale w zależności od ich rodzaju, przy założeniu heterogenności receptorów dla danego hormonu. Ilościowe zależności między wiązaniem hormonu przez receptor i rozmiarem odpowiedzi komórkowej pozostają nadal niewyjaśnione. Dodatkowymi czynnikami, które należy uwzględnić przy określaniu tych zależności są: charakter wzajemnych oddziaływań hormon-receptor oraz kooperacja między poszczególnymi miejscami receptorowymi i ich heterogenność.

IV-2. Wpływ hormonów peptydowych na rozmieszczenie i aktywność receptorów

Liczba i stan receptorów komórkowych danego hormonu mogą ulegać zmianom w zależności od wielu czynników. Należą do nich: stan fizjologiczny organizmu, wiek, dieta. Wykazano występowanie różnej liczby receptorów gonadotropiny w kolejnych stadiach cyklu menstruacyjnego u kobiet (137). W monocytach noworodków zaobserwowano około 6-krotne więcej receptorów insuliny niż u osobników dorosłych 45 000 i 7000 receptorów przypadających na jedną komórkę i dwukrotnie większą stałą powinowactwa (138). Stwierdzono możliwość zwiększenia liczby receptorów insuliny u pacjentów z insulinoopornością przez zastosowanie odpowiedniej diety (139). W opisanych sytuacjach występują zmiany w stężeniu krążących hormonów. Wydaje się, że stężenie hormonów ma decydujący wpływ na liczbę i stan receptorów *in vivo* (140). Do takich wniosków skłania obserwowana w wielu przypadkach redukcja wiązania hormonu przez swoisty receptor po działaniu *in vitro* lub *in vivo* hormonów w dawkach odpowiadających stężeniom fizjologicznym i wyższym (efekt homotropowy — patrz Tabela 3).

Z analizy kinetyki procesu wiązania hormonu przez receptor wynika, że przyczyną obniżonego wiązania może być zmniejszenie liczby miejsc wiążących (142—146) lub też zmiany w powinowactwie receptora do hormonu (149, 150), bądź też jednoczesne występowanie obydwu zjawisk (151, 152). Działanie niektórych hormonów tropowych np. folitropiny, lutotropiny i prolaktyny na receptory powodowało wzrost wiązania hormonu (142).

Wpływ hormonów na receptory nie ogranicza się tylko do oddziaływań homotropowych: hormon — swoisty receptor. Możliwa jest również regulacja heterotropowa, jak w przypadku hamowania wiązania gonadotropiny przez limfocyty IM-9 w obecności estradiolu (153). Obserwowano

zwiększenie wiązania androgenów przez jądra szczurów pozbawionych przysadek mózgowych pod wpływem działania folitropiny i lutropiny (154). Możliwa jest także indukcja receptorów gonadotropiny przy udziale androgenów (155). Zmiany liczby receptorów pod wpływem hormonów mogą polegać na regulacji procesów biosyntezy i rozkładu białek receptorowych. Istnieje także możliwość regulowania ilości receptorów na etapie asocjacji ich podjednostek.

Tabela 3

Homotropowy wpływ hormonu na przebieg wiązania z receptorem

Hormon	Sposób działania	Wiązanie znakowanego hormonu przez receptor	Piśmiennictwo
Angiotensyna	<i>in vitro</i>	zmniejszone	141
Folitropina	<i>in vivo</i>	zwiększone	142
Glukagon	<i>in vivo</i>	zmniejszone	143
Insulina	<i>in vitro</i> <i>in vivo</i>	zmniejszone zmniejszone	144, 145, 146
Lutropina	<i>in vivo</i>	zwiększone	142
Prolaktyna	<i>in vivo</i>	zwiększone	147
Somatotropina	<i>in vitro</i>	zmniejszone	148

W doświadczeniach *in vitro* preinkubowano preparaty receptorów z hormonem, a następnie badano wiązanie nowych porcji hormonu przez te receptory.

W doświadczeniach *in vivo* zwierzętom podawano określone dawki hormonów, a następnie badano wiązanie hormonu przez receptory otrzymane z tkanek tych zwierząt.

Badając wpływ somatotropiny ludzkiej na liczbę swoistych receptorów w limfocytach IM-9, Lesniak i Roth (142) stwierdzili zmniejszenie liczby receptorów po działaniu hormonu w stężeniach 2×10^{-11} — 2×10^{-10} M (nie przekraczających stężenia *in vivo*). Ten sam skutek zaobserwowano po inkubacji komórek z cykloheksaimidem w stężeniu 0,1 mM. Jednocześnie dodanie cykloheksaimidu i somatotropiny dawało skutek sumujący się. Wydaje się zatem, że hormon ten reguluje procesy zachodzące po zakończeniu biosyntezy receptora. Zmniejszenie liczby receptorów komórkowych pod wpływem hormonów ostatnio wiążą badacze ze zjawiskiem przenikania hormonów do wnętrza komórki (156). Wykazano na przykład obecność kompleksów hormon-receptor w komórkach jajnika szczura (157). Zjawisko zmniejszenia liczby receptorów pod wpływem działania hormonu tłumaczyć można wchodzeniem kompleksu hormon-receptor do komórki. Mogłoby to, jak się zdaje odgrywać pewną rolę w ochronie tkanek przed zbyt dużymi stężeniami hormonu (por. rozdz. IV-3).

Wykazanie roli hormonów jako czynników regulujących poziom receptorów tkankowych rzuciło nowe światło na zagadnienie wrażliwości i oporności tkanek na działanie hormonów. Stwierdzono, normalny lub nawet podwyższony poziom insuliny we krwi u niektórych pacjentów

opornych na działanie insuliny. Towarzysząca hyperinsulinemii insulinooporność jest wynikiem redukcji liczby receptorów pod wpływem nadmiaru hormonu (rozdz. V).

IV-3. Degradacja hormonu związanego z receptorem

Do niedawna sądzono, że degradacja hormonu zachodzi we krwi i jest procesem całkowicie niezależnym od wiązania z receptorem. Brak zależności między wiązaniem i degradacją hormonu wykazano między innymi badając insulinę (158), glukagon (159), gonadotropinę (160) i kortykotropinę (103). Odmiennie wartości optymalnej temperatury, pH i siły jonowej, przy których zachodzi wiązanie hormonu przez receptor i degradację hormonu świadczą o niezależnym przebiegu obu procesów. Odmienny jest także wpływ związków blokujących grupy sulhydryłowe: po ich zablokowaniu degradacja hormonu hamowana jest silniej niż wiązanie. Analogi hormonów łączą się z receptorami z szybkością wprost proporcjonalną do ich aktywności biologicznej. Częściowo zdegradowana insulina, od której odłączono alaninę i kwas asparaginowy, a która wykazuje już tylko 1—2% aktywności natywnej insuliny ulega degradacji z taką samą szybkością co hormon natywny (158). Stwierdzono także występowanie różnic w szybkości degradacji insuliny natywnej i jej monojodopochodnej, przy braku różnic w szybkości wiązania obu hormonów (161).

Dodanie związku będącego analogiem hormonu nie wpływało na szybkość degradacji hormonu, chociaż hamowało jego wiązanie przez receptor. Stała K_m reakcji rozkładu insuliny przez błony hepatocytów wynosiła $1,7 \times 10^{-7}$ M, z czego wynika, że enzym degradujący ma znacznie niższe powinowactwo do insuliny niż znane receptory. Degradacja insuliny zachodzi najintensywniej w obecności zanieczyszczonych błon hepatocytów (158).

W nowszych pracach można jednak znaleźć wiele argumentów przemawiających na korzyść znaczenia powstawania połączenia hormon-receptor dla następczej degradacji jednego lub obu składników tego połączenia. Stwierdzono na przykład, że podczas oczyszczania błon hepatocytów wzrasta zarówno wiązanie glukagonu przez receptory jak i degradacja tego hormonu (159). Wskazywałoby to na występowanie strukturalnej zależności między czynnikami odpowiedzialnymi za wiązanie i degradację hormonu. Guanozynotrójfosforan, którego obecność niezbędna jest do aktywacji cyklazy adenylowej przez związany glukagon, nie wykazywał żadnego wpływu na przebieg degradacji hormonu. Okazało się także, że szybkość degradacji insuliny przez zawiesinę hepatocytów w temperaturze 30°C była proporcjonalna do liczby receptorów zajętych przez insulinę w stanie równowagi (162). Zmiany poglądów w tej dziedzinie dobrze ilustrują prace Gammelfoita i Gliemanna, którzy do-

nosili o braku zależności degradacji insuliny od związania jej przez komórki tłuszczowe szczura (163). Obecnie autorzy ci komunikują, że w stanie równowagi połowa radioaktywnej insuliny połączonej z receptorem ulega degradacji, podczas gdy reszta dysocjuje w niezmienionej postaci (164). Podczas degradacji związanego hormonu powstają peptydy, które natychmiast ulegają dalszemu rozkładowi tak, że jedynym możliwym do zidentyfikowania produktem degradacji insuliny jest [¹²⁵J]tyrozyna.

Pochodzące ze związanej z receptorem znakowanej radioizotopem insuliny piętno odnajdywano w związkach o większej od masy insuliny lub mniejszej masie cząsteczkowej. Przedłużając czas inkubacji hormonu z komórkami tłuszczowymi stwierdzono spadek ilości insuliny zdolnej do oddysocjowania z kompleksów hormon-receptor (165). Wydaje się zatem, że związanie z receptorem jest koniecznym warunkiem dla późniejszej degradacji hormonu. Przypuszcza się, że receptor pełni rolę czynnika przenoszącego hormon do miejsca degradacji, co potwierdzają ostatnie doniesienia o odnalezieniu znakowanych hormonów w lizosomach (166), a także kompleksów hormon-receptor wewnątrz komórek (157).

W świetle wyników nowszych badań przedstawione na początku rozdziału dane o niezależności procesów wiązania i degradacji dotyczą, jak się zdaje, czynników odpowiedzialnych za nieswoisty rozkład hormonów peptydowych.

Znacznie mniej uwagi poświęcano dotychczas procesom degradacji receptorów. O zachodzeniu tego zjawiska świadczy fakt, że preinkubacja błon hepatocytów szczura w nieobecności hormonu powoduje zmniejszenie pojemności wiązania insuliny, a więc redukcję liczby receptorów (86). Wielu autorów przyjmuje jako hipotezę roboczą założenie, że degradacja receptorów może być mechanizmem samoobrony komórki w przypadku nadmiaru hormonów peptydowych. Obserwowane „znikanie” receptorów z powierzchni komórek pod wpływem nadmiaru hormonu może być spowodowane wejściem receptora połączonego z hormonem do wnętrza komórki. Wielu autorów wysuwa przypuszczenie, że produkty wewnątrzkomórkowej degradacji hormonu lub receptora mogą przejawiać czynność biologiczną (156).

IV-4. Współdziaływanie receptorów a wiązania hormonów peptydowych

W badaniach kinetyki procesu wiązania hormonów przez receptory obserwuje się często odchylenia od liniowego przebiegu wykresu Scatcharda (Ryc. 2). Zjawisko takie zaobserwowano na przykład podczas wiązania insuliny przez hepatocyty (167), komórki tłuszczowe (168), limfocyty (169) i fibroblasty (170). Początkowo za przyczynę takich odchyłeń uważano heterogenność miejsc wiążących hormon. Postulowano wystę-

powanie w komórkach dwóch typów receptorów każdego hormonu różniących się powinowactwem przynajmniej o jeden rząd wielkości.

W roku 1973 De Meyts i wsp. (128) badając dysocjację kompleksów [^{125}J]insuliny z receptorem z błon limfocytów stwierdzili, że proces ten można przyspieszyć przez dodanie natywnego hormonu w nadmiarze. Według autorów dodanie nadmiaru hormonu prowadzi do zajęcia dotychczas wolnych miejsc receptorowych. Między sąsiadującymi ze sobą receptorami zachodzą oddziaływania typu kooperacji negatywnej a indukowane w ten sposób zmiany konformacji powodują przyspieszenie dysocjacji kompleksów hormon-receptor na skutek zmniejszenia się powinowactwa receptora do hormonu. Postulowano występowanie kooperacji negatywnej także dla receptorów innych hormonów peptydowych, w tym tyreotropiny (78), tyreoliberyny (171) i czynnika wzrostowego nerwu (149). Zdaniem niektórych autorów kooperacja negatywna jest szeroko rozpowszechnionym mechanizmem regulacji poprzez sprzężenie zwrotne, mającym na celu ochronę tkanek przed wpływem nadmiernych ilości hormonu. Jakkolwiek zjawisko to tłumaczy się często występowaniem interakcji między podjednostkami białek receptorowych (172—174) wydaje się, że może być ono również spowodowane przemieszczaniem się niezmiennych receptorów w płynnej warstwie lipidów błony (175, 179) prowadzącym do tworzenia przez cząsteczki receptorów charakterystycznych skupisk (*clustering*) (176).

Wpływ insuliny na dysocjację kompleksów hormon-receptor próbowano także tłumaczyć tworzeniem się polimerów hormonu lub występowaniem zawady przestrzennej związanej z oddziaływaniami typu ligand-ligand. Jednakże De Meyts i wsp. ustalili, że insulina w stężeniach, w których obserwowano badany efekt tj. nie przekraczających 10^{-7} M występuje w formie monomerów. Kontynuując badania nad kooperacją negatywną stwierdzili oni, że receptory insuliny z limfocytów ludzkich, monocytów i hepatocytów szczura i myszy występują w dwóch stanach: stan I obserwowano przy niskim wysyceniu receptora hormonem. Oddysocjowanie insuliny od takiego receptora zachodzi powoli w temperaturze 4°C i pH 8—9. Stan II związany jest z większym wysyceniem receptora przez hormon. Dysocjacja kompleksu jest szybsza niż w stanie I i może przebiegać w niższym pH (pH 5—6), wyższej temperaturze i obecności 1 M mocznika. Przejście receptora ze stanu I (wolno dysocjujące kompleksy hormon-receptor) do stanu II (szybko dysocjujące kompleksy hormon-receptor) następuje przy zwiększającym się wysyceniu przez hormon i zależy od warunków środowiska. Przejście takie można wywołać obniżając pH środowiska, stosując wysoką temperaturę, mocznik lub przeciwiała antyreceptorowe (172). Ostatnio De Meyts donosi o zbadaniu obszaru odpowiedzialnego za kooperację w cząsteczce insuliny (177). Na przykładzie przeprowadzonego do roztworu receptora insuliny z erytrocytów ptasich opisano występowanie kooperacji negatywnej z jednoczesną

dysocjacją receptora na podjednostki (114). Inkubując preparaty receptorów z insuliną we wzrastających stężeniach obserwuje się zmianę promienia Stockesa białka receptorowego z 72 Å do 40 Å. Te dwa rodzaje cząsteczek rozdzielono podczas sączenia na kolumnach z Sepharose. Obie formy miały jednak identyczne powinowactwo do hormonu, co przeczyło ścisłemu powiązaniu zmiany powinowactwa z rozpadem receptora na podjednostki. Podobne zmiany rozmiarów receptora pod wpływem działania hormonu wykazano także w innych układach: glukagon-receptor z serca (178) oraz hormon uwalniający gonadotropinę-receptor przysadkowy (179).

Teoria kooperacji negatywnej ma wielu przeciwników. Należą do nich Cuatrecasas i Hollenberg, którzy wykazali, że opisane przez De Meytsa przyspieszenie dysocjacji związanej insuliny po dodaniu nadmiaru hormonu, może zachodzić również w przypadku nieswoistego wiązania przez talk lub dwuamino-dwupropyloaminoagarozę (180). Zdaniem tych autorów przyczyną omawianego zjawiska jest występowanie oddziaływań pomiędzy cząsteczkami insuliny prowadzących do zmian w strukturze II i III rzędowej a w konsekwencji także do zmian w oddziaływaniu tego hormonu z receptorem.

V. Praktyczne aspekty badań nad receptorami hormonów peptydowych

Badania receptorów, prowadzone w celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania hormonów, mają jednocześnie poważny aspekt praktyczny. Śledząc bowiem przebieg oddziaływania hormonów z receptorami wyjaśniono częściowo przyczynę stanów patologicznych związanych z upośledzonym działaniem hormonu. Ponadto prace te przyczyniły się do opracowania czułych metod analitycznych o dużym znaczeniu w chemii klinicznej. Receptory można wykorzystać do oznaczania stężenia hormonów. Zasada metody radioreceptorowej przedstawiona na rycinie 1A jest taka sama jak w przypadku stosowanej powszechnie metody radioimmunologicznej. Wykorzystuje się tu współzawodnictwo między cząsteczkami substancji znakowanej izotopem H^* i tej samej substancji bez znacznika H_1 o ograniczoną liczbę miejsc swoiście wiążących — R. (Ryc. 1A) (181—184).

Badania nad receptorami hormonów mogą umożliwić wyjaśnienie patofizjologii wielu schorzeń, których przyczyny leżą w zakłóceniu prawidłowego oddziaływania hormonów z receptorami tkankowymi. Dotyczy to zwłaszcza chorób metabolicznych i endokrynopatii. Po raz pierwszy stwierdzono zaburzenie funkcji receptorów hormonów peptydowych u opornych na działanie insuliny myszy ob/ob (185, 186). Wykazanie obniżonego wiązania [^{125}J] insuliny przez limfocyty ludzkie w stanach oporności na insulinę związanej z otyłością stworzyło nowe możliwości w diag-

nostyce i terapii. Nieprawidłowa odpowiedź komórki na działanie hormonu może wynikać ze zmian w kinetyce oddziaływań hormonu z receptorem, w liczbie receptorów lub mechanizmie przekazywania sygnału do wnętrza komórki.

W tabeli 4 podano przypadki chorób, w których wykryto zaburzenia w interakcji hormon-receptor.

Tabela 4

Stany patologiczne związane z zakłóceniem interakcji hormon-receptor

Rodzaj zaburzenia i objawy	Przyczyna	Piśmiennictwo
Otyłość u ludzi związana z insulinopornością	zmniejszone wiązanie insuliny przez receptory	187
Genetycznie uwarunkowana otyłość u myszy ob/ob	—, —, —, —	186, 187
Rzekoma niedoczynność przystarczyc	przypuszczalnie zmniejszone wiązanie parathormonu przez receptory	188
Moczówka prosta oporna na wazopresynę	przypuszczalnie zmniejszone wiązanie wazopresyny przez receptory	189
Karłowatość Larona	przypuszczalnie zmniejszone wiązanie hormonu wzrostu przez receptory	190
Rak gruczołu mlekowego	zwiększone wiązanie prolaktyny przez receptory	191
Rogowacenie ciemne skóry, hiperinsulinemia i insulinoporność	występowanie przeciwciał antyreceptorowych	192, 193, 194, 198, 199
Cukrzyca insulinoporność	—, —, —, —	195
Choroba Gravesa nadczynność tarczycy	—, —, —, —	196

Zmiany w liczbie i stanie receptorów danego hormonu w poszczególnych tkankach wiążą się bezpośrednio z aktualnym poziomem tego hormonu we krwi. Podwyższenie stężenia danego hormonu prowadzi do redukcji lub wzrostu ilości homologicznych receptorów (rozd. IV) lub też zmian w powinowactwie receptora do hormonu.

U chorych z wrodzoną lipodystrofią obserwuje się zanikanie w monocytach frakcji receptorów insuliny charakteryzujących się wysokim powinowactwem w stosunku do hormonu. Jednocześnie rośnie inna frakcja tych receptorów o niskim powinowactwie w stosunku do hormonu (197).

Oporność na działanie hormonów może być spowodowana również obecnością przeciwciał antyreceptorowych, które zmieniają oddziaływanie hormonu z receptorem, jak to wykazano w przypadkach receptorów insuliny (192, 193, 194) i tyreotropiny (196). Przeciwciała skierowane przeciw receptorom insuliny wykryto we frakcji IgG białek surowicy osoby chorej na *diabetes mellitus*. Dodanie tej frakcji — oczyszczonej wstępnie

na kolumnach z DEAE-Sephadex — do hodowanych limfocytów linii Im-9 powodowało zahamowanie wiązania przez nie [125 J]insuliny. Podobny efekt obserwowano po dodaniu surowicy tej samej pacjentki. Podczas remisji insulinooporności nie wykryto obecności przeciwciał antyreceptorowych w surowicy (195).

Na inny aspekt czynności biologicznej przeciwciał antyreceptorowych wskazują badania nad receptorami tyreotropiny u pacjentów z chorobą Graves'a przeciwciała występujące w krwi tych pacjentów jak gdyby zastępują tyreotropinę; określane są one mianem LATS (*long acting thyroid stimulator*) (196). Podobne skutki działania przeciwciał antyreceptorowych polegające na wywoływaniu reakcji fizjologicznej charakterystycznej dla danego hormonu przytoczono w rozdziale VII-2.

VI. Wiązanie hormonu przez receptor a skutek biologiczny

Poniżej przedstawiono starsze i nowsze koncepcje dotyczące sposobu działania hormonów peptydowych.

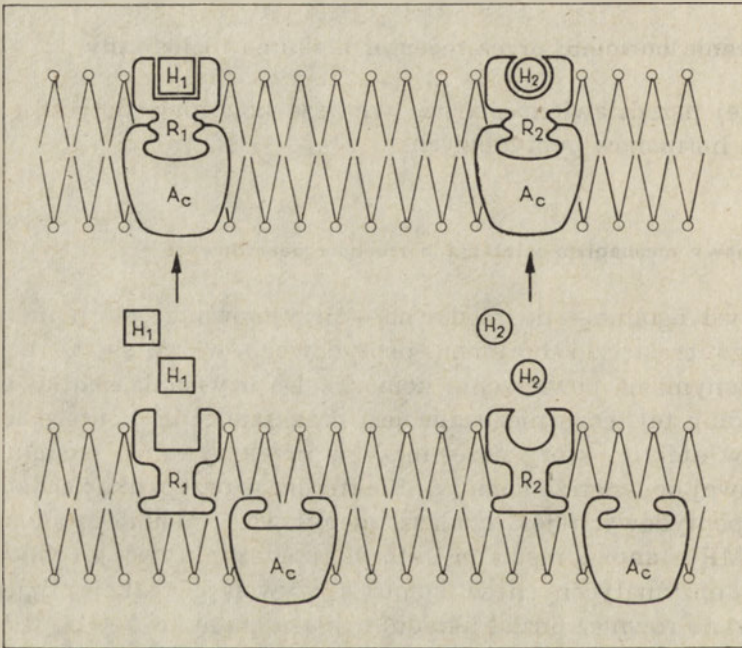
VI-1. Błonowy mechanizm wiązania hormonów peptydowych

W myśl ogólnie — do niedawna — przyjmowanej teorii mechanizmu błonowego cząsteczki hormonu peptydowego wiążą się z receptorami umieszczonymi na powierzchni komórki. Do uzyskania skutku biologicznego według tej teorii niezbędne jest przekształcenie konformacyjne receptora w efektor, który uczestniczy w przekazywaniu sygnału z błony komórkowej do wnętrza komórki. Efektorem w przypadku zbadanych hormonów peptydowych jest cyklaza adenylova. Produkt działania cyklazy — cAMP stanowi mediator, który poprzez aktywację odpowiednich układów enzymatycznych w komórce wywołuje reakcję fizjologiczną. Postulowano również udział układu: cyklaza guanylova — cGMP. W wielu przypadkach wykazano niezbędność jonów wapniowych w tym procesie. Ich udział stwierdzono badając kortykotropinę (198), glukagon (199, 200, 201), oksytocynę (55), wazopresynę (80) i gonadotropinę (19). Sposób w jaki pobudzenie przez bodziec hormonalny przekazane zostaje do następnego ogniwa — cyklazy — nie jest dotychczas wyjaśniony. Mechanizm aktywacji cyklazy adenylowej przy udziale hormonów omówiono w artykułach publikowanych w *Postęпах Biochemii* t. 18, 1972 r.

Początkowo zakładano ścisłą zależność strukturalną pomiędzy receptorem i cyklazą. Komórki tłuszczowe wiążą przynajmniej osiem różnych hormonów: glukagon ACTH, sekretynę, hormon luteinizujący, katecholaminy, prostaglandyny i insulinę. Jeżeli przyjąć, że receptor każdego hormonu jest podjednostką regulatorową cyklazy adenylowej i ma masę

cząsteczkową rzędu 100—200 tysięcy daltonów, to zgrupowanie w błonie komórkowej tak dużej ilości złożonych kompleksów wydaje się mało prawdopodobne (180).

Ostatnio wielu autorów wykazało doświadczalnie odrębność strukturalną receptorów i cyklazy adenylowej. Kompleks receptora z hormonem oddzielono od cyklazy metodą sączenia molekularnego (202, 203). Stwierdzono również, że jednoczesna stymulacja aktywności cyklazy adenylowej przez dwa różne hormony: sekretynę i glukagon — nie daje efektu addytywnego, co wskazuje na udział jednej cyklazy nie powiązanej stałe z receptorami w procesie działania obu tych hormonów (198). Ostatnio Orly i wsp. przeprowadzili fuzję komórek F myszy pozbawionych receptorów katecholamin z erytrocytami, w których hamowano nieodwra-



Ryc. 3. Aktywacja cyklazy adenylowej (Ac) w błonie komórkowej za pośrednictwem kompleksów hormon-receptor ($Ac-H_1$, $Ac-H_2$) zgodnie z teorią ruchomego receptora (wg 180, zmodyfikowane).

calnie aktywność cyklazy adenylowej (204). W tak skonstruowanych układach obserwowali oni stymulację aktywności cyklazy za pośrednictwem katecholamin.

Dla wyjaśnienia mechanizmu współdziałania receptora z cyklazą posłużono się modelem Nicolsona i Singera (9) zakładającym płynną, mozaikową strukturę błony komórkowej. Uważa się, że cząsteczki białkowe, w tym również różne receptory, mogą swobodnie przemieszczać się w płynnej warstwie lipidowej. Bennett, O'Keefe i Cuatrecasas

w roku 1975 ogłosili tzw. teorię ruchomego receptora (180, 209). Według tej teorii receptor po związaniu cząsteczki hormonu uzyskuje powinowactwo do cykazy adenylowej i przemieszczając się w błonie łączy się z tym enzymem powodując jego aktywację (Ryc. 3).

Teoria ruchomego receptora sformułowana została na podstawie badań nad działaniem toksyny cholery na cyklazę adenylową w różnych komórkach. Działanie to przejawia ścisłą analogię z działaniem hormonów. Opierając się na takim modelu doświadczalnym wykazano, że aktywacja cykazy jest procesem zależnym od płynnej warstwy lipidowej błon plazmatycznych umożliwiającą dyfuzję cząsteczek białkowych.

Wpływ fosfolipidów błony na proces aktywacji cykazy adenylowej postulowano już wcześniej na podstawie doświadczeń, w których obserwowano hamowanie przez fosfolipazę syntezy cyklicznego AMP pobudzanej przez glukagon. Utratę wrażliwości na glukagon w błonach hepatocytów traktowanych fosfolipazą można odwrócić dodając preparaty fosfolipidów błonowych (206). Zanik aktywacji cykazy adenylowej przez hormon obserwowano także po dodaniu Lubrolu do preparatów błon komórkowych z serca kota (207). Stosując fosfolipazy z różnych źródeł o różnej swoistości substratowej m.in. z *Bacillus aurens* i *Clostridium perfringens* wykazano, że na aktywację cykazy adenylowej z błon hepatocytów odpowiedzialna jest frakcja kwaśnych fosfolipidów (102). Wykazano, że GTP i GDP są niezbędne do aktywacji cykazy przez glukagon w hepatocytach (208).

GTP i jego fosforanowe pochodne stymulują aktywność cykazy powodując jednocześnie zmniejszenie powinowactwa receptorów glukagonu do tego hormonu (209). Wydaje się, że GTP wpływa zarówno na cyklazę adenylową jak i na receptor na drodze odmiennych mechanizmów. Rodbell i wsp. (215) wykazali, że GTP zmienia konformację cząsteczki receptora prowadząc w konsekwencji do obniżenia powinowactwa (zmiana stałej dysocjacji kompleksu hormon-receptor z 2 nM do 10—20 nM). Tylko tak przekształcony receptor może połączyć się z cyklazą adenylową. Enzym zaś może występować w dwóch stanach konformacyjnych, z których tylko stan I, charakteryzujący się wysokim powinowactwem w stosunku do GTP przejawia zdolność do łączenia się z receptorem glukagonu. Podobny wpływ nukleotydów obserwowano w przypadku innych hormonów: folitropiny, adrenaliny, tyreotropiny (208).

VI-2. Wewnątrzkomórkowy mechanizm wiązania hormonów peptydowych

Teoria receptorów błonowych, które po połączeniu z hormonem indukują w błonie zmiany prowadzące przy udziale pośredników do zmian w metabolizmie komórkowym, zakładała tylko jedną, uniwersalną drogę działania wszystkich hormonów peptydowych. Niektórych zjawisk nie

można jednak wyjaśnić opierając się na tej teorii. Nie udało się bowiem dotąd wykryć ani efektora ani mediatora insuliny i hormonu wzrostu. Wykazano niezgodność między stężeniem hormonu wywołującym wzrost stężenia cAMP i stężeniem, przy którym obserwuje się największą intensywność reakcji fizjologicznej. Stwierdzono występowanie receptorów hormonów peptydowych w różnych organellach komórkowych.

Wykrycie obecności hormonów i receptorów wewnątrz komórek zapoczątkowało zmianę poglądów na mechanizm działania hormonów peptydowych. Uważa się obecnie, że przenikanie do wnętrza komórek stanowi alternatywną drogę działania hormonów peptydowych. Mechanizm błonowy (pośredni) odpowiedzialny jest, jak się wydaje, za krótkotrwałe efekty działania hormonów, jak na przykład przyspieszanie przez insulinę transportu cukrów i aminokwasów. Wejście zaś do wnętrza komórki jest warunkiem wywierania przez hormon długotrwałych efektów, na przykład pobudzanie przez insulinę biosyntezy białek, kwasów nukleinowych, hamowanie rozkładu białek poprzez odpowiednią regulację aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych (211).

Rejestrując proces wchodzenia do komórki α_2 -makroglobuliny surowicy znakowanej fluoresceiną przy użyciu kamery telewizyjnej wykazano, że odbywa się ono na drodze endocytozy (212) co sugerowano już wcześniej na przykład w przypadku epidermalnego czynnika wzrostowego, pobieranego do wnętrza fibroblastów (98). Okazało się, że α_2 -makroglobulina wchodzi do wnętrza fibroblastów razem z cząsteczkami insuliny i epidermalnego czynnika wzrostowego. Białko to posiada zdolność hamowania aktywności wewnątrzkomórkowych proteaz i zdaniem Willinghama chroni hormony przed inaktywacją, pozwalając na wywieranie długotrwałych efektów metabolicznych.

Wnikanie hormonów peptydowych do komórek uważane jest obecnie za fakt bezsporny. Kontrowersyjne są natomiast hipotezy wyjaśniające dalsze losy hormonów w komórkach. Przypuszcza się, że hormon wchodzi do komórki razem ze swoim receptorem. Wiadomo, że dzieje się tak istotnie w przypadku choriogonadotropiny i epidermalnego czynnika wzrostowego (212). A zatem przyjęto, „że raczej receptory, a nie hormony mogą być aktywne biologicznie. Zgodnie z tą hipotezą hormony wchodzą do komórek tylko po to, żeby przenieść ze sobą receptory” (213).

Potwierdzeniem zdolności receptorów do wywierania określonych skutków fizjologicznych są cytowane w rozdziale VI-2 przykłady uzyskiwania swoistych dla hormonów zmian fizjologicznych przez podziałanie na ich receptory przeciwciałami antyreceptorowymi. Jacobs i Cuatrecasas wykazali, że przeciwciała uzyskane przeciw receptorom insuliny z błon hepatocytów szczura powodują zwiększenie utleniania glukozy i zahamowanie indukowanej przez adrenalinę lipolizy w komórkach tłuszczowych szczura (214). Za hipotezą aktywności biologicznej receptorów przemawiają również wyniki obserwacji Kahna, który

stwierdził redukcję liczby receptorów insuliny w adipocytach szczura poddanych działaniu przeciwciał. Efektu takiego nie zauważono w przypadku izolowanych błon komórkowych co świadczy o tym, że zniknięcie receptorów z powierzchni komórki polega na ich przeniknięciu przez błonę do wnętrza (215).

Niezależnie od ustalenia, czy hormon, czy też jego receptor przejawia właściwą dla pobudzenia aktywność biologiczną, pozostaje do rozstrzygnięcia problem dalszych losów kompleksu hormon-receptor w komórce. Wykrycie obecności hormonów peptydowych i receptorów w lizosomach (166, 212), a także obecności kompleksów hormon-receptor wewnątrz komórek (157), skłania do przypuszczenia, że kompleks ten ulega w komórce rozkładowi.

Jak wynika z przedstawionych wyników badań nad receptorami hormonów peptydowych — wyłoniły się w ostatnich latach zupełnie nowe pytania:

- jaka jest rola receptorów w procesie przechodzenia hormonów przez błonę komórkową, a także czy i w jaki sposób receptory pośredniczą w degradacji hormonów?
- który z dwóch składników połączenia hormon-receptor odpowiedzialny jest za wywołanie zmian fizjologicznych?
- jaką rolę odgrywają produkty rozpadu receptora i hormonu?
- jaką funkcję pełnią receptory wewnątrzkomórkowe?

Należy spodziewać się, że udzielenie odpowiedzi na te pytania przyczyni się do pełnego zrozumienia mechanizmu działania hormonów peptydowych. Mechanizm ten wydaje się bardziej złożony niż dotychczas sądzono. Hormony peptydowe wywierają w komórkach różnorodne skutki, a każdy z nich może być osiągany na innej drodze. Ponadto poszczególne hormony peptydowe mogą działać na różne sposoby. Obalenie niepodważalnej do tej chwili tezy, że hormony te nie przenikają do komórek i mają wspólną drogę działania stworzyło nowe perspektywy badawcze.

Zaakceptowano do druku 27.03.1979

PISMIENNICTWO

1. De Pierre' J. W., Karnovsky M. L., (1973), *J. Cell. Biol.* **56**, 275—303.
2. Hunter W. M., Greenwood F. C., (1962), *Nature*, **194**, 495—496.
3. Turkington R. W., Majumder B. C., Kadonama G. C., (1973), *Recent. Prog. Horm. Res.*, **29**, 417—455.
4. Hechter O., (1955), *Vitamines and Hormones*, **13**, 293—314.
5. Berson S. A., Yalow R. S., (1959), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **82**, 338—344.
6. Pastan J., Roth J., Macchia V., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **56**, 1802—1809.
7. Cuatrecasas P., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **63**, 450—457.
8. Rall T. W., Sutherland E. W., (1959), *J. Biol. Chem.*, **232**, 1065—1076.

9. Singer S. J., Nicolson G. L., (1972), *Science*, **175**, 720—731.
10. Goldfine I. D., Smith G. J., Wong K. Y., Jones A. L., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 1368—1372.
11. Lin S. Y., Goodfriend T. L., (1970), *Am. J. Physiol.*, **218**, 1319—1328.
12. Rouzairre-Dubois B., Devynck M. A., Chevillotte E., Meyer P., (1975), *FEBS Letters*, **55**, 168—172.
13. Devynck M. A., Meyer P., (1976), *Am. J. Med.*, **61**, 758—767.
14. Regoli D., Barabe J., Park W. K., (1977), *J. Can. Physiol. Pharmacol.*, **55**, 855—867.
15. Dufau M. L., Charreau E. H., Catt K. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6973—6982.
16. Catt K. J., Dufau M. L., Tsuruhara T., (1971), *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, **32**, 860—870.
17. Dufau M., Charreau E. H., Ryan D., Catt K. J., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 149—153.
18. Dufau M., Ryan D. W., Baukal A. J., Catt K. J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4822—4824.
19. Mendelson C., Dufau M., Catt K., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8818—8823.
20. Hollenberg M. D., Cuatrecasas P., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 2964—2968.
21. Means A. R., Vaitukaitis J., (1972), *Endocrinology*, **90**, 39—46.
22. Abou-Issa H., Reichert L. E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3326—3337.
23. Cheng K. W., (1975), *Biochem. J.*, **149**, 123—132.
24. Maghuin G., Closset J., Combarous Y., Hennen G., Dechenne C., Ketelslegers J. M., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **86**, 121—131.
25. Baur S., Bacon V. C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 928—933.
26. Brown J., Gallagher D., Neil D., (1978), *Biochem. Biophys. Acta*, **538**, 42—49.
27. Giorgio N. A., Johnson C. B., Blecher M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 428—437.
28. Tomassi V., Koretz S., Ray T. K., Dunnick J., Marinetti G. V., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 31—42.
29. Goldfine I. D., Roth J., Birnbaumer L., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 1211—1218.
30. Archer J. A., Gorden P., Gavin J. R., (1973), *J. Clin. Invest.*, **21**, 4a.
31. Gavin J. R., Buell D. N., Roth J., (1972), *Science*, **178**, 168—169.
32. Gavin J. R., Mann D. L., Buell D. N., Roth J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 870—876.
33. Cuatrecasas P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 318—322.
34. Cuatrecasas P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1277—1281.
35. House P. D. R., Weidemann M. J., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 541—548.
36. Freychet P., Roth J., Neville D. M., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 400—408.
37. Cuatrecasas P., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **68**, 1264—1268.
38. Cuatrecasas P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6522—6531.
39. Posner B. J., (1972), *Clin. Res.*, **20**, 922.
40. Posner B. J., (1974), *Diabetes*, **23**, 209—217.
41. Gavin J. R., Roth J., Jen P., Freychet P., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 747—751.
42. Freychet P., Forgue E., (1974), *Diabetes*, **23**, (supl. I), 354.

43. Marx S. J., Woodward C. J., Aurbach C. D., (1972), *Science*, **178**, 999—1001.
44. Lefkowitz R. J., Roth J., Princer W., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **65**, 745—752.
45. Lefkowitz R. J., Pastan I., Roth J., (1969), w *The Role of Adenyl Cyclase 3'5' AMP in Biological System*, red. Rall T., Rodbell M., Condliffe P., str. 88—95, NIH Fogarthy International Center Proceedings nr 4. National Institutes of Health, Bethesda, Md.
46. Spona J., (1974), *FEBS Letters*, **39**, 221—224.
47. Lee C. Y., Ryan L. J., (1971), *Endocrinology*, **89**, 1515—1523.
48. Banerjee S. P., Snyder S. H., Cuatrecasas P., Greene-L. A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 2519—2523.
49. Walter R., Schwartz J. L., Hechter O., (1972), *Endocrinology*, **91**, 39—48.
50. Roy C., Bockaert J., Rajerison R., Jard S., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 329—334.
51. Soloff M. S., Schwartz T. L., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1376—1381.
52. Soloff M. S., Schwartz T. L., Morrison M., Saffran M., (1973), *Endocrinology*, **92**, 104—107.
53. Soloff M. S., Schwartz T. L., Saffran M., (1972), *Endocrinology*, **91**, 213—216.
54. Soloff M. S., Schwartz T. L., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6471—6478.
55. Soloff M. S., Schroeder B. T., Chakraborty J., Pearlmutter F., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 1861—1866.
56. Sutcliffe H. S., Martin T. J., Pilczyk R., (1973), *Biochem. J.*, **134**, 913—921.
57. Malbon C. C., Zull J. E., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 952—958.
58. Di Bella F. P., Dousat T. P., Miller S. S., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **71**, 723—726.
59. Zull J. E., Malbon C. C., Chuang J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1071—1078.
60. Malbon C. C., Zull J. E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 1079—1083.
61. Shiu R. P. C., Kelly P. A., Friesen H. G., (1973), *Science*, **180**, 968—971.
62. Costlow M. E., Bushow R. A., Mc Guire W. L., (1975), *Life Sci.*, **17**, 1457—1466.
63. Posner B. J., Kelly P. A., Shiu R. P. C., (1974), *Endocrinology*, **95**, 521—531.
64. Kelly P. A., Posner B. J., Taushima T., (1974), *Endocrinology*, **95**, 532—539.
65. Van Wyk J. J., Underwood L. E., Hintz R. L., (1974), *Rec. Prog. Horm. Res.*, **30**, 259—295.
66. Hall K., Takano K., Fryklund L., (1974), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39**, 973—976.
- 66a. Ogawa N., Thompson T., Friesen H. G., Martin J. B., Brazeau P., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 269—277.
67. Tsushima T., Friesen H. G., (1973), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**, 334—337.
68. Herington A. C., Philips L. S., Daughaday W. H., (1976), *Metabolism*, **25**, 341—353.
69. Poirier G., Labrie F., Barden N., Lemaire S., (1972) *FEBS Letters*, **20**, 283—286.

70. Barden N., Labrie F., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7601—7606.
71. Hinkle P. M., Tashijan A. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6180—6186.
72. Wilber J. F., Seibel M. J., (1973), *Endocrinology*, **92**, 888—893.
73. Haye B., Jacquemin C., (1971), *FEBS Letters*, **18**, 47—52.
74. Manley S. W., Bourke J. R., Hawker R. W., (1972), *J. Endocrinol.*, **55**, 555—563.
75. Amir S. M., Carraway T. F., Kohn L. D., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 4092—4100.
76. Lissitzky S., Fayet G., Verrier B., (1973), *FEBS Letters*, **29**, 20—24.
77. Verrier B., Fayet G., Lissitzky S., (1974), *Eur. J. Biochem.* **42**, 355—365.
78. Kohn L. D., Winand L. J., (1975), w *Molecular aspects of Membrane Phenomena*, red. Kaback H. R., Neurath H., i in., str. 149—180, Springer Verlag, Berlin.
79. Desboquois B., Laudat M. H., Laudat P., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1187—1194.
80. Cambell B. J., Woodward G., Borberg V., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6167—6175.
81. Bockaert J., Roy C., Rajerison R., Jard S. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5922—5931.
82. Bennet V., Cuatrecasas P., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 362—380.
83. Orci L. C., Rufener F., i Malaisse-Lagae F., Blondel B., Amherdt M., Bataille D., Freychet P., Perrelet A., (1975), *Isr. J. Med. Sci.*, **II**, 639—655.
84. Jarret L., Smith R. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7024—7031.
85. Jarret D. B., Roth J., Kahn C. R., Flier J. S., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **73**, 4115—4119.
86. Kahn C. R., (1975), w *Methods in Membrane Biology*, red. Korn D., t. 3, str. 81—146, Plenum Press, London.
87. Goldfine I. D., Smith G. J., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* **73**, 1427—1431.
88. Kahn C. R., (1976), *J. Cell. Biol.*, **70**, 261—286.
89. Horvat A., Li E., Katsoyannis P. G., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **382**, 609—620.
90. Bergeron J. J. M., Evans W. H., Geschwind J. J., (1973), *J. Cell. Biol.*, **59**, 771—776.
91. Bergeron J. J. M., Posner B. J., Josefsberg Z., Sikstrom R., (1976), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4058—4066.
92. Forgue M. E., Freychet P., (1975), *Diabetes*, **24**, 715—723.
93. Vigneri R., Goldfine I. D., Wond K. Y., Smith G. J., Pezzino V., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2098—2103.
94. Garvin J. L., Celehrter T. D., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 52—59.
95. Kolb H. J., Renner R., Hepp K. D., Weiss L., Wieland O. H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 248—252.
96. Oka T., Tapper Y. J., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **71**, 1630—1633.
97. Nordquist R. E., Palmieri G. M. A., (1974), *Endocrinology*, **95**, 229—237.
98. Carpenter A. G., Cohen S., (1976), *J. Cell. Biol.*, **71**, 159—171.
99. Nolin J. M., Witorch R. J., (1976), *Endocrinology*, **99**, 949—958.
100. Rao Ch. V., Satybrata M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 636—643.

101. Pohl S. L., Krans M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4447—4454.
102. Rubalcava B., Rodbell M., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3831—3837.
103. Lefkowitz J. R., Roth J., Pastan I., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **185**, 195—209.
104. Dufau M. L., Charreau E., Catt K. J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 6973—6982.
105. Azahar S., Hajra A. K., Menon K. M. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 7405—7412.
106. Saxena B. B., (1976), w *Methods in Receptor Research* red. Blecher M., t. 1 str. 251—299, Marcel Dekker N. York
107. Cuatrecasas P., Illiano G., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4938—4946.
108. Lee G., Aloj S. M., Kohn L. D., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 434—441.
109. Tate R. L., Holmes J. M., Kohn L. D., Winand R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6527—6535.
110. Cuatrecasas P., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6532—6542.
111. Klein I. M., Fletcher M. A., Leves G. S., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5552—5554.
112. Levey G. S., Fletcher M. A., Ramachandran S., (1976), w „*Methods in receptor research*”, red. Blecker M., t. 1, str. 143—158, Marcel Dekker, N. York.
113. Jacobs S., Shechter Y., Bissel K., Cuatrecasas P., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 981—988.
114. Ginsberg B. H., Kahn C. R., Roth J., De Meyts P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 1068—1074.
115. Shiu R. P. C., Friesen H. G., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7902—7911.
116. Berson S. A., Yalow R. S., (1969), w *Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology* red. Berson S. A., Yalow R. S., t. 2, str. 84—125, North Holland, Amsterdam.
117. Eddy L. J., Hershman J. M., Taylor R. E., Barker S. B., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 140—146.
118. Grant G., Vale W., Guillemin R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 28—34.
119. Hseuch A. J. W., Dufau M. L., Katz S. J., Catt K. J., (1976), *Nature*, **261**, 710—712.
120. Galardy R. E., Graig L. C., Jamiesin J. D., Printz H. P., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3510—3518.
121. Yip C. C., Young C. W. T., Mouk M. L., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1743—1745.
122. Hofman K., Wingender W., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **67**, 829—836.
123. Goodfriend T., Lin S-Y., (1969), *Clin Res.*, **17**, 243.
124. Pullen R. A., Lindsay D. G., (1976), *Nature*, **259**, 369—373.
125. Wan-Kyng Liu, Kuo-Pao Yand, Burleigh B. D., Ward D. N., (1974), w *Current topics in molecular endocrinology*, red. Dufau M. L., Means A. R., t. 1, str. 89—108, Plenum Press, N. York, London.
126. Posner B. I., (1975), *J. Can. Physiol. Pharmacol.*, **53**, 689—703.
127. Scatchard G., (1949), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660—672.
128. De Meyts P., Roth J., Neville D. M., Gavin J. R., Lesniak M. A., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 154—161.

129. R;o;d;b;a;r;d; W., (1973), w *Receptors for reproductive hormones*, red. O'Malley B. W., Means A. R., str. 342—364. Plenum, New York.
130. Goldfine I. D., Gardner J. D., Neville D. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6919—6926.
131. Dufau M. L., Matanabe F., Catt K. J., (1973), *Endocrinology*, **92**, 6—11.
132. Beal R. J., Sayers G., (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, **148**, 70—76.
133. Kono T., Barham F., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 6210—6216.
134. Williams J. H., (1972), *Endocrinology*, **91**, 1411—1417.
135. Rodbard D., (1973), w *Receptors for Reproductive Hormones*, red. O'Malley B. W., Means A. R., str. 289—326, Plenum New York.
136. Gliemann J., Gammeltoft S., (1974), *Diabetologia*, **10**, 105—113.
137. Hontela S., (1974), *Lancet*, **7894**, 1454—1455.
138. Thorrrson A. U., Hintz R. L., (1977), *N. Engl. J. Med.*, **297**, 908—912.
139. Archer J. A., Gorden P., Roth J., (1975), *J. Clin. Invest.*, **55**, 166—174.
140. Raff M., (1976), *Nature*, **259**, 265—266.
141. Devynck M. A., Rouzaire-Dubois B., Chevilotte E., Meyer P., (1976), *Eur. J. Pharmacol.*, **40**, 27—37.
142. Lesniak M. A., Roth J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3720—3729.
143. Soman Y., Felig P., (1978), *Nature*, **272**, 829—832.
144. Kahn C. R., Neville D. M., Gorden P., Feychet R., Roth J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 135—142.
145. Soll A. H., Kahn C. R., Neville D. M., Roth J., (1975), *J. Clin. Invest.*, **56**, 769—780.
146. Bar R. S., Gorden P., Roth J., Kahn C. R., De Mayts P., (1976), *Clin. Res.*, **24**, 269A.
147. Posner B. J., Kelly P. A., Friesen H. G., (1975), *Science*, **188**, 57—59.
148. Lesniak M. A., Biance A. R., Roth J., Gavin J. R., (1974), *Clin. Res.*, **22**, 343A.
149. Frazier W. A., Boyd C. F., Bradshaw R. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5513—5519.
150. Limbird L. E., De Meyts P., Lefkowitz R. J., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 1160—1168.
151. Olefsky J. M., Johnson J., Lin F., Jen P., Reaven G. M., (1975), *Metabolism*, **24**, 517—527.
152. Bar R. S., Gorden P., Roth J., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 1123—1135.
153. Ranke M. B., Parks J. S., (1974), *Endocrinology*, **94**, supl. A-73.
154. Fritz J. B., Kopec B., Kam Lam, Vernon R. G., (1974), w *Current topics in molecular endocrinology*, red. Dufau M. L., Means A. R., t. 1, str. 311—328, Plenum Press, N. York, London.
155. Purvis K., (1977), *Nature*, **265**, 169—170.
156. Kolata B. G., (1977), *Science*, **196**, 747—748.
157. Conn P. M., Conti M., Harwood J. F., (1978), *Nature*, **274**, 598—600.
158. Freychet P., Kahn R., Roth J., Neville D. M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 3953—3961.
159. Pohl S. L., Keans M. J., Rodbell M., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 2295—2301.
160. Dufau M., Catt K., Tauruhara T., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 2414—2416.
161. Sodoyez J. C. F., Sodoyez-Golfaux M. M., Goff A. E., Zimmermann E. R., Arquilla A. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4268—4277.
162. Terris S., Steiner D. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8389—8398.

163. Gammeltoft S., Gliemann J., (1973), *Biochem. Biophys. Acta*, **320**, 16—32.
164. Gammeltoft S., Gliemann J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7857—7863.
165. Kahn C. R., Baird K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4900—4906.
166. Gorden P., Carpentier J. I., (1978), *Science*, **200**, 782—785.
167. Kahn C. R., Freyecht P., Roth J., Neville D. M., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2249—2259.
168. Freychet P., Laudat M. H., Laudat P., Rosselin G., Kahn C. R., Gorden P., Roth J., (1972), *FEBS Letters*, **25**, 339—342.
169. Gavin J. R., Roth J., Archer J. A., Buall D. N., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 2202—2207.
170. Rechler M. M., Podskalny J. M., (1976), *Diabetes*, **25**, 250—255.
171. Grant G., Vale W., Guillemin R., (1972), *Endocrinology*, **92**, 1629—1633.
172. De Meyts P., Bianco A. R., Roth J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1877—1888.
173. Levitzki A., (1974), *J. Theor. Biol.*, **44**, 367—372.
174. Colosimo A., Brunori M., Wyman J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **100**, 47—57.
175. Jacobs S., Cuatrecasas P., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **433**, 482—498.
176. Roth J., Lesniak M. A., Kahn C. R., Megyesi K., (1975), *Rec. Prog. Horm. Res.*, **31**, 95—139.
177. De Meyts P., Van Obberghen E., Roth J., Wollmer A., Brandenburg D., (1978), *Nature*, **273**, 504—509.
178. Klein O., Fletcher M. A., Levey G. S., (1973), *J. Biol. Chem.* **248**, 5552—5554.
179. Zolman J., Valenta L., (1976), The Fifth International Congress of Endocrinology, Abstracts 29.
180. Cuatrecasas P., Hollenberg M. D., Kwen Jen Chang, Bennet V., (1975), *Rec. Prog. Horm. Res.* **31**, 37—94.
181. Lefkowitz R. J., Roth J., Pastan J., (1970), *Science*, **170**, 633—635.
182. Shiu R. P. C., Friesen H., (1973), *Science*, **180**, 968—971.
183. Catt K. J., Dufau M., Tsauruhara T., (1972), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **34**, 123—132.
184. Megyesi K., Kahn C. R., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 307—315.
185. Kahn C. R., Neville D. M., Gorden P., Freychet P., Roth J., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 135—142.
186. Kahn C. R., Neville D. M., Roth J., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 244—250.
187. Archer J. A., Gorden P., Gavin J. R., Lesniak M. A., Roth J., (1973), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **36**, 627—633.
188. Chase L. R., Melson G. L., Aurbach G. D., (1969), *Clin. Invest.* **48**, 1832—1844.
189. Hays R. M., (1976), *N. Engl. J. Med.* **295**, 659—665.
190. Laron Z., Pertzalan A., Karp M., (1968), *Isr. J. Med. Sci.*, **4**, 885—894.
191. Kelly P. A., Bradley C., Shiu R. P. C., Meites J., Friesen H. G., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **156**, 816—819.
192. Flier J. S., Kahn C. R., Jarret D. B., (1976), *Immunol. Commun.* **5**, 361—375.

193. Flier J. S., Kahn C. R., Jarret D. B., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 1442—1449.
194. Pullini M., (1976), *Ann. Intern. Med.*, **85**, 749—751.
195. Blackburn W. G., Anderson J. W., Mullinax F., (1977), *Ann. Intern. Med.*, **86**, 84—85.
196. Mc Kenzie J. M., (1972), *Metabolism*, **21**, 883—894.
197. Oseid S., Beck-Nielsen H., Pederson O., Sovik C., (1977), *New Engl. J. Med.*, **296**, 245—248.
198. Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 718—722.
199. Sayers G., Beall R. J., Seelig S., (1972), *Science*, **175**, 1127—1133.
200. Haskar A., Peron F. G., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 445—450.
201. Ray T. K., Tomassi V., Marinetti G. V., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **211**, 20—30.
202. Welton A. F., Lad P. L., Newby A. A., Yamamura H., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5947—5950.
203. Tomassi V., Koretz S., Ray T. K., Dunnick J., Marinetti G. V., (1979), *Biochem. Biophys. Acta*, **211**, 31—42.
204. Schramm M., Orly J., Eimerl S., Korna M., (1977), *Nature*, **268**, 310—313.
205. Cuatrecasas P., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 33—37.
206. Pohl S. L., Krans H. M. J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 4447—4454.
207. Levey G. S., Fletcher M. A., Klein J., (1975), *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **5**, 53—65.
208. Rodbell M., (1973), *Fed. Proc.*, **32**, 1854—1858.
209. Lad P. M., Welton A. F., Rodbell M., (1977), **252**, 5942—5946.
210. Lin M. C., Nicosia S., Lad P. M., Rodbell M., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2790—2792.
211. Goldfine I. D., (1977), *Diabetes*, **26**, 148—155.
212. Willingham M. C., Pastan I., (1978), *Cell*, **13**, 501—507.
213. Kolata B. G., (1978), *Science*, **201**, 895—897.
214. Jacobs S., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1978), *Science*, **200**, 1283—1289.
215. Kahn C. R., Baird K., Flier J. S., Jarret D. B., (1977), *J. Clin. Invest.*, **60**, 1094.
216. Mitra S., Rao Ch. V., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 126—133.

ANNA POTEPSKA *

Biochemiczna charakterystyka neurotubuli

Biochemical Characteristics of Neurotubules

Spis Treści

- I. Wstęp
- II. Tubulina
 - II-1. Występowanie w mózgu
 - II-2. Preparatyka i oznaczanie ilościowe tubuliny
 - II-2.1. Preparatyka
 - II-2.2. Oznaczenia ilościowe
 - II-3. Budowa
 - II-4. Aktywności enzymatyczne
 - II-5. Miejsca wiążące tubuliny
- III. Białka towarzyszące
- IV. Agregacja i dezagregacja mikrotubuli
- V. Fizjologiczna rola tubuliny w mózgu

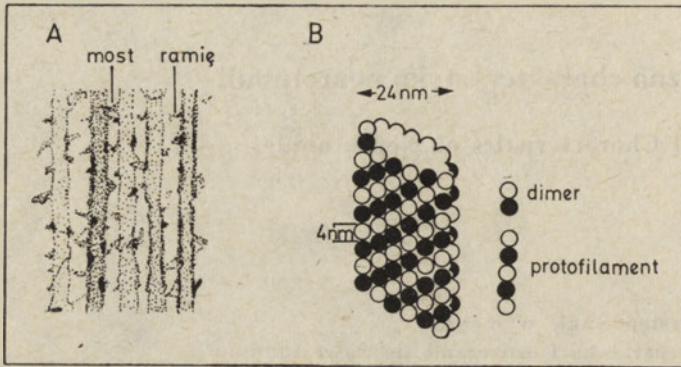
Contents

- I. Introduction
- II. Tubulin
 - II-1. Distribution in the brain
 - II-2. Isolation and estimation of tubulin content
 - II-2.1. Isolation procedures
 - II-2.2. Analytical methods
 - II-3. Structure
 - II-4. Enzymic activity
 - II-5. Binding sites on tubulin
- III. Microtubule associated proteins
- IV. Assembly and disassembly of microtubules
- V. Physiological role of tubulin in the brain

* Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

I. Wstęp

Mikrotubule są białkowymi, rurkowatymi organelami występującymi niemal we wszystkich komórkach. Powszechność ich występowania wiąże się z szeregiem funkcji jakie pełnią w komórce, np.: udział mikrotubuli w ruchu chromosomów podczas mitozy, przy różnicowaniu i zachowaniu kształtu komórek, w wewnątrzkomórkowym transporcie i zjawiskach ruchliwości komórkowej.



Ryc. 1. Budowa mikrotubuli A — schemat mikrotubuli, B — schemat podjednostkowej budowy mikrotubuli (na podstawie: 3, 9, 70).

Na schemacie nie uwzględniono białek towarzyszących.

Typowe mikrotubule, których schemat przedstawiono na Ryc. 1, są cylindrami o średnicy około 24 nm (1) i grubości ścian 4 nm. Zbudowane są one z podłużnych protofilamentów (najczęściej 13), ułożonych lewoskrętnie o skoku 10-20° (2). Protofilamenty składają się z globularnych podjednostek białkowych.

Charakterystyczną cechą mikrotubuli jest ich zdolność do agregacji i dezagregacji.

$$\text{Mikrotubule} \xrightleftharpoons[\text{agregacja}]{\text{dezagregacja}} \text{Podjednostki białkowe}$$

Procesy te zależą od szeregu czynników takich jak np. zmiany temperatury, ciśnienie hydrostatyczne.

Głównym białkiem tworzącym podjednostki jest tubulina stanowiąca około 80—90% wszystkich białek, ponadto w skład mikrotubuli wchodzi także białka towarzyszące, których część tworzy wypustki nazwane ramionami i mostami.

Mikrotubule, ich budowę, właściwości i funkcję wielokrotnie opisywano w artykułach przeglądowych (3—7) i opracowaniach monograficznych (8, 9). W literaturze polskiej brak jest jednak dotychczas biochemicznej charakterystyki neurotubuli czyli mikrotubuli neuronalnych.

II. Tubulina

II-1. Występowanie w mózgu

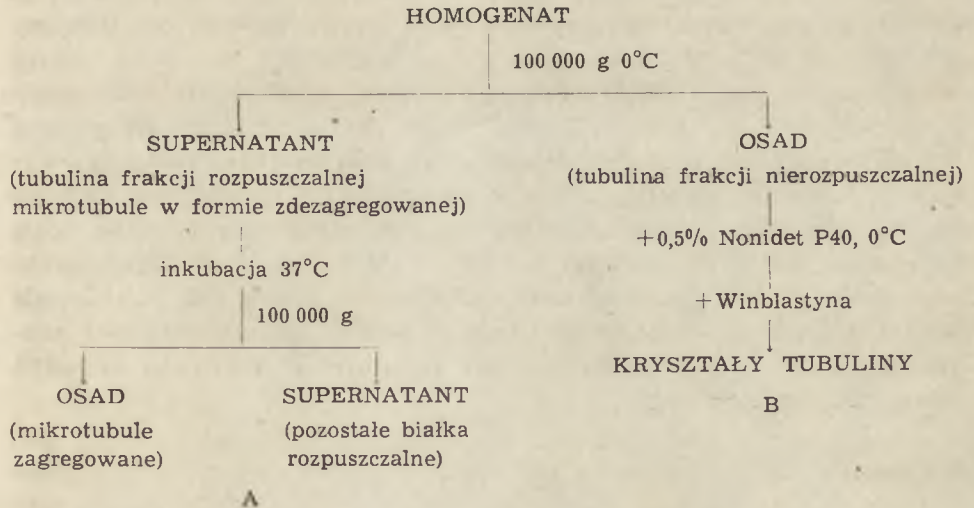
Tubulina występuje w mózgu w znacznych ilościach (dwu-, trzykrotnie wyższych niż w innych tkankach — cyt. wg. 9) stanowiąc 3—7% całkowitej ilości białek mózgu ssaków (10—12). Jej bezwzględna ilość we frakcji rozpuszczalnej i błonowej jest podobna. Procentową zawartość tubuliny we frakcji rozpuszczalnej szacuje się na 15—25% wszystkich białek tej frakcji, natomiast we frakcji błonowej zaledwie na 1,5—5% (10, 11, 13—15). Tubulina frakcji błonowej występuje głównie (70%) w zakończeniach nerwowych to jest synaptosomach, stanowiąc czwartą część wszystkich białek synaptosomalnych (16). Podobny udział tubuliny stwierdzono w białkach błon synaptoplazmatycznych — 23%, pęcherzyków synaptycznych — 19%, i synaptoplazmy — 17—28% (13, 17—19).

Rozdzielając elektroforetycznie białka oczyszczonych błon postsynaptycznych (19—22) i złącza synaptycznego (22, 23) stwierdzono, że głównym białkiem tych substruktur jest tubulina.

II-2. Preparatyka i oznaczanie ilościowe tubuliny

II-2.1. Preparatyka

Przez szereg lat nie udawało się otrzymać czystej tubuliny i w związku z tym często przypisywano tubulinie właściwości, które jak się okazało, wynikają z zanieczyszczeń.



Ryc. 2. Schemat otrzymywania mikrotubuli z frakcji rozpuszczalnej (A) i tubuliny z frakcji błonowej (B).

Tubulinę na skalę preparatywną otrzymuje się obecnie z mózgow świni lub wołu. Zasadę metody, opartą na właściwościach agregacji i dezagregacji mikrotubuli w różnych warunkach temperatury, podał Shelanski (24). Schemat metody przedstawia rycina 2A. W pierwszym etapie, dzięki kilkukrotnym cyklom agregacji i dezagregacji otrzymuje się preparat oczyszczonych mikrotubuli zawierających głównie tubulinę (80—90%) oraz białka towarzyszące. Weingarten i wsp. (15) otrzymali 75 mg białka mikrotubuli z jednego mózgu świni. Analiza sedymentacyjna wykazała, że preparaty otrzymane metodą Shelanski'ego zawierają co najmniej trzy składniki o stałych sedymentacji około: 6S (dimer tubuliny), 20S i 36S (25, 26). Te dwa ostatnie są formami oligomerycznymi występującymi jako pierścienie lub spirale (26, 27). Należy podkreślić, że stosując metodę cyklicznej agregacji i dezagregacji otrzymuje się mikrotubule występujące we frakcji rozpuszczalnej to jest supernatancie otrzymanym po wirowaniu przy 100 000g w 0°C. Natomiast tubulinę frakcji nierozpuszczalnej otrzymuje się ekstrahując błony roztworem detergentu — 0,5% Nonidet-P40 w 0°C a następnie wytrąca z ekstraktu winblastyną (28) — Ryc. 2B. Alkaloidy *Vinca*: winblastyna, winkrystyna, wytrącają wybiórczo tubulinę z roztworu (29). Procedura ta jednakże modyfikuje cząsteczkę tubuliny (por. III-4), ma więc ograniczone zastosowanie. Czystą tubulinę można otrzymać z preparatu mikrotubuli stosując chromatografię na DEAE-Sephadex lub hydroksyapatycie oraz wytrącanie siarczanem amonu (30, 31).

II-2.2. Oznaczenia ilościowe

Oznaczenia ilości tubuliny w tkance przeprowadza się w dwojaki sposób. W pierwszym wykorzystuje się ilościowe łącznie się tubuliny z kolchicyną 37°C. Nadmiar niezwiązanej kolchicyny usuwa się, sącząc badane próby przez DEAE-celulozę, do której tubulina ma silne powinowactwo (34), lub adsorbując na węglu aktywnym (12). Za pomocą tej metody można oznaczyć kilkadziesiąt mikrogramów tubuliny, wychodząc z kilkunastu miligramów świeżej tkanki. Ostatnio wprowadzono metodę radioimmunologiczną, która jest około 100 razy bardziej czuła niż metoda oparta na wiązaniu kolchicyny. Można przy jej użyciu oznaczyć jeden do kilku mikrogramów tubuliny w próbie (35, 36). Zasada metody polega na współzawodnictwie w reakcji immunologicznej między radioaktywnym [¹²⁵J] standardem tubuliny a dodawaną nieznaną ilością tubuliny.

II-3. Budowa

Ze względu na duży udział procentowy tubuliny w białkach frakcji rozpuszczalnej homogenatów tkanki mózgowej (por. II-1) i dobrze opra-

cowaną metodę jej otrzymania (por. II) większość badań dotyczących struktury i właściwości tego białka przeprowadzono stosując tubulinę wyizolowaną z frakcji rozpuszczalnej. W budowie i właściwościach tubuliny frakcji błonowej i rozpuszczalnej stwierdzono jedynie niewielkie różnice (28, 37).

Tubulina jest białkiem o ciężarze 110—120 tys. i stałej sedymentacji $S_{2,wo}^0 = 5,8 S$ (38—40). Jej cząsteczka ma kształt elipsoidalny o stosunku średnic 5:7. Badano trzeciorzędową strukturę tubuliny z mózgu świni przy zastosowaniu analizy dichroizmu kołowego i stwierdzono, że w temperaturze 4°C i w pH = 6,5 ma ona strukturę α -heliksu w 22%, typu β w 30% i kłębka statystycznego w 48%. W temperaturze 37°C następuje całkowita utrata struktury α -heliksu (41). Tubulina jest białkiem kwaśnym o pI w granicach 5,2—5,4. Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym cząsteczka tubuliny rozdziela się na dwie podjednostki α i β o ciężarze około 53 000—56 000 występujące w stosunku 1:1 (30, 31, 42—45). Prążek β migruje nieco szybciej w kierunku do anody niż α . Bardziej czułe metody, elektroforeza dwukierunkowa połączona z izoelektroogniskowaniem wykazały mikroheterogenność obu prążków (31, 45—46). Podjednostka α ma 4 formy o takiej samej masie różniące się punktem izoelektrycznym, a podjednostka β — 5 form (46). Skład aminokwasowy obu podjednostek jest bardzo podobny lecz nie identyczny (31, 48—52). Każdy z łańcuchów zawiera ponad 500 reszt aminokwasowych. W obu podjednostkach przeważają reszty kwasu glutaminowego i asparaginowego (odpowiednio około 130 i 100 reszt na dimer tubuliny). Aminokwasem N-końcowym jest w obu podjednostkach metionina (42). Łańcuch α tubuliny frakcji rozpuszczalnej ma na C-końcu tyrozynę. Aminokwas ten nie występuje na C-końcu podjednostki α tubuliny frakcji błonowej (28). Nie stwierdzono obecności mostków dwusiarczkowych (42), wykazano natomiast występowanie 16 grup -SH na cząsteczkę dimeru (52). Nieznaczące różnice stwierdzono w składzie peptydowym podjednostek α i β po trawieniu ich trypsyną (13, 51, 53).

Pomimo, że niektórzy badacze (53) stwierdzili w tubulinie znaczną zawartość aminocukrów, w świetle ostatnich badań, wydaje się, że nie zawiera ona reszt aminocukrów a jedynie nieznaczące ilości (około 1 mola na dimer) cukrów obojętnych (49). Prawdopodobnie uprzednie wyniki były następstwem niedostatecznego oczyszczania preparatów tubuliny.

II-4. Aktywności enzymatyczne

Ze względu na trudności z otrzymaniem czystej tubuliny, przypisywano jej często aktywności enzymatyczne znajdujące w preparatach mikrotubuli, a związane z innymi białkami. Najwięcej uwagi poświęcono kinazie białkowej wprowadzającej resztę fosforanową do podjednostki β . Początkowo sądzono, że tubulina pełni funkcję tego enzymu (54). Wnikliwe badania nie potwierdziły jednak tego przypuszczenia (55). Stwier-

dzono bowiem, że kinaza adsorbuje się na cząsteczce tubuliny i jej aktywność można oddzielić od tubuliny w procesie wielokrotnego oczyszczania. Fosforylacji ulega jedna reszta seryny z podjednostki β wówczas gdy tubulina jest w formie dimeru (55—57). Reakcję tę stymulują cykliczne nukleotydy i jony Zn^{2+} (56, 58, 59). Należy zaznaczyć, że fosforylacji ulegają również białka towarzyszące (56, 60).

W preparatach oczyszczonych mikrotubuli znaleziono aktywność enzymu wbudowującego tyrozynę w pozycję C-końcową podjednostki α bez udziału t-RNA (61—63). Aktywność tego enzymu zmienia się z wiekiem zwierząt (63), nie wiadomo jednak, jaka jest jego rola fizjologiczna. Nie ma również danych wskazujących, że oczyszczona tubulina wykazuje aktywność tego enzymu.

Ostatnio przypisuje się tubulinie aktywność ATPazy (64) i GTPazy (65).

II-5. Miejsca wiążące tubuliny

Wykazano, że tubulina ma zdolność wiązania nukleotydów, alkaloidów i wapnia. Każdy dimer tubuliny ma dwa miejsca wiążące nukleotydy guaninowe, jedno — wiążące kolchicynę i podofilinę, jedno — wiążące alkaloidy *Vinca* oraz szereg miejsc wiążących wapń.

Nukleotydy

Charakterystyka miejsc wiążących nukleotydy guaninowe wykazała, że jedno z nich (N) wiąże cząsteczkę nukleotydu trwale, natomiast nukleotyd związany w miejscu (E) łatwo ulega wymianie z nukleotydami znajdującymi się w środowisku (39, 66, 67). Stwierdzono, że łączenie nukleotydów wymaga obecności jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} oraz wolnych grup -SH tubuliny (68). Stałe dysocjacji kompleksu tubulina-nukleotyd wynoszą $0,5 \times 10^{-6}$ M dla GTP i $1,9 \times 10^{-6}$ M dla GDP (68).

Kolchicyna

Tubulina mózgowa, podobnie jak tubulina z innych tkanek wiąże ilościowo kolchicynę w stosunku 1 mol kolchicyny na 1 mol dimeru tubuliny (39). Optymalne warunki tej reakcji to pH = 6,7—6,8 (40), temperatura 37°C (37). Wiązanie zachodzi powoli i w czasie reakcji część cząsteczek tubuliny denaturuje (69). Stała asocjacji (in vitro) kompleksu tubulina-kolchicyna wynosi $0,4 \times 10^{-6}$ M (70), a okres półtrwania 36 godzin (69). Stabilność kompleksu wzrasta wraz ze wzrostem siły jonowej

(40). Czynniki denaturujące (mocznik, etanol, aceton, kwas nadchlorowy) uniemożliwiają łączenie się tubuliny z kolchicyną. Inny alkaloid, podofilina współzawodniczy z kolchicyną o miejsce wiązania. Alkaloidy Vinca stabilizują kompleks tubulina—kolchicyna, nie wpływają jednak na szybkość reakcji wiązania (37, 40). Kinetyka reakcji wiązania kolchicyny z tubuliną występująca we frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej homogenatów tkanki mózgowej różnią się. Okres półtrwania kompleksu kolchicyny z tubuliną frakcji nierozpuszczalnej jest dwukrotnie dłuższy (37).

Alkaloidy Vinca

Winblastyna (VBL) i winkrystyna (VCR) w stężeniu 10^{-5} — 10^{-8} M wytrącają tubulinę z roztworu w postaci kryształów (71, 72). Kryształy te zawierają równą ilość tubuliny α i β (29). Uważa się, że precypitacja wywołana winblastyną polega na uwolnieniu z cząsteczki tubuliny trwale związanego GTP z miejsca N, co zmienia konformację tubuliny (66).

Wapń

Wnikliwe badania nad wiązaniem wapnia przez tubulinę (73) wykazały występowanie dwóch rodzajów miejsc wiążących: o wysokim i niskim powinowactwie do wapnia. Dimer tubuliny zawiera jedno miejsce o wysokim powinowactwie do Ca^{2+} (stała dysocjacji wynosi $3,2 \times 10^{-6}$ M) i 16 miejsc o niskim powinowactwie do Ca^{2+} (stała dysocjacji równa się $2,8 \times 10^{-4}$ M).

III. Białka towarzyszące

Jak wspomniano uprzednio kilkanaście procent białek mikrotubuli stanowią tzw. białka towarzyszące. Nie można ich oddzielić od tubuliny w procesie oczyszczania mikrotubuli. Rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym wykazał obecność szeregu białek o ciężarze cząsteczkowym w granicach 270 000—370 000; są to tzw. białka HMW (*High Molecular Weight*) (33) oraz białka niskocząsteczkowego nazwanego przez Weingartena (74) białkiem τ . Brak jest dotychczas dokładnych danych na temat liczby białek HMW i ich ciężarze cząsteczkowym. Dane przedstawiane przez poszczególne pracownie różnią się dość znacznie w zależności od stosowanej metody oczyszczania mikrotubuli i rodzaju elektroforezy (67, 75—77). Sugeruje się, że białka HMW tworzą boczne wypustki, „1a-miona” mikrotubuli (76, 78—81, Ryc. 1).

Białko τ ma ciężar 55 000—70 000 (3, 25, 74, 82) i współczynnik sedymentacji, oznaczony metodą analitycznego ultrawiwrowania — $S_{20}^0 = 2,6 S$ (32, 83). Świadczy to, że cząsteczka białka τ wykazuje znaczną asymetrię (stosunek średnic 20:1). Badania przy zastosowaniu dichroizmu kołowego wykazały małą zawartość struktury α -heliksu. Podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w połączeniu z izoelektroogniskowaniem białko to rozdziela się na 4 prążki o ciężarze 62 000, 58 000, 56 000 i 55 000. Punkt izoelektryczny dwóch cięższych składników leży w granicach 6,5—7,7, a lżejszych — 7,4–8,0 (83).

Białko τ jest odporne na 5-minutowe ogrzewanie w 100°C (74). Stwierdzono, że białko to, podobnie jak białka HMW, ulega fosforylacji (60, 83). Stosując metody immunologiczne (84) wykluczono wcześniejsze przypuszczenie (81), iż białko to jest produktem degradacji białek HMW.

Ostatnio stwierdzono metodami immunofluorescencyjnymi, że w nie naruszonych komórkach zarówno białka HMW jak i białko τ , są związane z tubuliną (84). Można więc powiedzieć, że kompleks tubuliny z białkami towarzyszącymi jest kompleksem natywnym (analogicznie do kompleksu DNA z białkami w chromatynie).

IV. Agregacja i dezagregacja mikrotubuli

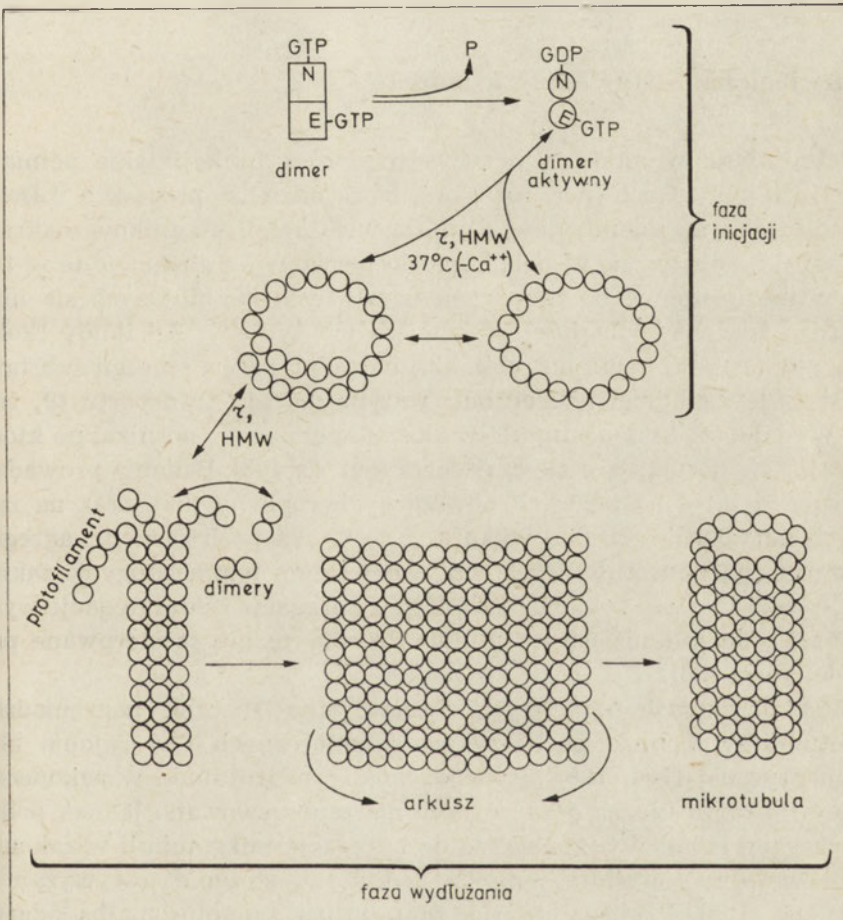
Tworzenie długich, cylindrycznych struktur z dimerów tubuliny jest przedmiotem wielu prac ostatnich lat. Badania, prowadzone głównie *in vitro*, mają na celu określenie optymalnych warunków, mechanizmu i czynników regulujących procesy agregacji i dezagregacji. Zjawiska te mają zasadnicze znaczenie dla wyjaśnienia funkcji mikrotubuli w komórce.

Optymalne warunki agregacji mikrotubuli *in vitro* to: temperatura 37°C (26, 85), stężenie tubuliny około 1 mg/ml (86), obecność GTP (24, 87—89), brak jonów Ca^{2+} (26, 90), pH w granicach 6,8—6,9 (9), obecność białek towarzyszących (74, 83, 91). Stwierdzono, że agregację ułatwiają: czynnik wzrostowy nerwów — NGF (92), polikationy (93) i glicerol (24).

Czynnikami hamującymi agregację są polianiony, np. RNA (94, 95), alkaloidy Vinca i kolchicyna (6). W nieobecności białek towarzyszących i w wyższym stężeniu tubuliny — 2,5 mg/ml (85) agregacja zachodzi, jednak niecałkowicie. Powstałe wówczas mikrotubulne mają gładkie powierzchnie — bez wypustek (78, 79, 81).

W świetle najnowszych badań można zaproponować następujący schemat agregacji (Ryc. 3). W procesie agregacji można wyróżnić dwie fazy: inicjacji i wydłużania mikrotubuli. Pierwszym etapem inicjacji jest utworzenie „aktywnego” dimeru tubuliny, co wymaga udziału nukleotydów guaninowych. Stwierdzono, że warunkiem niezbędnym do inicjacji jest związanie GTP w miejscu E i następnie hydroliza GTP do GDP i P_i (82).

Cząsteczka tubuliny zyskuje wtedy konformację sprzyjającą agregacji. Aktywny dimer może agregować tworząc formy oligomeryczne: pierścienie i spirale, które są ze sobą w równowadze. Do tworzenia form oligomerycznych niezbędne są, jak to omówiono wyżej, białka towarzyszące (27, 70, 80, 96). Obecność białka τ umożliwia tworzenie się pojedynczego pierścienia, a białka HMW — podwójnego (27). Przypuszcza się, że formy oligomeryczne pełnią rolę ośrodków nukleacji w procesie agregacji mikrotubuli (97). Należy zaznaczyć, że często ośrodkami nukleacji są również organelle komórkowe — centriole, ciała podstawowe lub fragmenty mikrotubuli.



Ryc. 3. Schemat powstawania mikrotubuli (na podstawie: 9, 26, 70, 96).

Powyższe procesy należą do fazy inicjacji. W fazie wydłużania z form oligomerycznych powstają krótkie protofilamenty, do których dołączają się kolejne cząsteczki dimeru tubuliny tworząc, dzięki wiązaniom bocznym i podłużnym, płaskie struktury — arkusze oraz rurkowate mikrotu-

bule. Wydaje się, że nukleotyd z miejsca N bierze udział w tworzeniu wiązań podłużnych, zaś z miejsca E — bocznych (66).

Badania prowadzone *in vitro* wykazały złożony mechanizm regulacji procesów agregacji i dezagregacji. Do głównych czynników regulujących zalicza się stężenie jonów Ca^{2+} , ilość białek towarzyszących, obecność nukleotydów guaninowych, przede wszystkim — GTP oraz temperaturę. Trudno jest na razie określić, które z tych czynników pełnią zasadniczą rolę w procesach agregacji i dezagregacji *in vivo*. Istnieją dane wskazujące na regulacyjne działanie temperatury w tych zjawiskach (98, 99), nie wyklucza się również udziału jonów Ca^{2+} (17).

V. Fizjologiczna rola tubuliny w mózgu

Mikrotubule w układzie nerwowym oprócz funkcji jakie pełnią we wszystkich komórkach (por. rozdz. I.), biorą udział w procesach transportu wzdłuż aksonu i dendrytów. Synteza większości składników makromolekularnych odbywa się w ciele komórki nerwowej. Substancje te są transportowane następnie do zakończeń nerwowych znajdujących się nieraz w bardzo znacznej odległości od miejsca ich syntezy. Alkaloidy (kolchicina, winblastyna) hamują szybki aksonalny przepływ szeregu substancji, co wskazuje na udział neurotubuli w tym rodzaju transportu (9, 100—102). Wydaje się, że neurotubule w aksonie pełnią rolę nośnika, po którym „ślizgają” się poruszające się cząsteczki (cyt. za 103). Badania prowadzone *in vivo* i *in vitro* na nerwach obwodowych ropuchy (98), oraz na izolowanych nerwach kraba (99) wykazały, że w aksonach zachodzi agregacja i dezagregacja neurotubuli pod wpływem zmian temperatury w zakresie $+2^{\circ}\text{C}$ — $+25^{\circ}\text{C}$. Czas trwania kompletnej agregacji i dezagregacji wynosi kilkanaście do kilkudziesięciu minut. Procesy te nie są sterowane przez ciało komórki (98).

W zakończeniach nerwowych obserwowano znaczne nagromadzenie mikrotubuli w pobliżu pęcherzyków synaptycznych i w rejonie błony presynaptycznej (104, 105). Stwierdzono, że neurotubule w zakończeniu nerwowym mogą ulegać dezagregacji, nie zaobserwowano jednak ponownej agregacji (106). Wydaje się, że dezagregację mikrotubuli w zakończeniu nerwowym powodują jony Ca^{2+} , których stężenie jest wyższe niż w aksonie (106). Przypuszcza się, że tubulina synaptosomalna odgrywa rolę przy wydzielaniu neurotransmiterów: noradrenaliny i serotoniny (107, 108). Stwierdzono ponadto hamujący wpływ alkaloidów na pobieranie i wydzielanie z synaptosomów kwasu γ -aminomasłowego (GABA), noradrenaliny i dopaminy (109). Postuluje się, że tubulina może być czynnikiem regulującym neurotransmisję dzięki zmianom swoich własności w zależności od stężenia Ca^{2+} (17).

Kolejnym, mało poznanym zagadnieniem jest rola tubuliny związanej z błonami zakończeń nerwowych, w których tubulina występuje w znacznych ilościach (por. II-1.). Przypuszcza się, że jest ona białkiem strukturalnym i stanowi szkielet, w którym umieszczone są inne białka (32, 36).

Ilość tubuliny w mózgu, szybkość jej syntezy oraz zdolność do agregacji zmieniają się podczas rozwoju oraz w różnych warunkach fizjologicznych. Jest to białko o okresie półtrwania wynoszącym kilka dni (110, 111). Stężenie tubuliny w mózgu różnych zwierząt oraz szybkość syntezy tego białka osiągają maksimum w krótkim czasie po urodzeniu, po czym wartości te spadają osiągając poziom charakterystyczny dla zwierząt dorosłych (11, 14, 110, 112, 113). Dokładne badania zmian ilości tubuliny podczas rozwoju kurczęcia przeprowadził B a m b u r g (112, Tabela 1). Trudno jest natomiast interpretować rozbieżne wyniki dotyczące zmian zdolności tubuliny do agregacji (por. 113 z 114, 115).

Tabela 1

Porównanie zmian ilości tubuliny we frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej ze zmianami ilości białka w tych frakcjach podczas rozwoju mózgu kurczęcia

Czas inkubacji jaja (dni)	Frakcja rozpuszczalna (A)		Frakcja nierozpuszczalna (B)	
	białko A %	tubulina A %	białko B %	tubulina B %
	białko całkow.	białko całkow.	białko całkow.	białko całkow.
5	—	10.5	—	0
7	58	15.7	42	0
9	54	22.5	46	0.5
11	56	22.1	42	—
13	56	23.2	44	0.9
15	46	22.8	54	—
17	50	21.5	50	1.8
19	46	—	54	—
22 ^a	48	15.1	52	—
28—29	42	14.1	58	3.2
200 ^b	37	9.4	63	2.2

—, brak danych; a, wyklucie się kurczęcia; b, osobniki dorosłe
Dane wybrane ze 112

Wydaje się, że zmiany ilości tubuliny w poszczególnych częściach mózgu wiążą się z przejmowaniem funkcji przez daną strukturę. Na przykład stężenie i szybkość syntezy tubuliny w korze wzrokowej szczurów jest największa w ciągu kilku dni po otwarciu oczu (116, 117). Zjawiska tego nie obserwowano w przypadku szczurów hodowanych w ciemności. Natomiast wystawienie na światło szczurów hodowanych przez 25—50 dni od urodzenia w ciemności, powoduje wzrost ilości i szybkości syntezy tubuliny (117—120). Obserwowano również wzrost ilości tubuliny w ko-

rze wzrokowej kotów w podobnych warunkach doświadczalnych (A. Potempska — nieopublikowane). Na podstawie hamującego wpływu kolchicyny na proces trwałego zapamiętywania wyuczonego zadania postulowano, że tubulina może być chemicznym podłożem pamięci (100). Wydaje się jednak, że na obecnym etapie wiedzy nie można jeszcze wyciągać tak daleko idących wniosków. Hipoteza ta wskazuje w jakim kierunku mogą się rozwijać badania nad rolą tubuliny w układzie nerwowym.

Zaakceptowano do druku 22.03.1979

PIŚMIENICTWO

1. Bryan J., (1974), *Bioscience*, **24**, 701—711.
2. Burton P. R., (1966), *J. Morphol.*, **120**, 397—424.
3. Gaskin F., Shelanski M. L., (1976), *Assays in Biochemistry*, **12**, 115—146.
4. Kwiatkowska M., (1974), *Post. Biol. Kom.*, **1**, 237—253.
5. Kwiatkowska M., (1974), *Post. Biol. Kom.*, **1**, 255—275.
6. Olmsted J. B., Borisy G. G., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 507—540.
7. Snyder J. A., McIntosh J. R., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 699—720.
8. Borgers M., De Brabander M., (1975), „Microtubules and Microtubule Inhibitors”, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
9. Dustin P., (1978), „Microtubules”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
10. Gozales L. W., Geel S. E., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 237—245.
11. Schmitt H., Gozes I., Littauer U. Z., (1977), *Brain Res.*, **121**, 327—342.
12. Sherline P., Bodwin C. K., Kipnis D. M., (1974), *Anal. Biochem.*, **62**, 400—407.
13. Feit H., Dutton G. R., Barondes S. H., Shelanski M. L., (1971), *J. Cell Biol.*, **51**, 138—147.
14. Nunez J., Fellous A., Francon J., Lennon A.-M., (1975), w „Microtubules and Microtubule Inhibitors” red. Borgers M., De Brabander M., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, str. 269—279.
15. Weingarten M. D., Suter M. M., Littman D. R., Kirschner M. W., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5529—5537.
16. Lagnado J. R., Lyons C., Wickremasinghe G., (1971), *FEBS Letters*, **15**, 254—258.
17. Blitz A. L., Fine R. E., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **71**, 4472—4476.
18. Feit H., Barondes S., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1355—1364.
19. Walters B. B., Matus A. I., (1975), *Nature*, **257**, 496—498.
20. Banker G., Churchill L., Cotman C. W., (1974), *J. Cell Biol.*, **63**, 456—465.
21. Feit H., Kelly P., Cotman C. W., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 1047—1051.
22. Kelly P. T., Cotman C. W., (1978), *J. Cell Biol.*, **79**, 173—183.
23. Walters B. B., Matus A. I., (1975), *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 109—112.
24. Shelanski M. L., Gaskin F., Cantor Ch. R., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 765—768.

25. Doegnes K. H., Biedert S., Paweletz N., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2995—2999.
26. Kirschner M. W., Williams R. C., Weingarten M., Gerhart J. C., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **71**, 1159—1163.
27. Vallee R. B., Borisy G. G., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2834—2845.
28. Nath J., Flavín M., (1978), *FEBS Letters*, **95**, 335—338.
29. Bryan J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **66**, 157—168.
30. Lee J. C., Frigon R. P., Timasheff S. N., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 7253—7262.
31. Lu R. C., Elzinga M., (1977), *Anal. Biochem.*, **77**, 243—250.
32. Cleveland D. V., Hwo S.-Y., Kirschner M. W., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 207—225.
33. Kuznetsov S. A., Rodionov V. I., Gelfand V. I., Rosenblat V. A., (1978), *FEBS Letters*, **95**, 339—342.
34. Borisy G. G., (1972), *Anal. Biochem.*, **50**, 373—385.
35. Joniau M., De Brabander M., De Mey J., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1118—1119.
36. Morgan J. L., Rodkey L. S., Spooner B. S., (1977), *Science*, **197**, 578—580.
37. Lagnado J. R., Lyons C. A., (1972), *Biochem. J.*, **126**, 9P—10P.
38. Shelanski M. L., Taylor E. W., (1968), *J. Cell Biol.*, **38**, 304—315.
39. Weisenberg R. C., Borisy G. G., Taylor E. W., (1968), *Biochemistry*, **7**, 4466—4479.
40. Wilson L., (1970), *Biochemistry*, **9**, 4999—5007.
41. Ventilla M., Cantor Ch. R., Shelanski M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 1554—1561.
42. Eipper B. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1407—1416.
43. El-Hamalawi A.-R.A., (1978), *Biochem. J.*, **169**, 717—719.
44. Feit H., Slusarek L., Shelanski M., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **68**, 2028—2031.
45. Olmsted J. B., Witman G. B., Carlson K., Rosenbaum J. L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **68**, 2273—2277.
46. Gozes I., Littauer U. Z., (1978), *Nature*, **273**, 411—413.
47. Marotta Ch. A., Harris J. L., Gilbert J. M., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 1431—1440.
48. Bryan J., Wilson L., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **68**, 1762—1766.
49. Eipper B. A., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 2283—2287.
50. Feit H., Neudeck U., Gaskin F., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 697—706.
51. Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Wisniewski H. M., Terry R. D., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 417—424.
52. Luduena R. F., Woodward D. O., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **70**, 3594—3598.
53. Margolis R. K., Margolis R. U., Shelanski M. L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 432—437.
54. Soifer D., Laszlo A. H., Scotto J. M., (1972), *Biochim. Biophys. Acta*, **271**, 182—192.
55. Eipper B. A., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 1398—1406.
56. Larsson H., Edström A., Wallin M., (1977), *J. Neurochem.*, **29**, 115—120.
57. Reddington M., Lagnado J. R., (1973), *FEBS Letters*, **30**, 188—194.
58. Goodman D. B. P., Rasmunssen H., DiBella F., Earl Guthrow C., Jr., (1970), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **67**, 625—659.

59. Lagnado J. R., Lyons C. A., Weller W., Phillipson O., (1972), *Biochem. J.*, **128**, 95P.
60. Lagnado J. R., Kirazov E. P., (1975), w „Microtubules and Microtubule Inhibitors” red. Borgers M., De Brabander M., Nort-Holland Publishing Company, Amsterdam, str. 124—140.
61. Arce C. A., Hallak M. E., Rodriguez J. A., Barra H. S., Caputo R., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 205—210.
62. Argaraña C. E., Arce C. A., Barra H. S., Caputto R., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 264—268.
63. Deanin G. G., Thompson W. C., Gordon M. W., (1977), *Develop. Biol.*, **57**, 230—233.
64. Gelfand V. I., Goyeva F. K., Rosenblat V. A., Shanina N. A., (1978), *FEBS Letters*, **88**, 197—200.
65. David-Pfeuty T., Laporte J., Panzalani D., (1978), *Nature*, **272**, 282—284.
66. Berry R. W., Shelanski M. L., (1972), *J. Mol. Biol.*, **71**, 71—80.
67. Borisy G. G., Marcum J. M., Olmsted J. B., Murphy D. B., Johnson K. A., (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **253**, 107—132.
68. Arai T., Ihara Y., Arai K., Kaziro Y., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 647—658.
69. Garland D., Teller D. C., (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **253**, 232—238.
70. Borisy G. G., Johnson K. A., Marcum J. M., (1976), w „Cell Motility” red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Laboratory, str. 1093—1108.
71. Bensch K. G., Marantz R., Wisniewski H., Shelanski M. L., (1969), *Science*, **165**, 495—496.
72. Marantz R., Ventilla M., Shelanski M., (1969), *Science*, **165**, 498—499.
73. Solomon F., (1977), *Biochemistry*, **16**, 358—363.
74. Weingarten M. D., Lockwood A. H., Hwo S.-Y., Kirschner M. W., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 1858—1862.
75. Delacourte A., Plancot M.-T., Han K.-K., Hildebrand H., Biserete G., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 41—46.
76. Gaskin F., Kramer S. B., Cantor C. R., Adelstein R., Shelanski M. L., (1974), *FEBS Letters*, **40**, 281—286.
77. Sandoval I. V., Cuatrecasas P., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 169—177.
78. Dentler W. L., Granett S., Rosenbaum J. L., (1975), *J. Cell Biol.*, **65**, 237—241.
79. Murphy D. B., Borisy G. G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2696—2700.
80. Sloboda R. D., Dentler W. L., Bloodgood R. A., Telzer B. R., Granett S., Rosenbaum J. L., (1976), w „Cell Motility” red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Laboratory, str. 1171—1212.
81. Sloboda R. D., Dentler W. L., Rosenbaum J. L., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4497—4505.
82. Delacourte A., Plancot M.-T., Bouteau F., Han K.-K., Hildebrand H. F., Biserete G., (1977), *Biochimie*, **59**, 479—486.
83. Cleveland D. W., Hwo S.-Y., Kirschner M. W., (1977), *J. Mol. Biol.*, **116**, 227—247.
84. Conolly J. A., Kalnis U. I., Cleveland D. W., Kirschner M. W., (1978), *J. Cell Biol.*, **76**, 781—786.

85. Gaskin F., Cantor C. R., Shelanski M. L., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 737—758.
86. Olmsted J. B., Marcum J. M., Johnson K. A., Allen C., Borisy G. G., (1974), *J. Supramol. Struct.*, **2**, 429—450.
87. Arai T., Kaziro Y., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 1063—1071.
88. Sandoval I. V., Jameson J. L., Niedel J., MacDonald E., Cuatrecasas P., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **75**, 3178—3182.
89. Sandoval I. V., MacDonald E., Jameson J. L., Cuatrecasas P., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 4881—4885.
90. Weisenberg R. C., (1972), *Science*, **177**, 1104—1105.
91. Fellous A., Francon J., Lennon A.-M., Nunez J., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 167—174.
92. Menesini M. G., Chen J. S., Calissano P., Levi-Montalcini R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **74**, 5559—5563.
93. Kuznetsov S. A., Gelfand V. I., Rodinov V. I., Rosenblat V. A., Gulyaeva V. A., (1978), *FEBS Letters*, **95**, 343—346.
94. Bryan J., Nagle B. W., (1975), w „Microtubules and Microtubule Inhibitors”, red. Borgers M., De Brabander M., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, str. 91—101.
95. Nagle B. W., Bryan J., (1976), w „Cell Motility” red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Laboratory, str. 1213—1232.
96. Penningroth S. M., Cleveland D. W., Kirschner M. W., (1976), w „Cell Motility” red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Laboratory, str. 1233—1257.
97. Borisy G. G., Olmsted J. B., (1972), *Science*, **177**, 1196—1197.
98. Echandia E. L. R., Piezzi R. S., (1968), *J. Cell Biol.*, **39**, 495—497.
99. Rome-Talbot D., Andre D., Chalazonitis N., (1978), *J. Neurobiol.*, **9**, 247—254.
100. Cronly-Dillon J., Carden D., Birks C., (1974), *J. Exp. Biol.*, **61**, 443—454.
101. McClure W. O., (1972), *Advanc. Pharmacol. Chemother.*, **10**, 185—220.
102. Paulson J. C., McClure W. O., (1974), *Brain Res.*, **73**, 333—337.
103. Lubińska L., (1975), *Int. Rev. Neurobiol.*, **17**, 241—296.
104. Gray E. G., (1976), *J. Neucytol.*, **5**, 361—370.
105. Gray E. G., (1975), *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **190**, 369—372.
106. Lasek R. J., Hoffman P. N., (1976), w „Cell Motility” red. Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., Cold Spring Harbor Laboratory, str. 1021—1049.
107. Segawa T., Murakami H., Inouye A., Tanaka Y., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 175—180.
108. Thoa N. B., Wooten G. F., Axelrod J., Kopin I. J., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **69**, 520—522.
109. Nicklas W. J., Puszkin S., Berl S., (1973), *J. Neurochem.*, **20**, 109—121.
110. Dutton G. R., Barondes S., (1969), *Science*, **166**, 1637—1638.
111. Forgue S. T., Dahl J. L., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 1289—1297
112. Bamburg J. R., Shooter E. M., Wilson L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 1476—1482.
113. Koehn J. A., Olsen R. W., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **186**, 114—120.
114. Francon J., Fellous A., Lennon A.-M., Nunez J., (1977), *Nature*, **266**, 188—189.
115. Francon J., Fellous A., Lennon A.-M., Nunez J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **85**, 43—53.
116. Cronly-Dillon J. R., Perry G. W., (1976), *Nature*, **261**, 581—583.

117. Perry G. W., Cronly-Dillon J. R., (1978), *Brain Res.*, **142**, 374—378.
118. Rose S. P. R., Sinha A. K., Jones-Lecointe A., (1976), *FEBS Letters*, **65**, 135—139.
119. Stewart M. G., Rose S. P. R., Hedges T., (1977), 6th ISN Meeting, Abstracts, str. 364.
120. Stewart M. G., Rose S. P. R., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 595—599.

JOLANTA UŁAS*

Metody rozdzielania komórek neuronalnych i glejowych: ich wykorzystanie w badaniach biochemicznych

Methods of Separation of Neuronal and Glial Cells: their Application for Biochemical Investigation

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Rozdział neuronów i komórek glejowych za pomocą wirowania w gradiencie stężeń**
 - II-1. Rozdrabnianie tkanki mózgowej**
 - II-2. Płyny dezintegrujące**
 - II-3. Wirowanie**
- III. Ocena metod rozdzielania neuronów i gleju**
 - III-1. Wydajność**
 - III-2. Czystość otrzymywanych frakcji komórkowych**
 - III-3. Wygląd otrzymywanych komórek i ocena ich właściwości metabolicznych**
- IV. Niektóre właściwości biochemiczne frakcji neuronalnej i glejowej**
- V. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Separation of neuronal and glial cells by gradient centrifugation**
 - II-1. Mechanical preparation of the brain tissue**
 - II-2. Desintegration media**
 - II-3. Centrifugation**
- III. Evaluation of the methods of separation of neurons and glia**
 - III-1. Yield**
 - III-2. Purity of isolated neuronal and glial cells fractions**
 - III-3. Morphology of isolated cells and the evaluation of their metabolic properties**
- IV. Some biochemical properties of neuronal and glial cells fractions**
- V. Concluding remarks**

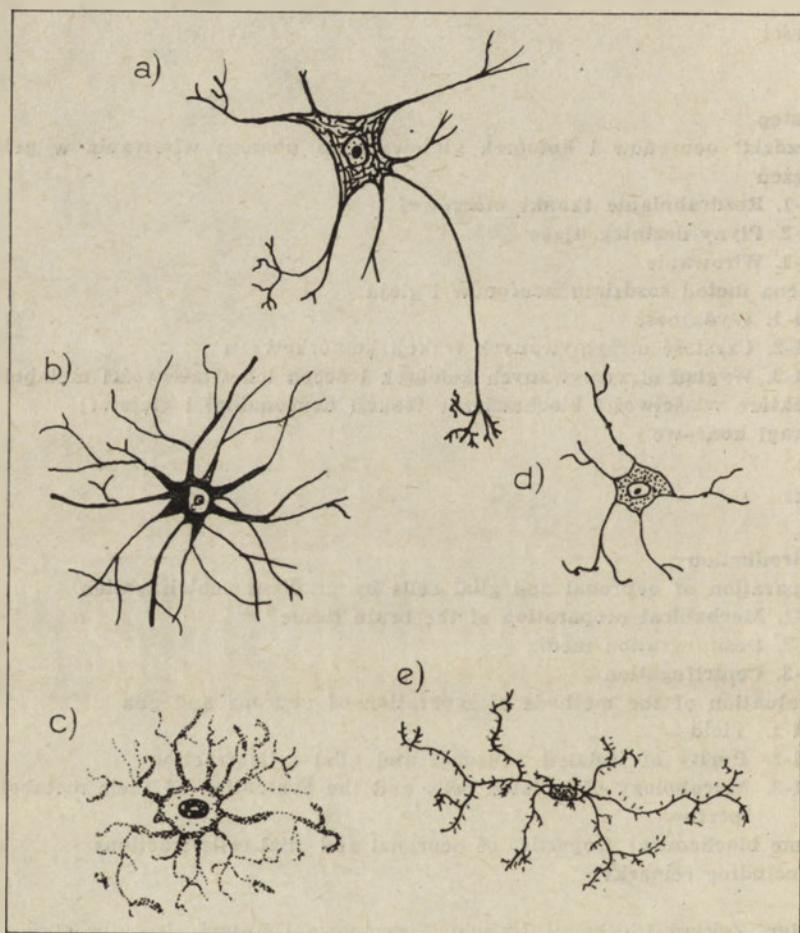
* Mgr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Wykaz stosowanych skrótów: PVP — poliwinylpiperolidon; BSA — albumina z surowicy wołu; GABA — kwas γ -aminomasłowy; AChE — acetylocholinoesteraza

I. Wstęp

Ze względu na morfologiczne zróżnicowanie mózgu poznanie biochemicznych właściwości poszczególnych typów komórek stało się jednym z istotnych problemów dynamicznie rozwijającej się neurochemii. W ciągu ostatnich piętnastu lat ukazało się wiele prac, w których podjęto próby rozdzielenia komórek nerwowych i glejowych. Niniejszy artykuł stanowi przegląd stosowanych metod rozdziału tych komórek z uwzględnieniem ich przydatności do badań biochemicznych.

Skład komórkowy mózgu jest heterogenny. W mózgu występują neurony, komórki glejowe (astrocyty, komórki oligodendrogleju i mikrogleju), komórki ependymy oraz komórki śródbłonkowe naczyń włosowatych (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat niektórych typów komórek występujących w mózgu
 a — komórka nerwowa; b — astrocyt włóknisty; c — astrocyt plazmatyczny; d — komórka oligodendrogleju; e — komórka mikrogleju.

O komórkach glejowych i neuronach, strukturalnych jednostkach ośrodkowego układu nerwowego, wiemy już dość dużo. Opisano ich budowę morfologiczną i subkomórkową oraz embriogenezę. Wzajemne oddziaływania i zależności pomiędzy tymi typami komórek są natomiast jeszcze niejasne i wymagają dalszych badań.

Wiadomo, że neurony w ciągu długiej ewolucji wyspecjalizowały się jeśli chodzi o odbieranie, przewodzenie i przekształcanie impulsów nerwowych. Komórki glejowe spełniają rolę komórek wspomagających, tj. komórek podporowych, odżywiających, oczyszczających i ochraniających neurony. Przemawia za tym zarówno ukształtowanie gleju, ułatwiające jego kontakty z naczyniami krwionośnymi i z neuronami, jak i zachowanie się komórek glejowych w wypadkach uszkodzenia tkanki mózgowej. Wiadomo np., że astrocyty zmieniają wtedy swój wygląd, mnożą się i usuwają szczątki zniszczonej tkanki w drodze fagocytozy oraz wypełniają ubytki neuronalne glejową blizną. Komórki glejowe, w przeciwieństwie do neuronów, zachowują bowiem zdolność podziału w ciągu całego życia zwierzęcia a zwiększanie się liczby komórek glejowych jest jak sugerują niektórzy autorzy (1) odbiciem procesów kompensacyjnych mózgu związanych z utratą neuronów lub zmianą ich funkcjonalnych właściwości. Przypuszcza się też, że komórki glejowe oprócz tego, że uczestniczą w regulacji mikrośrodowiska wokół neuronów, mogą brać także udział w wychwytywaniu neuromediatora ułatwiając jego inaktywację (1). W dorosłym i starzejącym się organizmie komórki glejowe stanowią główny komórkowy składnik mózgu i mogą jak się przypuszcza odgrywać pewną rolę, oprócz komórek nerwowych, w procesach utrzymania zdolności adaptacyjnych ośrodkowego układu nerwowego tj. w mechanizmie mózgowej homeostazy. Komórki glejowe uczestnicząc pośrednio w procesie przewodnictwa mogą, być może, modulować także pobudliwość tkanki mózgowej.

Dla określenia wzajemnych zależności pomiędzy neuronami i komórkami glejowymi niezbędna jest biochemiczna charakterystyka komórek obu typów.

Szybki rozwój techniki pomiarowej, a zwłaszcza elektroniki i techniki mikroelektrodowej, umożliwił przeprowadzenie badań elektrofizjologicznych nawet pojedynczego neuronu, jednakże biochemiczne zmiany zachodzące w pojedynczej komórce są niekiedy niezwykle trudne do wykrycia. Dlatego też do biochemicznych badań mózgu bierze się bądź to cały mózg, bądź jego określone struktury, albo też przeprowadza się biochemiczną charakterystykę niektórych subkomórkowych elementów mózgowia jak np. mitochondriów czy mikrosomów. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że wyniki otrzymane przy zastosowaniu takiego materiału badawczego nie reprezentują biochemicznych zmian w komórkach poszczególnych rodzajów, a stanowią jedynie wypadkową zmian zachodzących w komórkach mózgowych różnych typów.

Komórki nerwowe i glejowe można rozdzielać za pomocą kilku metod. Jedną z nich jest mikrodysekcja pojedynczych komórek ze świeżego mózgu lub z zamrożonych skrawków przy użyciu mikroskopu stereoskopowego (2, 3, 4). Procedurę tę stosuje się przede wszystkim do izolowania komórek glejowych i neuronów z bardzo małych obszarów mózgu, które mają ściśle określone funkcjonalne znaczenie. Jest ona niełatwa w wykonaniu i dostarcza jedynie niewielkiej ilości materiału. Przed mikrodysekcją stosuje się niekiedy rozdrabnianie mechaniczne materiału (5).

Metody drugiej grupy polegają na wirowaniu w gradiencie stężeń sacharozy lub Ficollu zawiesiny z tkanki mózgowej poddanej działaniu płynu dezintegrującego i przesączonej przez sita o określonej porowatości. Okazało się, że ta ostatnio wymieniona technika dostarcza takiej ilości komórek glejowych i neuronalnych, która wystarcza do przeprowadzenia wielu oznaczeń biochemicznych oraz, że otrzymuje się przy jej pomocy frakcje wzbogacone w dany rodzaj komórek. Należy jednak zaznaczyć, że otrzymywaną za pomocą większości metod frakcję neuronalną stanowią głównie perikariony.

Metoda wirowania w gradiencie stężeń jest dziś najpowszechniej stosowaną w badaniach biochemicznych techniką rozdziału komórek glejowych i neuronów.

II. Rozdział neuronów i komórek glejowych za pomocą wirowania w gradiencie stężeń

Rozdział neuronów i komórek glejowych z mózgu metodą wirowania w gradiencie stężeń polega na ogół na:

- a) mechanicznym rozdrabnianiu tkanki mózgowej,
- b) zawieszaniu rozdrobnionej tkanki w płynie dezintegrującym i przepuszczaniu otrzymanej zawiesiny przez sita o określonej porowatości,
- c) wirowaniu w gradiencie stężeń w celu otrzymania różnego typu komórek.

Różnorodność opublikowanych modyfikacji (Tabela 1) dotyczy nie tylko sposobów mechanicznego rozdrabniania tkanki i warunków wirowania, ale przede wszystkim składu płynów dezintegrujących. Autorzy reprezentują często przeciwstawne poglądy odnośnie roli poszczególnych, a nawet tych samych składników płynów dezintegrujących, np. stężenia jonów potasu i wapnia, obecności i stężenia poliwinylpiperolidonu, konieczności dodawania enzymów proteolitycznych itp. Utrudnia to w znacznym stopniu wybór odpowiedniej metody rozdziału i wykazanie wyższości jednej techniki nad innymi.

II-1. Rozdrabnianie tkanki mózgowej

Przed zawieszeniem komórek w płynie dezintegrującym stosuje się mechaniczne rozdrabnianie tkanki. Na ogół tkankę mózgową (minimum 100 mg) po wypreparowaniu umieszcza się na ochłodzonej szalce Petriego i sieka różnego typu ostrzami na bardzo drobne kawałki. Niektórzy preferują jednak rozdrabnianie tkanki za pomocą bezpośredniego przeciskania jej przez drobne nylonowe sita (6) lub stosowanie metalowych pras z otworami wielkości komórek (7). Jako dodatkowy etap stosuje się również inkubację rozdrobnionej tkanki w środowisku zawierającym glukozę i fruktozę, bez (8, 9) lub z dodatkiem enzymów proteolitycznych (10—13). Następnie zawiesinę tkanki przeciska się kilkakrotnie przez sita o określonej porowatości — nylonowe lub stalowe. Dzięki temu zachodzi dalsze rozdrabnianie tkanki oraz usuwanie jej nierozdrobnionych części. Porowatość końcowych sit waha się pomiędzy 30—100 μ m, średnica przeciętnego perikarionu wynosi zaś tylko ok. 15 μ m. Powstała zawiesina zawiera nieuszkodzone komórki, elementy subkomórkowe oraz pewną ilość komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych, które ze względu na swój wydłużony kształt przechodzą przez sita. W celu usunięcia kapilar wprowadzono przepuszczanie zawiesiny wyjściowej przez kolumnę ze szklanych kulek Ballotini Nr 11 (14).

II-2. Płyny dezintegrujące

Dalsze rozluźnienie spójności komórek zachodzi w płynie dezintegrującym. Skład płynów dezintegrujących, jak widać z Tabeli 1, może być bardzo różny.

Głównym składnikiem płynu jest sacharoza bądź Ficoll. Sacharozę (15, 16) wykorzystuje się nie tylko dlatego, że jest ona powszechnie stosowana do różnicowego frakcjonowania ale również dlatego, że okazała się ona odpowiednim środowiskiem do mikrodysekcji komórek układu nerwowego (17).

Większość autorów jednakże używa zamiast sacharozy Ficoll (6, 7, 9, 14, 18—23) w stężeniu od 1% do 20%. Ficoll nie zwiększa bowiem ciśnienia osmotycznego roztworu przy wzroście stężenia, w przeciwieństwie do sacharozy. Uważa się, że Ficoll jest obojętny dla komórek. Preparaty jego mogą jednak różnić się masą cząsteczkową (stopniem polimeryzacji) w zależności od serii produkcyjnej oraz zawartością jonów (24), co może wpływać na rozdział komórek w gradiencie stężeń. Dlatego też zaleca się stosowanie Ficoll z jednego opakowania oraz jego dializę przed użyciem.

Tabela 1

Porównanie metod rozdziału komórek nerwowych i glejowych w gradiencie stężeń

Material	Otrzymywane komórki	Rozdrabnianie tkanki	Płyn dezintegrujący	Wirowanie	Autor
1	2	3	4	5	6
Kora mózgo-wa szczura	Neurony i glej	S.n. (110), s.s. (40)	10—11% Ficoll 100—110 mM KCl 10 mM—P pH—7,4	Sach.-Ficoll g.n.	Rose (6) Rose i Sinha (14)
Kora mózgo-wa szczura	Neurony i glej	S.n. (435, 193, 105, 55)	10% Ficoll 100 mM KCl 10 Mm—P pH—7,4	Sach.-Ficoll g.n.	Nagata i wsp. (19, 94)
Kora mózgo-wa szczura	Neurony i glej	S.n. (333, 110, 73)	2% Ficoll 7,5% PVP 1% BSA 10mM CaCl ₂ pH—4,7	Sach.-Ficoll g.n.	Sellinger i wsp. (18,26)
Kora mózgo-wa szczura	Neurony i glej	S.n. (110, 54, 33), s.s. (40)	8% Ficoll 0,2% PVP 100 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM—P pH—7,4	Sach.-Ficoll g.n.	Sinha i wsp. (27)
Kora mózgo-wa szczura	Neurony	S.n. (71, 31)	Aceton-glicerol —H ₂ O(1:1:1 v/v) Glicerol —0,25 M sacharozą (3:1)	Sacharozą g.n.	Satake i Abe (33)
Kora mózgo-wa, hipokamp szczura	Neurony, glej i kom. śródbłonkowe	Prasa tkankowa, s.s. (75, 37 × 3)	10% Ficoll 5 mM CaCl ₂ 50 mM Tris—HCl pH—7,8	Sach.-Ficoll g.c. rotor strefowy	Flangasi Bowman (7)
Mózg szczura	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 60 min. + 1% trypsyna) s.n. (150), s.s. (74)	5% glukoza 5% fruktoza 1% BSA 10 mM—P pH—6,0	Sach.-Ficoll g.n.	Norton i Poduslo (10)
Mózg szczura	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 45 min + trypsyna) s.n. (110), s.s. (105, 73, 53)	1% trypsyna 5% glukoza 5% fruktoza 1% BSA 100 mM K ₂ HPO ₄ —NaOH pH—6,2	Sach—g.n. sach. g.c. rotor strefowy	Giorgi (11)

Tabela 1 c.d.

Material	Otrzymywane komórki	Rozdrabnianie tkanki	Płyn dezintegrujący	Wirowanie	Autor
1	2	3	4	5	6
Mózg szczura	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 90 min + 1% trypsyna) s.n. (150), s.s. (74)	1% BSA 5% glukoza 5% fruktoza 10 mM—P pH—6,0	Sach.—g.n. rotorstrefowy	Kuenzle i wsp. (12)
Kora mózdzkowa szczura	Komórki Purkiniego i granularne	S.n. (333 × 3 110 × 3, 74 × 3)	7,5% PVP 1% BSA 3,77 mM CaCl ₂	Sach.-Ficoll g.n.	Sellinger i wsp. (25)
Kora mózdzkowa szczura	Komórki Purkiniego i granularne	Inkubacja (37°C 60 min.) S.n. (286, 111, 45, 35)	2% Ficoll 10% glukoza 10% fruktoza 10 mM—P pH 7,2	Sach.—g.n.	Hazama i Uchimura (20)
Kora mózgowa i rdzeń przedłużony królika	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 30—60 min.) lub bez inkubacji S.n. (1000, 120, 75, 50)	0.32 M sacharoza 1 mM EDTA 2% Ficoll 10 mM Tris—HCl pH 7,4	Sach.-Ficoll g.n.	Blomstrand i Hamberger (16,80)
Kora mózgowa królika	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 60 min.) S.n. (1000 × 10 150, 50 × 2)	2% Ficoll 20 mM glukoza 120 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂ 2,5 mM ADP 35 mM Tris—HCl pH 7,6	Sach.-Ficoll g.n.	Hamberger i wsp. (8)
Kora mózgowa owcy	Glej	Sita jedwabne	0,25M sacharoza 3 mM K ₂ HPO ₄	Sach.—g.n.	Korey i wsp. (15)
Biała substancja mózgowa cielęcina	Oligodendroglej	Inkubacja (37°C 90 min + 0.1% trypsyna) S.n. (150), s.s. (74)	5% glukoza 5% fruktoza 1% BSA 10 mM KH ₂ PO ₄ —NaOH pH—6.0	Sach.—g.n.	Poduslo i Norton (13)
Kora mózgowa człowieka i kora mózgowa szczura	Neurony i glej	Inkubacja (37°C 60 min) S.n. (149), s.s. (74 × 5)	1% Ficoll 10% glukoza 10% fruktoza 10 mM—P pH—6,0	Sach.—g.n.	Iqbal i Tellez-Nagel (9)

Skróty stosowane w Tabeli I:

Sach. — sacharoza; P — bufor fosforanowy; S.n. — sita nylonowe; S.s. — sita stalowe; g.c. — gradient ciągły; g.n. — gradient nieciągły; liczby w nawiasach — porowatość sit w μm .

W niektórych przypadkach Ficoll zastąpiono poliwinylpirolidonem (PVP) (25, 26) lub zastosowano ich mieszaninę (18, 27). PVP ułatwia sedymentację krwinek co nie jest bez znaczenia, jako że tkanka mózgowa jest silnie ukrwiona, wpływa także na odporność komórek na mechaniczny i osmotyczny szok (28). Należy jednak pamiętać o dokładnym przeemywaniu izolowanych frakcji komórek w celu usunięcia PVP (2957) ponieważ związek ten wpływa hamująco na aktywność niektórych enzymów, np. Na^+K^+ — ATPazę.

Jednym z często stosowanych składników płynów dezintegrujących jest 1% albumina z surowicy wołu (BSA) (10—12, 18, 25, 30—32). Badania Azcurry i Sellinger'a (dane nieopubl.) wskazują, że kwasy tłuszczowe i albumina w obecności PVP, w hypotonicznym środowisku ułatwiają rozluźnienie międzykomórkowej spójności. Albumina stabilizuje ponadto błony komórkowe. Wydaje się jednak, że można ją z powodzeniem zastąpić odpowiednią kombinacją preparatu Ficoll i jonów potasu lub wapnia (6, 7, 14, 19).

Zastosowanie mieszaniny acetonu i glicerolu (33) zapewnia ochronę składników wewnątrzkomórkowych i zapobiega oderwaniu wypustek, ale środowisko to nie jest zalecane przy biochemicznych badaniach frakcji komórkowych (34).

Zaskakuje również swoją różnorodnością skład jonowy stosowanych płynów dezintegrujących. Dotyczy to przede wszystkim stężenia jonów wapnia i potasu, których rola w zjawisku komórkowej adhezji nie jest jeszcze wystarczająco wyjaśniona. Stężenie jonów wapnia waha się w granicach 3,8—10mM a stężenie jonów potasu w granicach 100—300mM. Rzadko stosuje się obecnie związki chelatujące jony wapnia takie jak cytrynian lub EDTA, a wręcz przeciwnie wielu autorów wprowadza te jony do środowiska (7, 18, 23). Jedni stosują czterofenyloboran (TBP) jako czynnik kompleksujący jony K^+ (35), inni natomiast płyny dezintegrujące zawierające znaczną ilość tych jonów (6, 14, 19, 22, 23, 36). Wykazano ponadto, że czterofenyloboran wpływa hamująco na oddychanie komórkowe oraz powoduje morfologiczne zmiany w komórkach (37) — dlatego też zaniechano obecnie jego stosowania.

W płynach dezintegrujących, najczęściej stosuje się bufor fosforanowy lub bufor Tris-HCl o pH pomiędzy 6.0 i 7.8, używa się jednak i płyny o niższym pH (18, 26).

Szereg autorów uważa za konieczne dla „dysocjacji” tkanki dodanie do płynów dezintegrujących enzymów proteolitycznych: trypsyny (10—13) lub kolagenazy i hialuronidazy (30, 31, 38). Do tego celu niekiedy używano również papainę (39).

Stosowanie enzymów proteolitycznych spotyka się jednak z zastrzeżeniami. Trawienie np. trypsyną ułatwia dezintegrację tkanki. Enzym ten może jednak atakować białka błony komórkowej (31, 40) i wnikać do komórek (41) powodując między innymi straty DNA (31). Trypsynę tru-

dno ponadto usunąć z powierzchni komórek — jest więc możliwe, że może ona maskować ich normalne właściwości metaboliczne (42—44).

Hialuronidaza i kolagenaza nie uszkadzają błon plazmatycznych, dlatego też niektórzy zastosowali przy izolacji neuronów perfuzję mózgu płynem zawierającym oba te enzymy oraz glukozę i fruktozę (38). Ten sposób postępowania ma dodatkową zaletę — usuwa z mózgu krew — co ułatwia dalsze postępowanie. W tym samym celu inni autorzy przeprowadzają krótkotrwałą perfuzję mózgu płynem fizjologicznym (8, 19).

II-3. Wirowanie

Kolejnym etapem rozdziału gleju i neuronów jest wirowanie w gradiencie stężeń sacharozy i Ficollu. Neurony i komórki glejowe mają różną gęstość i są zbierane z innych warstw sacharozy lub Ficollu. Czystą frakcją neuronalną udaje się otrzymać zazwyczaj już w pierwszym wirowaniu, natomiast frakcja gleju wymaga na ogół dalszego oczyszczania w kolejnych wirowaniach.

Stosuje się różne warianty wirowania. Do sedymentacji podobnych frakcji stosowane są zarówno małe jak i duże przyspieszenia oraz różne gradienty stężeń: gradienty ciągłe i nieciągłe, gradienty z jednego lub kilku związków (Tabela 1).

Większość technik wykorzystuje głowice horyzontalne, ale stosuje się też głowice strefowe (7, 11, 12).

Otrzymywane frakcje bywają zanieczyszczone m.in. subkomórkowymi elementami powstałymi w wyniku zniszczenia komórki w czasie de-integracji tkanki. Można temu zapobiec stosując wstępne wirowanie zawiesiny komórek przy małych przyspieszeniach. Mitochondria, mikrosome i synaptosomy sedymentują wtedy tylko w bardzo nieznacznym stopniu, chociaż istnieje możliwość, że pewna ich ilość przechodzi do osadu „przyklepiona” do całych, nienaruszonych komórek.

III. Ocena metod rozdziału neuronów i gleju

Przy ocenie wartości metod rozdziału neuronów i komórek glejowych większość autorów przyjmuje następujące kryteria:

- a) ilość otrzymywanych komórek,
- b) stopień czystości izolowanych frakcji komórkowych,
- c) zmiany morfologiczne otrzymywanych komórek i ich właściwości metabolicznych.

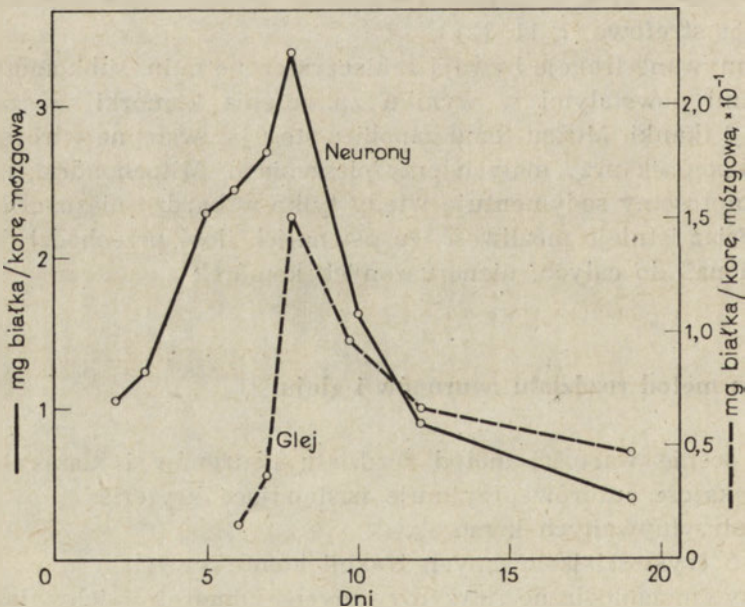
Istnieje jednak wiele trudności ze stosowaniem wymienionych kryteriów. Nie wiadomo bowiem w jakim stopniu otrzymywane komórki

odpowiadają populacji komórek *in situ* i czy procedura rozdziału nie wpływa na metabolizm izolowanych komórek. Utrata przez neurony wypustek, a zwłaszcza ich proksymalnego segmentu, prowadzi bowiem do rozerwania błony plazmatycznej, co z kolei może pociągać za sobą dość znaczne straty w zawartości elementów cytoplazmatycznych (45). Ponadto do wnętrza komórki mogą wtedy przenikać pozaneuronalne składniki.

Nie wszyscy autorzy stosują te same kryteria przy ocenie stosowanej techniki, pomijając niektóre z nich lub wprowadzając niekiedy inne. Powoduje to często niedosyt informacji, zwłaszcza na temat zachowania właściwości morfologicznych i metabolicznych otrzymywanych komórek oraz utrudnia w znacznym stopniu porównanie i ocenę różnych metod rozdziału.

III-1. Wydajność

Ilość otrzymywanych komórek jest różna w zależności od metody rozdziału jaką stosowano. Liczba neuronów w przeliczeniu na g kory mózgowej szczura waha się w granicach $1,2\text{--}37 \times 10^6$ (6, 9, 38, 46), zaś liczba komórek glejowych $2,2\text{--}6,6 \times 10^6$ (9, 10). Podobne ilości komórek

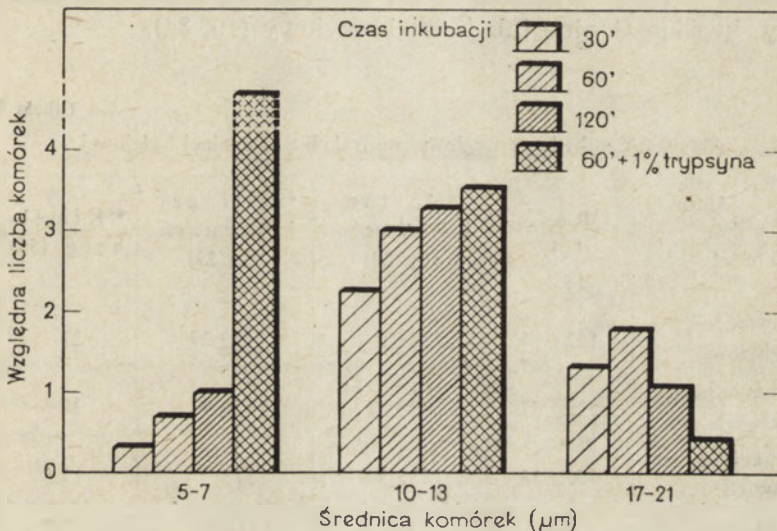


Ryc. 2. Wydajność otrzymywanych frakcji komórek neuronalnych i glejowych izolowanych z mózgu szczura wyrażona jako ilość białka na korę mózgową jednego zwierzęcia (wg 51)

otrzymywano, gdy rozdzielano komórki z mózgu ludzkiego (9, 46). Zwraca uwagę fakt, że pomimo przewagi ilościowej komórek glejowych w mózgu otrzymuje się ich po rozdziale znacznie mniej niż komórek nerwowych.

Większą wydajność komórek osiąga się, gdy tkankę mózgową inkubuje się w podwyższonej temperaturze (37°C) (9). Ilość i typ otrzymywanych komórek glejowych zależy od części mózgu, z której izoluje się komórki. Gdy stosuje się cały mózg lub korę mózgową to otrzymuje się przede wszystkim astroglej, jeśli zaś istotę białą, to oligodendroglej i komórki podobne do oligodendrogleju (13, 22).

Wydajność preparatyki zależy od wieku zwierzęcia (9, 18, 47—51). Lepszą wydajność osiąga się z kory mózgowej młodych zwierząt niż starszych (Ryc. 2).



Ryc. 3. Wpływ przedłużenia czasu inkubacji skrawków kory mózgowej w płynie de-integrującym na liczebność populacji komórek o różnej średnicy we frakcji neuronalnej. Czas inkubacji wynosił — 30, 60 i 120 minut (wg 8).

Analiza wielkości komórek (8) jest szybką metodą, która na podstawie wielkości komórek pozwala wykryć zanieczyszczenia innego typu komórkami i ich fragmentami. Za pomocą tej metody wykazano, że przedłużenie czasu inkubacji zwiększa wydajność preparatyki i przyczynia się do tego, że przeważają komórki o średnicy 10—15 µ. Natomiast dodanie do środowiska 1% trypsyny sprawia, że otrzymuje się więcej komórek małych i cząstek subneuronalnych o średnicy mniejszej od 10 µ (Ryc. 3).

III-2. Czystość otrzymywanych frakcji komórkowych

Dotychczas nie udało się otrzymać zupełnie czystej frakcji neuronalnej ani glejowej. Są to jedynie frakcje „wzbogacone”. Stąd też wynika problem oceny czystości otrzymywanych frakcji komórkowych. Zanieczyszczenia mogą być dwojakiego rodzaju:

- frakcje neuronów i komórek glejowych mogą być wzajemnie zanieczyszczone, ewentualnie mogą występować jeszcze inne typy komórek, np. krwinki lub fragmenty kapilar,
- mogą występować zanieczyszczenia elementami subkomórkowymi, co łączy się ściśle ze sprawą uszkodzenia komórek.

W celu oceny stopnia czystości frakcji komórkowych i identyfikacji komórek stosuje się przeważnie następujące kryteria morfologiczne: kształt komórek, intensywność wybarwienia się jądra i liczba jąder (34). Komórki ogląda się przyżyciowo w mikroskopie świetlnym lub w kontraście fazowym. Do barwienia preparatów stosuje się błękit metylenowy, kwaśną tioninę lub fiolet krezyłowy (19, 34).

Tabela 2

Aktywność anhidrazy węglowej we frakcji neuronalnej i glejowej

Autor Materiał	*Rose (14)	*Norton i Podusło (wg 29)	*Sellinger i Azcurra (wg 29)	**Kimmel- berg (56)
Zawiesina wyjściowa	122 ± 16	227 ± 2	147 ± 29	27
Frakcja gleju (A)	529 ± 57	500 ± 67	485 ± 93	37
Frakcja neuro- nów (B)	152 ± 33	123 ± 38	37 ± 3	17,5
A/B	3,5	4,1	12,0	2,1

* Jednostki umowne/mg białka

** (mole CO₂/l/sek./mg białka) × 10⁻⁵

Frakcja neuronalna zawiera 64—90% neuronów, 8—23% komórek glejowych i 2—21% komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych a frakcja gleju 64—88% komórek glejowych, 6—11% neuronów oraz 6—25% komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych (6, 9, 12, 52). Niekiedy w rozdzielonych frakcjach stwierdzano występowanie niezidentyfikowanych komórek jak i zanieczyszczeń subkomórkowymi fragmentami: mieliną, synaptosomami, mitochondriami, mikrosomami i jądrami. Zanieczyszczenia synaptosomami spotyka się znacznie częściej we frakcji gleju (53) niż neuronów.

Oznaczanie aktywności enzymów charakterystycznych dla danego typu komórek może być również wskaźnikiem wzajemnych zanieczyszczeń. Za enzym markerowy frakcji glejowej na podstawie badań Giacobiniego (54, 55) można uważać anhidrazę węglową (E.C. 4.2.1.1). Autor ten w izolowanych metodą mikrodysekcji komórkach glejowych stwierdził 100-krotnie wyższą aktywność tego enzymu niż w neuronach. Tak dużych różnic nie stwierdzono rozdzielając glej od neuronów za pomocą wirowania w gradiencie stężeń (14, 29, 56) — Tabela 2.

Za enzym wskaźnikowy neuronów uważa się β -galaktozydazę, której aktywność w neuronach jest około 10-krotnie większa niż w gleju (57), jak i glukozylotransferazę ceramidową (58) oraz glukozo-6-fosfatazę (59). Zanieczyszczenia otrzymywanych frakcji komórkowych np. synaptosomami lub mieliną można ocenić oznaczając aktywność charakterystycznych enzymów. W przypadku synaptosomów są to: acetylotransferaza cholinowa (E.C. 2.3.1.6) i dekarboksylaza glutaminianowa (E.C. 4.1.1.15), a w przypadku mieliny 3'-fosfodiesteraza 2'-3'-cyklicznego nukleotydu (E.C. 3.1.4.37) (53, 60).

III-3. Wygląd otrzymywanych komórek i ocena ich właściwości metabolicznych

Z obserwacji mikroskopowych rozdzielonych frakcji komórkowych wynika, że wypustki neuronów, tak aksony jak i dendryty, są najczęściej pourywane. Lepiej zachowane komórki otrzymuje się, gdy źródłem ich jest pień mózgowy lub rdzeń przedłużony, a nie kora mózgowia (21, 23) lub gdy inkubacja rozdrobnionej tkanki zachodzi w obecności enzymów proteolitycznych (38, 61, 62). Neurony mają na ogół dość dobrze zachowaną strukturę wewnątrzkomórkową, z wyjątkiem mitochondriów i zewnętrznej błony plazmatycznej, która jest często porozrywana z powodu utraty aksonu lub dendrytów (27, 47, 63—65).

Błona plazmatyczna komórek glejowych jest najczęściej dobrze zachowana, tak samo jak i większość organelli komórkowych.

Oprócz obserwacji komórek w mikroskopie świetlnym i elektronowym powszechnie przyjętym kryterium integralności błon plazmatycznych jest brak wybarwienia się komórek błękitem trypanowym. Niekiedy jednak zdarza się, że barwnik ten wnika do nieuszkodzonych komórek (66, 67).

W celu określenia stopnia zachowania właściwości metabolicznych izolowanych komórek oznacza się aktywność enzymów oddechowych i glikolitycznych takich jak: oksydaza cytochromowa, dehydrogenaza mleczanowa, dehydrogenaza bursztynianowa oraz kinaza pirogronianowa (6, 29, 34, 53, 68, 69). Wielu autorów mierzy także pobieranie tlenu i wydalanie dwutlenku węgla (14, 29, 30).

W otrzymywanych frakcjach komórkowych oznacza się również zawartość białka i kwasów nukleinowych, przy czym stosunek RNA/DNA

może służyć zarówno jako kryterium czystości frakcji jak i wydajności preparatyki (14, 26).

IV. Niektóre właściwości biochemiczne frakcji neuronalnej i glejowej

Obecnie techniki rozdziału komórek glejowych i neuronów pozwalają już na określenie różnic i wzajemnych zależności pomiędzy tymi frakcjami.

W mózgu występują specyficzne dla tej tkanki białka: S—100 i 14—3—2. Badania rozmieszczenia i właściwości tych białek, jakie przeprowadzono między innymi metodą immunoelektroforezy i immunofluorescencji, nie są całkowicie zgodne. Większość autorów sądzi, że S—100 jest białkiem charakterystycznym dla gleju (70) i obecnym przede wszystkim w astrocytach i w oligodendrogleju (71, 72, 73). Białko 14—3—2 występuje natomiast głównie w neuronach (74) i wykazuje aktywność enolazy (E.C. 4.2.1.11) (75). Jak dotychczas jest to jedyne specyficzne białko mózgowe o aktywności enzymatycznej. Stwierdzono (76), że charakterystyczna dla frakcji neuronalnej enolaza tj. białko 14—3—2 jest w przeciwieństwie do enolazy z gleju białkiem termostabilnym i ma inną budowę podjednostkową.

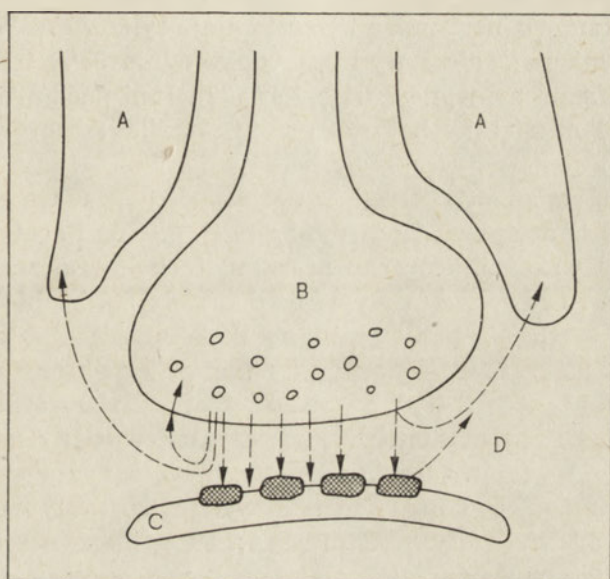
Bardzo obiecujące dla poznania metabolizmu komórek obu typów wydają się doświadczenia nad syntezą białka w gleju i w neuronach. Zdają się one wskazywać na bardziej intensywną syntezę białka w neuronach niż w komórkach glejowych (21, 33, 77, 78, 78a) chociaż niektórzy postulują wyższą syntezę białka w gleju (11, 47). Wiek zwierząt z których otrzymywano komórki (47, 50, 79), metoda rozdziału komórek, rodzaj oraz sposób wprowadzania radioaktywnego prekursora (11, 47, 80, 81) mogą jednak wpływać na otrzymywane wyniki.

Ilość poszczególnych wolnych aminokwasów w obu mózgowych frakcjach komórkowych jest różna (19). Glutaminian, glicyna, alanina i kwas γ -aminomasłowy (GABA) występują w neuronach w wyższych stężeniach niż we frakcji gleju (19). Specyficzna aktywność tych aminokwasów oznacza przy użyciu [^{14}C]glukozy jako prekursora, jest natomiast kilkakrotnie wyższa we frakcji gleju (77, 82).

Inkubacja izolowanych komórek w środowisku zawierającym znakowane aminokwasy wykazała, że zarówno neurony jak i komórki glejowe mogą akumulować aminokwasy; ich stężenie w komórce może być wyższe niż w środowisku (19, 83). Frakcja gleju wykazuje przy tym wyraźnie większą zdolność pobierania niektórych aminokwasów, zwłaszcza glutaminianu, asparaginianu, seryny, proliny i glicyny a w mniejszym stopniu i GABA (83). Ponieważ niektórym z tych aminokwasów (glutaminian, asparaginian i glicyna) przypisuje się rolę neurotransmiterów zdolność do ich pobierania i akumulowania sugeruje, że komórki glejowe mogą brać

udział w regulacji procesów przekaźnictwa. Zaobserwowano, że komórki glejowe podobnie jak neurony akumulują także aminy biogenne (84, 85). Wydaje się jednak, że zanieczyszczenia otrzymywanych frakcji komórkowych mogą zniekształcać otrzymywane wyniki eksperymentalne.

Zachodzący podczas dojrzewania mózgu wzrost zawartości w nim noradrenaliny tłumaczy się rozwojem neuronalnych mechanizmów wychwytywania i gromadzenia, a także możliwością akumulowania noradrenaliny w gleju (1). Rola komórek glejowych w regulacji ilości neurotransmiterów w szczeliny synaptycznej jest jednak w chwili obecnej raczej spekulatywna. Hipotetyczny udział tych komórek w regulacji procesów przekaźnictwa przedstawia rycina 4.



Ryc. 4. Hipotetyczny schemat regulacji ilości neurotransmitera w szczeliny synaptycznej.

A — komórka glejowa; B — zakończenie nerwowe z pęcherzykami synaptycznymi; C — błona postsynaptyczna z receptorami (miejsca zaciemnione); D — szczelina synaptyczna;

Wydzielony do szczeliny synaptycznej neurotransmitter wiąże się z receptorem wywołując depolaryzację błony postsynaptycznej; inaktywacja neurotransmitera może zachodzić poprzez: enzymatyczną degradację neurotransmitera, ponowne pobranie neurotransmitera przez zakończenie nerwowe, wychwycenie neurotransmitera przez komórki glejowe (strzałki przerywane).

Kilka prac wskazuje na wyższą aktywność Na^+K^+ — ATPazy we frakcji gleju w porównaniu z frakcją neuronalną (56, 63). Wykazano, że zarówno neurony jak i komórki glejowe akumulują potas z zewnątrzkomórkowego środowiska w czasie inkubacji. Komórki glejowe mogą akumulować jony K^+ w stopniu nieco większym niż neurony (19, 86, 87).

Ostatnio postuluje się też udział gleju w dostarczaniu białek do neuronów (88, 89). Badania dotyczą głównie aksonów olbrzymich z kałamarnicy *Loligo pealii*. Jak jest w ośrodkowym układzie nerwowym kręgow-

ców jeszcze nie wiadomo. Chociaż techniki rozdziału gleju i neuronów z tkanki nerwowej umożliwiają również śledzenie zmian rozwojowych zachodzących w mózgu, to jednak brak jest jeszcze badań które by w kompleksowy sposób traktowały o zachodzących wtedy w mózgu zmianach komórkowych i biochemicznych.

Badania frakcji neuronów i komórek glejowych w czasie rozwoju potwierdziły, że kształt i wielkość komórek mózgowych zależą od wieku zwierzęcia (27). Z wiekiem zachodzą w korze mózgowej zmiany w stosunkach ilościowych neuronów i komórek glejowych, ponieważ neurogeneza jest u zwierząt wielu gatunków zakończona przed urodzeniem zwierzęcia, podczas gdy proliferacja gleju jest głównie procesem postnatalnym. I tak np. w korze mózgowej 1-dniowego szczura 53% całej populacji komórek mózgowych stanowią neurony, a komórki gleju tylko 37%. W ciągu 20 dni wartości te zmieniają się i wynoszą odpowiednio 35% i 52%. Wartość stosunku glej/neurony wynosi więc 1,49 (27). Inni podają niższe wartości: 0,96 dla 1-miesięcznych szczurów i 1,30 dla szczurów 5-miesięcznych (90).

Ilościowym zmianom w czasie rozwoju podlegają także neurotransmitery. Aktywność acetylocholinoesterazy (E.C. 3.1.1.7) i acetylotransferazy cholinowej są wskaźnikami neurotransmisji cholinergicznej. U kurcząt np. aktywność AChE wzrasta wyraźnie podczas rozwoju płodowego aż do 3 miesiąca po urodzeniu i od 20 miesiąca do 36 miesiąca po wykluciu (91). Badania Vernadakis wykazały, że nie tylko neurony ale i komórki glejowe zawierają AChE (92), a ponieważ zachodzi wyraźna proliferacja gleju z wiekiem, autorka przypuszcza, że obserwowany wysoki poziom AChE w mózgu związany jest z obecnością tego enzymu w gleju.

Przeprowadzone badania postnatalnych zmian aktywności enzymatycznych (25, 51) wykazały, że istnieją różnice w aktywności specyficznej mitochondrialnej neuronalnej i glejowej dehydrogenazy α -glicerofosforanowej, która jest w gleju około 6 razy wyższa w pierwszym miesiącu życia. Nie stwierdzono natomiast różnic w obu frakcjach komórkowych, w tym okresie, w aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej.

V. Uwagi końcowe

Otrzymywanie komórek różnego typu z mózgu umożliwia przeprowadzenie badań ich metabolizmu. Do tego celu stosuje się m.in. metodę wirowania w gradiencie stężeń. Pozwala ona na ilościowe i jakościowe określenie zmian, które zaszły *in vivo* i na przypisanie ich danemu typowi komórek. Umożliwia również zbadanie właściwości biochemicznych neuronów i komórek glejowych w określonych warunkach *in vitro*. Ma to duże znaczenie zwłaszcza dla zbadania wpływu na komórki mózgowie

związków, które nie przenikają przez barierę krew—mózg, a więc których nie można testować *in vivo*.

Otrzymywane komórki nie zawsze mają w pełni zachowane swoje właściwości fizjologiczne i morfologiczne, a frakcje komórkowe są w zależności od metody rozdziału w różnym stopniu zanieczyszczone. Niedoskonałość procedury rozdziału jest powodem, że wartości dotyczące tych samych zjawisk są niekiedy rozbieżne i tym samym trudno jest je zinterpretować (np. aktywność anhidrazy węglowej we frakcji neuronów i gleju). Szczególne trudności napotyka się zwłaszcza przy badaniach mózgu w czasie rozwoju. Wiadomo bowiem, że metoda rozdziału komórek z dorosłego zwierzęcia nie zawsze jest odpowiednia do rozdziału komórek z tkanki rozwijającej się. Nieliczne do tej pory próby opracowania takich metod rozdziału, które umożliwiłyby porównanie właściwości komórek neuronalnych i glejowych z mózgu zwierząt w różnym wieku są jeszcze niewystarczające.

Dotychczasowe prace dostarczyły już wielu informacji o właściwościach biochemicznych izolowanych komórek, np. udziału komórek glejowych w pobieraniu neurotransmiterów (GABA, glicyny, glutaminianu) ze szczeliny synaptycznej, zmian ilościowych neuronów i komórek glejowych w czasie rozwoju mózgu, zmian aktywności niektórych enzymów itp. Dalsze wysiłki powinny jednak zmierzać w kierunku opracowania takich technik rozdziału, dzięki którym można będzie otrzymać jeszcze mniej zanieczyszczone frakcje komórkowe i lepiej zachowane komórki. Nie bez znaczenia jest też umiejętność przyżyciowego przechowywania izolowanych frakcji komórkowych (44, 93).

Wydaje się, że pomimo wielu ograniczeń i niedoskonałości proceduralnych, na które wskazywano w niniejszym opracowaniu, metoda ta obok innych technik takich jak: hodowla tkanek, badania skrawków mózgowych czy metody histochemiczne w połączeniu z autoradiografią, umożliwia wyjaśnienie procesów biochemicznych zachodzących w mózgu i funkcjonalnych powiązań pomiędzy komórkami mózgowymi różnych typów.

Zaakceptowano do druku 8.03.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Vernadakis A., (1975) *Fed. Proc.*, **34**, 89—95.
2. Giacobini E., (1968), w *Neurosciences Research*, red. Ehrenpreis S., Solnitzky D. C., t. 1, str. 1—71, Academic Press, New York.
3. Hyden H., (1967), w *The Neuron*, red. Hyden H., str. 179—219, Elsevier, Amsterdam.
4. Lowry O. H., (1962), *Bull. N. Y. Acad. Med. Soc. Ser.*, **38**, 788—818.
5. Roots B. J., Johnston P. V., (1964), *J. Ultrastruct. Res.*, **10**, 350—361.
6. Rose S. P. R., (1967), *Biochem. J.*, **102**, 33—43.
7. Flangas A. L., Bowman R. E., (1968), *Science*, **161**, 1025—1027.

8. Hamberger A., Eriksson O., Norrby K., (1971), *Expt. Cell Res.*, **67**, 380—388.
9. Iqbal K., Tellez-Nagel I., (1972), *Brain Res.*, **45**, 296—301.
10. Norton W. T., Poduslo S. E., (1970), *Science*, **167**, 1144—1145.
11. Giorgi P. P., (1971), *Exp. Cell Res.*, **68**, 273—282.
12. Kuenzle C. C., Pelloni R. R., Kistler G. S., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2333—2339.
13. Poduslo S. E., Norton W. T., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 727—736.
14. Rose S. P. R., Sinha A. K., (1970), *Life Sci.*, **9**, 907—915.
15. Korey S. R., Orchen M., Broz M., (1958), *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **17**, 430—438.
16. Blomstrand C., Hamberger A., (1970), *J. Neurochem.*, **17**, 1187—1195.
17. Hyden H., (1959), *Nature*, **184**, 433—435.
18. Sellinger O. Z., Azcurra J. M., Johanson D. E., Ohlsson W. G., Lodin Z., (1971), *Nature New Biol.*, **230**, 253—256.
19. Nagata Y., Mikoshiba K., Tsukada Y., (1974), *J. Neurochem.*, **22**, 493—503.
20. Hazama H., Uchimura H., (1973), *Exp. Cell Res.*, **82**, 452—455.
21. Takahashi Y., Hsu C. S., Honma S., (1970), *Brain Res.*, **23**, 284—287.
22. Fewster M. E., Scheibel A. B., Mead J. F., (1967), *Brain Res.* **6**, 401—408.
23. Satake M., Hasegawa S., Abe S., Tanaka R., (1968), *Brain Res.*, **11**, 246—250.
24. Rose S. P. R., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 1415—1429.
25. Sellinger O. Z., Legrand J., Clos J., Ohlsson W. G., (1974), *J. Neurochem.*, **23**, 1137—1144.
26. Sellinger O. Z., Azcurra J. M., (1974), w *Research Methods in Neurochemistry*, red. Marks N., Rodnight R., t. 2, str. 3—39, Plenum Press, New York, London.
27. Sinha A. K., Rose S. P. R., Sinha L., Spears D., (1978), *J. Neurochem.*, **30**, 1513—1524.
28. Ben-David A., Gavendo S., (1972), *Cryobiology*, **9**, 192—197.
29. Sinha A. K., Rose S. P. R., (1971), *Brain Res.*, **33**, 205—217.
30. Hemminki K., Holmila E., (1971), *Acta Physiol. Scand.*, **82**, 135—142.
31. Hemminki K., Huttunen M. O., Jarnefelt J., (1970), *Brain Res.*, **23**, 23—34.
32. Jones J. P., Ramsey R. B., Nicholas H. J., (1971), *Life Sci.*, **10**, 997—1003.
33. Satake M., Abe S., (1966), *J. Biochem.*, **59**, 72—75.
34. Rose S. P. R., Sinha A. K., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1319—1328.
35. Rappaport C., Howze G. B., (1966), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 1016—1021.
36. Rose S. P. R., (1965), *Nature*, **206**, 621—622.
37. Mahaley M. S. jr, Wilfong R. F., (1969), *J. Neurosurg.*, **30**, 250—259.
38. Althaus H. H., Huttner W. B., Neuhoff V., (1977), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1155—1159.
39. McIlwain H., (1954), *Proc. Univ. Otago Med. School*, **32**, 17—18.
40. Johnston P. V., Roots B. J., (1970), *Int. Rev. Cytol.*, **29**, 265—280.
41. Guarnieri M., Cohen S. R., Ginns E., (1976), *J. Neurochem.*, **26**, 41—44.
42. Poduslo S. E., McFarland H. F., Kroen C., Miller K., McKhann G. M., (1975), 5th Int. Mtg. Inter. Soc. Neurochem., Barcelona, Spain, Abstracts str. 147.

43. Poduslo S. E., Miller K., Kroen C., McKhann G. M., (1975), *Trans. Amer. Soc. Neurochem.*, **6**, 97.
44. Poduslo S. E., McKhann G. M., (1976), *Neurosci. Lett.*, **2**, 267—271.
45. Hamberger A., Sellström A., (1975), w *Metabolic Compartmentation and Neurotransmission*, red. Berl S., Clarke D. D., Schneider D., str. 145—166, Plenum Press, New York, London.
46. Farooq M., Ferszt R., Moore C. L., Norton W. T., (1977), *Brain Res.*, **124**, 69—81.
47. Johnson D. E., Sellinger O. Z., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1445—1460.
48. Medzihradsky F., Sellinger O. Z., Nandhasri P. S., Santiago J. C., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 543—545.
49. Idoyaga-Vargas V., Santiago J. C., Petiet P. D., Sellinger O. Z., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 2533—2545.
50. Johnson D. E., Sellinger O. Z., (1973), *Neurobiology*, **3**, 113—124.
51. Sellinger O. Z., Santiago J. C., (1972), *Neurobiology*, **2**, 133—146.
52. Sellinger O. Z., Azcurra J. M., (1970), *Trans. Amer. Soc. Neurochem.*, **1**, 22.
53. Nagata Y., Nanba T., Ando M., (1976), *Neurochem. Res.*, **1**, 299—312.
54. Giacobini E., (1961), *Science*, **134**, 1524—1525.
55. Giacobini E., (1964), w *Morphological and Biochemical Correlates of Neural Activity*, red. Cohen M. M., Snider R. S., str. 15—38, Harper Row, New York.
56. Kimelberg H. K., Biddlecome S., Narumi S., Bourke R. S., (1978), *Brain Res.*, **141**, 305—323.
57. Sinha A. K., Rose S. P. R., (1972), *Brain Res.*, **39**, 181—196.
58. Radin N. S., Brenkert A., Arova R. C., Sellinger O. Z., Flangas A. L., (1972), *Brain Res.*, **39**, 163—169.
59. Anchors J. M., Karnovsky M. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6408—6416.
60. Kurihara T., Tsukada Y., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 1167—1174.
61. Raine C. S., Poduslo S. E., Norton W. T., (1971), *Brain Res.*, **27**, 11—24.
62. Poduslo S. E., Norton W. T., (1975), w *Methods in Enzymology*, red. Colowick S. P., Kaplan N., t. 35, str. 561—579, Academic Press, New York.
63. Medzihradsky F., Nandhasri P. S., Idoyaga-Vargas V., Sellinger O. Z., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1599—1603.
64. Kohl H. H., Sellinger O. Z., (1972), *J. Neurochem.*, **19**, 699—711.
65. Hamberger A., Hansson H. A., Sellström A., (1975), *Exp. Cell Res.*, **92**, 1—10.
66. Medzihradsky F., Marks M. J., (1975), *Biochem. Med.*, **13**, 164—177.
67. Bhuyan B. K., Loughman B. E., Fraser T. J., Day K. J., (1976), *Exp. Cell Res.*, **97**, 275—280.
68. Cremer J. N., Johnston P. V., Roots B. J., Trevor A. J., (1968), *J. Neurochem.*, **15**, 1361—1370.
69. Nagata Y., Mikoshiba K., Tsukada Y., (1976), *Asian Med. J.*, **19**, 13—43.
70. Bock E., Hamberger A., (1976) *Brain Res.*, **112**, 329—335.
71. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F., (1976), *J. Comp. Neurol.*, **165**, 197—208.
72. Moore B. W., Cimino M., Hartman B. K., (1977), *Proc. Int. Soc. Neurochem.*, **6**, 31.
73. Packman P. M., Blomstrand C., Hamberger A., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 479—487.
74. Pickel V. M., Reis D. J., Marangos P. J., Zomzely-Neurath C., (1976), *Brain Res.*, **105**, 184—187.

75. Marangos P. J., Zomzely-Nezrath C., York C., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 1309—1316.
76. Marangos P. J., Parma A. M., Goodwin F. K., (1978), *J. Neurochem.*, **31**, 727—732.
77. Rose S. P. R., (1968), w *Applied Neurochemistry*, red. Davison A. N., Dobbing J., str. 332—335, Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
78. Tiplady B., Rose S. P. R., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 549—558.
- 78a. Yanagihara T., (1979), *J. Neurochem.*, **32**, 169—179.
79. Johnson D. E., Sellinger O. Z., (1973), *Brain Res.*, **54**, 129—142.
80. Blomstrand C., Hamberger A., (1969), *J. Neurochem.*, **16**, 1401—1407.
81. Rose S. P. R., (1976), w *Perspectives in Brain Research*, Progress in Brain Research, red. Corner M. A., Swaab D. F., t. 45, str. 67—82, Elsevier-North-Holland Biomedical Press.
82. Rose S. P. R., (1975), *J. Neurosci. Res.*, **1**, 19—30.
83. Hamberger A., (1971), *Brain Res.*, **31**, 169—178.
84. Henn F., Hamberger A., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **68**, 2686—2690.
85. Vernadakis A., (1974), w *Drugs and the Developing Brain*, reed. Vernadakis A., Weiner N., str. 133—148, New York, Plenum.
86. Bradford H. F., Rose S. P. R., (1967), *J. Neurochem.*, **14**, 373—375.
87. Haljamae H., Hamberger A., (1971), *J. Neurochem.*, **18**, 1903—1912.
88. Gainer H., (1978), *Trends in Neurosciences*, **1**, 93—96.
89. Lasek R. J., Gainer H., Barker J. L., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 501—523.
90. Ling E. A., Paterson J. A., Privat A., Moris S., Leblond C. P., (1973), *J. Comp. Neurol.*, **149**, 43—73.
91. Vernadakis A., (1973), *Prog. Brain Res.*, **40**, 231—243.
92. Vernadakis A., Gibson D. A., (1973), 4th Int. Mtg. Intern. Soc. Neurochem., Tokyo, Japan, Abstracts str. 26—31.
93. Poduslo S. E., McKhann G. M., (1977), *Brain Res.*, **132**, 107—120.
94. Nagata Y., Tsukada Y., (1978), w *Reviews of Neuroscience*, red. Ehrenpreis S., Kopin I. J., t. 3, str. 195—221, Raven Press, New York.

RECENZJE

The Molecular Biology of Membranes

Red. S. Fleischer, Y. Hatefi, D. H. MacLennan i A. Tzagoloff,

Plenum Press, 1978, New York, London, 351 stron

Przełom lat czterdziestych i pięćdziesiątych był okresem szczególnie burzliwego rozwoju biochemii na kontynencie amerykańskim. W tym czasie wyodrębniło się szereg nowych kierunków badawczych. Ich twórcy, wówczas ludzie 30—40-letni, obecnie dobiegają wieku emerytalnego, choć wielu z nich jest nadal w pełni czynnych naukowo. Takimi pionierami współczesnej bioenergetyki byli David E. Green, Britton Chance, A. L. Lehninger, Efraim Racker i w Europie E. C. Slater. Obserwuje się obecnie serię „jubileuszowych” sympozjów poświęconych tym właśnie ludziom, organizowanych w ich sześćdziesiąte, sześćdziesiąte piąte i inne, mniej okrągłe rocznice urodzin. Sympozjum ku czci Davida Greena, zorganizowane przez jego uczniów oraz byłych i aktualnych współpracowników, odbyło się w lutym 1977 r., a materiały w postaci pełnych tekstów wygłoszonych lub nadesłanych z tej okazji referatów ukazały się w rok później w postaci omawianej tu książki.

Zawiera ona 17 rozdziałów napisanych przez ludzi, którzy na swej drodze naukowej zetknęli się w taki czy inny sposób z D. E. Greenem. Polskiego czytelnika może zainteresować fakt, że wśród autorów jest dwoje Polaków: Jerzy Popinigis (Gdańsk) napisał rozdział III o zależnościach między ultrastrukturą a funkcją oddechową mitochondriów, a Elżbieta Zubrzycka (Warszawa) jest wraz z D. H. MacLennanem i innymi współautorką rozdziału XV o sarkoplazmatycznym retikulum. Książka zawiera również krótkie wspomnienia o Greenie napisane przez jego opiekunów naukowych, kolegów i uczniów, a sięgające wstecz aż po rok 1930, oraz wypowiedź samego Greena na temat przeszłych i obecnych a także perspektyw przyszłych badań nad mitochondriami. Green wraz z G. A. Blondinem jest również autorem jednego z rozdziałów, w którym daje wyraz swym poglądom na bioenergetykę mitochondriów.

Trzynaście spośród siedemnastu rozdziałów poświęcone jest specyficznym zagadnieniom „mitochondriologii”, a więc między innymi ultrastrukturze mitochondriów, transportowi jonów, poszczególnym składnikom łańcucha oddechowego i kompleksom enzymatycznym transportującym elektrony oraz syntetyzującym ATP, koncepcjom „sprzężenia energetycznego”, a także biogenezie mitochondriów. Pozostałe rozdziały omawiają ogólne problemy struktury błon biologicznych, rolę lipidów w błonach, mikrosomalne oksydazy i sarkoplazmatyczne retikulum.

Ogólnie biorąc, książka stanowi ciekawy i cenny zbiór informacji z zakresu bioenergetyki i błon biologicznych, choć przyznać trzeba, że niektórzy spośród autorów podobne przeglądy publikowali już w ostatnich latach także w innych wydawnictwach. Czytelnika mniej wprowadzonego w istniejące na terenie bioenergetyki różnice poglądów warto również uprzedzić, że pewne zagadnienia, w szczególności

sprawy współzależności między strukturą a funkcją mitochondriów i poglądy na istotę sprzężenia energetycznego reprezentują w znacznej mierze poglądy szkoły D. E. Greena, nie zawsze podzielane przez innych badaczy.

L. Wojtczak

Advances in Neurochemistry, tom III.

Red. B. W. Agranoff i M. H. Aprison,

Plenum Press, 1978, New York, London, stron 317, cena \$ 39.—

Kolejny tom „Advances in Neurochemistry” zawiera artykuły przeglądowe na tematy z dziedziny neurochemii. Są to:

1. 3-fosfodiesteraza 2,3-cyklicznego nukleotydu (N. R. Sims i P. R. Carnegie)
2. Immunohistochemia antygenów specyficznych dla układu nerwowego (L. F. Eng i J. W. Bigbee)
3. Skład i funkcjonalna organizacja struktur synaptycznych (S. P. Mahadik, H. Tahir, M. Rapport)
4. Wieloraka rola glutaminianu i asparaginianu w tkance nerwowej (R. P. Shank i L. T. Graham, Jr.)
5. Biochemiczne aspekty neurotransmisji w synapsach hamulcowych — rola glicyny (M. H. Aprison i E. C. Daly).

Jak widać z zamieszczonego spisu treści poruszana problematyka dotyczy zarówno zagadnień ogólnych jak i szczegółowych. Redaktorzy tej serii wydawniczej zostawiają poszczególnym autorom całkowitą swobodę jeśli chodzi o sposób przedstawiania poruszanych zagadnień.

Niektóre artykuły są bardzo trudne w odbiorze, dotyczy to przede wszystkim rozdziału pt.: „Makromolekularny skład i funkcjonalna organizacja struktur synaptycznych”, ze względu na zwartą formę i olbrzymi ładunek informacji (398 pozycji piśmiennictwa) a równocześnie bardzo ubogi materiał ilustracyjny, artykuł ten spełnia, według mnie rolę katalogu haseł.

Jedynie dwa artykuły w recenzowanym tomie łączą się ze sobą tematycznie (Rozdziały IV i V). Omówiono w nich rolę aminokwasów jako substancji neurotransmiterowych w układzie nerwowym kręgowców. Aminokwasy (kwas glutaminowy i asparaginowy oraz glicyna) pełnią rolę w ogólnym metabolizmie i przez wiele lat ich pobudzające lub hamujące działanie na układ nerwowy traktowano jako efekt niespecyficzny. W ostatnim dziesięcioleciu nagromadziło się jednak szereg danych neurochemicznych, neurofizjologicznych jak i neurofarmakologicznych, które wskazują, że aminokwasy te spełniają kryteria stawiane substancjom neurotransmiterowym. Autorzy omawiają istniejące jeszcze wątpliwości co do trafności interpretacji niektórych faktów oraz zwracają uwagę na kierunki przyszłych badań. W artykule poświęconym roli glicyny jako neurotransmitera podkreślono konieczność powiązania badań podstawowych z badaniami klinicznymi zwłaszcza w przypadku tęcza, hyperglycynemii i skurczów spastycznych.

Zastosowanie technik immunohistochemicznych do badań antygenów charakterystycznych dla układu nerwowego jest przedmiotem artykułu L. Enga i J. Bigbee. Należy żałować, że autorzy ograniczyli się jedynie do przytoczenia wyników prac eksperymentalnych bez próby ich oceny. Brak też jest sugestii autorów na temat

dalszych możliwości wykorzystania tych technik. Zainteresowanym tą problematyką polecam artykuł W. Stallcupa i M. Cohn — „*Cell — specific antisera as reagents for studying the N. S.*” opublikowany w styczniowym numerze TINS (1979 r.).

Recenzowany tom „*Advances in Neurochemistry*”, podobnie jak i poprzednie tomy tej serii zainteresuje nie tylko neurochemików, ale i neurobiologów oraz lekarzy.

J. Skangiel-Kramska

Contemporary Topics In Molecular Immunology, Tom 7

Red. R. A. Reisfeld i F. P. Inman

Plenum Press, 1978, New York, London, stron 438, cena \$ 47,40

Przedstawiona do oceny książka jest 7-ym z kolei tomem bardzo interesującego, periodycznego wydawnictwa poświęconego problemom współczesnej immunologii. Immunologia stanowi obecnie jedną z najbardziej rozwijających się gałęzi nauki. Ilość uzyskiwanych informacji jest bardzo duża, a wyniki często sprzeczne i trudne do interpretacji. Z tego względu bardzo ważną rolę spełnia seryjne wydawnictwo pt.: „*Contemporary topics in molecular immunology*”, zamieszczające krytyczne artykuły przeglądowe, napisane przez wybitnych specjalistów z różnych dziedzin immunologii.

7 tom omawianej serii zawiera 11 rozdziałów: 1. *Structure and function of serum and membrane immunoglobulin D/IgD* — G. A. Leslie i L. N. Martin; 2. *Analysis of bivalent immunoglobulins and their contributions to understanding the developmental aspects of the antibody response* — D. S. Fair i R. G. Krueger; 3. *Conformational flexibility in immunoglobulins* — A. B. Edmundson, K. R. Ely i E. E. Abola; 4. *The effect of antigen on antibodies: Recent studies* — H. Metzger; 5. *Molecular interactions of cells with antibody and complement: influence of metabolic and physical properties of the target on the outcome of humoral immune attack* — S. H. Ohanian, S. I. Schlager i T. Borsos; 6. *Chemical aspects of the serum anaphylatoxin* — T. E. Hugli; 7. *Hapten-sandwich labeling of cell-surface antigens* — L. Wofsy, C. Henry i S. Cammisuli; 8. *Human DR (Ia-like) antigens: biological and molecular profile* — S. Ferrone, J. P. Allison i M. A. Pellegrino; 9. *The molecular structure and interrelationship of murine T lymphoid cell-surface antigens* — F. Hunter, J. E. Mole i J. C. Bennett; 10. *Functional and structural considerations in the recognition of virus-infected cells by cytotoxic T lymphocytes* — T. J. Braciale, G. L. Ada i K. L. Yap; 11. *Molecular events in lymphocyte activation: role of nonhistone chromosomal proteins in regulating gene expression* — J. M. Decker i J. J. Marchalonis.

W rozdziale 1 Leslie i Martin omawiają osiągnięcia ostatnich lat w zakresie badania biologicznej roli IgD.

Fair i Krueger wyjaśniają, w 2-gim rozdziale, że bivalentna gamopatia jest odzwierciedleniem normalnego różnicowania się komórek produkujących przeciwciała. W rozdziale napisanym przez Edmundsona i wsp. (rozdział 3) omówione jest zagadnienie konformacyjnej elastyczności drobin immunoglobulin. Na podstawie badań rentgenograficznych autorzy omawiają wzajemne położenie regionów Fab i Fc

i wpływ antygenów i haptenu na konformację przeciwciał. Podobne zagadnienia poruszane są przez Metzgera w rozdziale 4. Autor dyskutuje w sposób krytyczny z poglądami na temat allosteryczności przeciwciał.

Ohanian i wsp. w rozdziale 5, przedstawiają hipotezy na temat oddziaływań komórek z przeciwciałami i dopełniaczem. Autorzy wyjaśniają w jaki sposób składniki dopełniacza reagują między sobą i z membranami, powodując uszkodzenie membran i śmierć komórek. Zagadnienie roli składników dopełniacza, C3a i C5a, znanych jako anafilatoksyny dyskutowane jest przez Hugli w rozdziale 6. Autor wyjaśnia wpływ tych składników na uwolnienie histaminy z komórek, na skurcze mięśni gładkich, wzrost przepuszczalności naczyń, oraz wpływ na wielojądrzaste leukocyty i makrofagi.

Korzyści stosowania metody piętnowania haptenu do badania antygenów komórkowych opisywane są przez Wofsy i wsp. w rozdziale 7.

W rozdziale 8, Ferrone i wsp. omawiają strukturę i funkcję antygenów Ia na ludzkich limfocytach B oraz pokrewieństwo tych antygenów do antygeny HLA-D.

Rola antygenów H-2 w oddziaływaniach międzykomórkowych, mechanizm odpowiedzi immunologicznej omawiana jest w rozdziale 9 przez Hunter i wsp. oraz w 10 przez Braciale i wsp.

Decker i Marchalonis opisują procesy aktywacji limfocytów, a w szczególności rolę niehistonowych chromosomalnych białek w regulacji ekspresji antygenowej limfocytów. Autorzy sugerują, że aktywacja genu jest najbardziej istotnym etapem w różnicowaniu się komórek i w funkcji komórek.

Wszystkie rozdziały napisane są w sposób jasny, krytyczny i zaopatrzone w najnowsze odnośniki literaturowe. Wiadomości przedstawione w poszczególnych rozdziałach będą interesujące nie tylko dla specjalistów, ale również dla badaczy z dziedzin pokrewnych: biologów, biochemików.

E. Lisowska

Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 98 Immunobiology of Proteins and Peptides — I.

Red. M. Z. Atassi i A. B. Stavitsky

Plenum Press, 1978, New York, London, stron 524, cena \$ 54.

Jednym z centralnych zagadnień immunologii jest zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływań antygen—przeciwciało oraz rozpoznawanie antygenów przez komórki. Jakkolwiek zagadnienie to jest względnie łatwe do opracowywania w odniesieniu do bardzo prostych substancji o znanej strukturze chemicznej, duże trudności nastroczą badania z zastosowaniem antygenów złożonych, wysokocząsteczkowych, np. białek. Dopiero w ostatnich latach udało się określić determinanty antygenowe myoglobiny i lizozymu. Badania nad innymi białkami są prowadzone obecnie w wielu ośrodkach na świecie. Badania te są bardzo istotne dla wyjaśnienia swoistości komórek rozpoznających dane antygeny oraz dla wyjaśnienia genetycznej kontroli procesu rozpoznawania antygenów. Przedstawiona do oceny książka stanowi 1 tom sprawozdania z Międzynarodowego Sympozjum na temat immunobiologii białek i peptydów, które odbyło się we wrześniu 1977 r. w Minneapolis. Książka podzielona jest na 5 głównych rozdziałów: *Antigenic structure of proteins,*

Immunobiology of proteins and peptides, Immunoresponse to synthetic polymers and to proteins, oraz *Lymphocyte membrane structure*. W obrębie tych głównych rozdziałów zamieszczone są poszczególne artykuły napisane przez najwybitniejszych badaczy tych zagadnień, jak np. Atassi, Schechter, Benjamin, Feldman, Mozes, Schlossman i wielu innych. Głównymi poruszonymi problemami są: a) regulacja syntezy przeciwciał — wydzielanie przeciwciał, ich powinowactwo oraz oddziaływanie antygenów z komórkami B, b) genetyczna kontrola odpowiedzi immunologicznej przeciw białkom, c) funkcje subpopulacji limfocytów, d) markery na błonach limfocytów, e) właściwości rozpuszczalnych stymulatorów i supresorów, f) immunochemia i immunobiologia układów haptenu-nośnika i polimerów aminokwasowych. Zamieszczone w książce artykuły pozwalają na zrozumienie różnic i podobieństw między antygenami oraz wskazują na nowe kierunki badań w tej dziedzinie.

Przedstawiona książka wyczerpująco informuje o dotychczasowych wynikach badań i może stanowić doskonałe źródło dla badaczy pragnących rozpocząć prace na zależności między strukturą i antygenowością białek.

Książka przeznaczona jest raczej dla osób posiadających opanowane podstawy immunologii.

E. Lisowska

E. Beutler

Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism

Plenum Medical Book Company, 1978, stron 266, cena \$ 28,20.

Recenzowana książka została wydana w serii monografii „Topics in Hematology”, której głównym celem jest przedstawienie w zwięzłej formie współczesnego stanu wiedzy na temat podstawowych zagadnień dotyczących metabolizmu komórek krwi i zaburzeń metabolicznych w chorobach krwi. Monografia Ernesta Beutlera, znakomitego znawcy enzymologii krwinki czerwonej, biochemika i klinicysty, wypełnia lukę istniejącą od dawna w piśmiennictwie hematologicznym dotyczącym niedokrwistości hemolitycznych.

Z czterech rozdziałów, na które podzielona jest książka, pierwszy — zatytułowany „Krwinka czerwona” — zawiera niezwykle przejrzysty opis cykli metabolicznych zachodzących w erytrocycie. Opis ten poprzedzony jest krótkim zarysem wiadomości o budowie błony komórkowej krwinki czerwonej, uwzględniającym najnowsze dane o poszczególnych częściach składowych tej specyficznej struktury: poszczególnych warstw lipidowych, i białkowych (spektryny, glikoforyny, białka aktyno-podobnego i innych), ułożeniu przestrzennym tych warstw w stosunku do siebie, co zapewnia niezwykle selektywną przepuszczalność błony dla różnych jonów.

Występująca w krwiince przemiana glukozy w cyklu reakcji Embdena-Meyerhoffa prowadzi do nagromadzenia związków bogatych w energię, i przy udziale reakcji $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ do podstawowej dla funkcji erytrocyta przemiany kwasu 1,3-dwufosfoglicerynowego w kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy regulujący krzywą dysocjacji tlenowej hemoglobiny. Natomiast tzw. cykl pentozowy przy udziale przemiany $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADHP}$ i redukcji glutationu dostarcza substratów dla syntezy nukleotydów. Cykl ten charakterystyczny dla krwinki czerwonej — poza rolę w syn-

tezie nukleotydów zabezpiecza krwinkę przez utrzymywanie glutationu w formie zredukowanej przed uszkodzeniem przez niekontrolowaną reakcję peroksydazową. Opis przemian metabolicznych dodatkowo zaopatrzone jest w tablicę zawierającą szczegółową charakterystykę 25 enzymów krwinki czerwonej.

Na tym tle stają się zrozumiałe zjawiska patologiczne występujące w krwince czerwonej w przypadkach defektów dotyczących poszczególnych enzymów, doprowadzające do hemolizy.

W następujących 3 rozdziałach omówione zostały kolejno:

1. Niedobór dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, co stanowi najobszerniejszy rozdział ze względu na największą częstość występowania tego defektu genetycznego (stwierdzono ten defekt u 16% populacji murzyńskiej Stanów Zjednoczonych), ciężkie objawy kliniczne i możliwość prowokowania hemolizy przez podanie niektórych leków. Autor szczegółowo omawia strukturę dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu, jej własności kinetyczne oraz warianty. W tablicach zestawiona jest częstość występowania defektu w różnych populacjach ludności w niemal wszystkich krajach świata, jak i częstość występowania oraz własności bio- i fizykochemiczne poszczególnych wariantów tego enzymu. Objawy patologiczne wyjaśnione są przejrzysto mechanizmami biochemicznymi prowadzącymi do określonych zmian funkcji komórki. Wiele uwagi autor poświęca omówieniu wszystkich czynników, które mogą wyzwać kryzys hemolityczny u ludzi z tym defektem enzymatycznym, a więc: infekcjom, kwasicy, zetknięciu z bobem (*favizm*), a przede wszystkim lekom. Poza skrupulatnym wyliczeniem leków, które mogą prowokować objawy choroby, przedstawione są również leki, które można bez obawy podawać w tej wadzie wrodzonej. Takie ujęcie stanowi o dużej wartości praktycznej omawianej książki.
2. Niedobór kinazy kwasu pirogronowego — drugi co do częstości występowania defekt enzymatyczny krwinki prowadzący do hemolizy.
3. Inne niedobory enzymatyczne, rzadsze, o mniejszym znaczeniu klinicznym, jednakże ciekawe, czy to z punktu widzenia genetycznego, czy też biochemicznego, jak: niedobory heksokinazy, fosfofruktokinazy, aldolazy, enzymów biorących udział w przemianie gliceraldehydu i redukcji i syntezy glutationu. Stosunkowo obszerną część ostatniego rozdziału stanowią zaburzenia metabolizmu nukleotydów w krwince czerwonej, a wśród nich bardzo interesujący „High ATP Syndrome” i stosunkowo niedawno opisany niedobór nukleotydazy pirymidynowej.

Diagnostyka biochemiczna zaburzeń aktywności każdego z omawianych enzymów podana jest szczegółowo z krytycznym ustosunkowaniem się autora do poszczególnych metod.

Każdy rozdział opatrzone jest bogatym spisem pozycji bibliograficznych, doprowadzonym do końca 1977 roku. Jeden tylko rozdział o niedoborze dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej zawiera 833 pozycje. Już sama bibliografia stanowić by mogła o niezwyklej wartości tej książki.

Książka E. Beutlera „Niedokrwistość hemolityczna w zaburzeniach metabolizmu krwinki czerwonej” stanowi przykład nowoczesnej monografii klinicznej opartej o rzetelną wiedzę biochemiczną. Książka ta uczy współczesnego, biochemicznego podejścia do zjawisk patologicznych w ustroju. Niedarmo też prof. Maxwel Wintrobe — redaktor serii „Topics in Hematology” — światowej sławy hematolog i autor najlepszych podręczników hematologii — w krótkiej przedmowie do książki napisał: „...” monografia dr Ernesta Beutlera długo będzie służyć jako model dla monografii z podstawowych dziedzin nauk medycznych... Powstał tom, który może być uznany naprawdę za ostatnie słowo w tej ważnej dziedzinie”.

Z. Kuratowska

A. S. Prasad

Trace Elements and Iron in Human Metabolism

Plenum Press, Medical Book Company, 1978, New York, London, stron 392, cena 35,40 \$.

Książka stanowi jedną z trzech pozycji serii wydawniczej „Topics in Hematology” (red. M. M. Wintrobe). Pozostałe dwie to: „The respiratory Functions of Blood”—L. Gorby i J. Meldon oraz „Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism”—E. Beutler.

Książka A. S. Prasad jest obszernym przeglądem piśmiennictwa z zakresu biochemii, fizjologii, patologii i toksykologii żelaza oraz najważniejszych pierwiastków śladowych występujących w organizmie człowieka. W pierwszej części zatytułowanej „Essential Elements” (330 stron, około 1500 pozycji piśmiennictwa) omówione zostały pierwiastki niezbędne dla ustroju; takie jak miedź, żelazo, cynk, magnez, mangan, selen, fluor, jod, chrom, a także nikiel, wanad, krzem i cyna. W drugiej części — „Toxic Elements” — kadm, ołów i rtęć (32 strony, 115 pozycji piśmiennictwa). W książce najwięcej uwagi poświęcono cynkowi, żelazu i miedzi zapewne w związku z osobistymi zainteresowaniami autorki, która opublikowała szereg prac z zakresu biochemii i fizjologii tych pierwiastków.

Zgodnie z przyjętym schematem podrozdziałów, przedstawiając w książce kolejne pierwiastki autorka omawiała ich wiązanie narządowe ze szczególnym uwzględnieniem wiązania we krwi, wiązanie z białkami, wchłanianie, metabolizm i wydalanie, rolę danego pierwiastka w ustroju. Bardzo szczegółowo przedstawiła też zmiany biochemiczne oraz objawy kliniczne towarzyszące niedoborom pierwiastków śladowych, a także niektóre jednostki chorobowe związane z zaburzeniami przemiany lub niedoborem metali niezbędnych.

Dla przykładu: w przeglądzie na temat miedzi można znaleźć wiele szczegółów dotyczących zaburzeń związanych z jej niedoborem a charakteryzujących się uszkodzeniem kośćca, tkanki łącznej, schorzeniami naczyniowymi, uszkodzeniem układu nerwowego itp. Po omówieniu najważniejszych enzymów zawierających w cząsteczce miedź (oksydaza cytochromu c, dysmutaza ponad nadtlenkowa, urykaza, oksydazy aminowe) przedstawiono rolę miedzi w metabolizmie żelaza, a następnie metabolizm miedzi (wchłanianie, wiązanie, transport, wydalanie). W punkcie traktującym o podwyższonych poziomach miedzi autorka przedstawiła objawy zatruc związkami miedzi, jak również biochemiczne i patologiczne zmiany występujące w chorobie Wilsona. Informacje dotyczące ceruloplazminy, jej budowy, roli, poziomów we krwi są rozproszone i dość trudne do uchwycenia. Autorka nie wspomina o zmianach w subkomórkowym rozmieszczeniu miedzi w wątrobie zależnych od jej poziomu narządowego. Nieścisle i niepełne są dane o niskocząsteczkowych białkach miedziowych występujących w dużych ilościach w wątrobach zarówno noworodków jak i ludzi cierpiących na chorobę Wilsona. Mitochondroakupreina, o której autorka wspomina, została zidentyfikowana jako metalotioneina w 1974 roku, a rola metalotioneiny w gospodarce miedzią w ustroju była postulowana przez Evansa już w 1973 r.

Poruszenie ogromnej liczby problemów w jednej książce nie pozwoliło uniknąć pobieżnego naświetlenia niektórych z nich. Czytającemu ją biochemikowi zabraknie w wielu miejscach istotnych informacji na temat sposobu wiązania metalu z białkiem (lub inną substancją endogenną) jak również bardziej szczegółowych danych o budowie chemicznej czy mechanizmie działania omawianej metaloproteiny. Lekarz

klinicyście znajdzie niewątpliwie znacznie dokładniejsze dane na temat patologii, patogenezы lub etiologii niektórych schorzeń w fachowym piśmiennictwie medycznym. Zbyt ubogo także opisane są zagadnienia toksykologiczne choć wiadomo, że pierwiastki fizjologicznie niezbędne mogą powodować poważne zatrucia w przypadku nadmiernego obciążenia organizmu.

Ta wybitnie interdyscyplinarna książka może jednak służyć jako źródło bogato cytowanego piśmiennictwa (szczególnie część pierwsza) tym bardziej, że autorka podaje tytuły wszystkich cytowanych prac. Pewne utrudnienie stanowi jednak fakt, że przytaczając nowsze danę autorka odwołuje się często nie do prac oryginalnych lecz przytacza źródła książkowe z lat 1976 i 1977. Są to:

1. Trace Elements in Human Health and Disease, tom I i II, red. A. S. Prasad, Academic Press, N. Y., 1976.

2. Underwood E. J. Trace Elements in Human and Animal Nutrition, wyd. 4, Academic Press, N. Y., 1977.

Bardzo wąski, w porównaniu z pierwszą częścią książki, przegląd zagadnień związanych z biochemią i toksykologią kadmu, ołowiu i rtęci oparty jest również na dwóch wymienionych pozycjach. W tej części autorka przytacza dodatkowo obszerną monografię Friberg L. i wsp. Cadmium in the Environment, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974. W świetle powyższego zdziwienie może budzić brak odnośnika do drugiej podobnej monografii dotyczącej rtęci: Friberg L. i Vostal I. Mercury in the Environment, CRC Press, 1972.

Druga część książki budzi znacznie więcej zastrzeżeń niż pierwsza. W chwili obecnej jednak, gdy zanieczyszczenie środowiska staje się coraz poważniejszym problemem i gdy ukazują się setki prac z zakresu biochemii i toksykologii metali ciężkich, gdy trudno jest opracować przegląd tych zagadnień w tak wielkim skrócie.

Niezależnie jednak od wszystkich wymienionych zastrzeżeń książka może stanowić użyteczną pozycję w bibliotece zarówno lekarza i biochemika, jak i toksykologa.

E. Mogilnicka

Superoxide and Superoxide Dismutases

Red. A. M. Michelson, J. M. McCord i I. Fridovich

Academic Press, 1977, London, New York, stron 568, cena £ 12,5.

Odkrycie w 1969 przez McCorda i Fridovicha aktywności enzymatycznej erytrokuperiny — jako dysmutazy ponadtlenkowej (wg EC, oksydoreduktaza ponadtlenek: ponadtlenek, stosowany skrót SOD) było w znacznym stopniu następstwem szczęśliwego przypadku. Dzisiaj, w niespełna 10 lat od tego wydarzenia, rozmiar wiedzy o dysmutazach ponadtlenkowych i ich roli w metabolizmie tlenu jest tak duży, że — jak pisze Michelson w przedmowie — może być porównywany nawet z takimi osiągnięciami w historii biochemii jak odkrycie struktury DNA przez Watsona i Cricka w 1953.

Recenzowana książka jest wynikiem prac pierwszego seminarium na temat „Superoxide and Superoxide Dismutase”, zorganizowanego przez Europejską Organizację Biologii Molekularnej (EMBO) w 1976, w Banyuls, Francja. Stanowi ona reprezentatywne podsumowanie wiadomości o roli rodniko-jonu ponadtlenkowego

i dysmutaz ponadtlenkowych w metabolizmie komórki, zarysowując jednocześnie perspektywy rozwoju tej dyscypliny nauki i ewentualnego jej zastosowania w praktyce. Pozycja ta jest, jak dotychczas jedynym, poświęconym w całości tej tematyce wydawnictwem książkowym i dobrze się stało, że zadbano w niej by prezentowane problemy były możliwie bogato udokumentowane graficznie i zaopatrzone we współczesne piśmiennictwo.

Zebrany w książce materiał podzielony jest z konieczności na 45 krótkich rozdziałów, będących w większości pracami eksperymentalnymi. Można je jednak połączyć w pięć spójnych tematycznie grup. A oto poruszana w nich tematyka:

1. Metodyka badania reakcji katalizowanej przez SOD,
2. Rodniko-jon ponadtlenkowy jako substrat SOD,
3. Przegląd właściwości różnych form SOD, ze szczególnym uwzględnieniem relacji między strukturą a ich funkcją,
4. Rola SOD i jej substratu w metabolizmie komórki,
5. Zastosowanie kliniczne SOD.

Część pierwszą (2 rozdziały) poświęcono przeglądowi metod stosowanych do oznaczania aktywności SOD. Zwrócono szczególną uwagę na trudności w porównaniu wyników otrzymywanych różnymi metodami oraz na konieczność wprowadzenia możliwie uniwersalnej jednostki aktywności tego enzymu, niezbędnej chociażby przy diagnostycznej ocenie zmian aktywności.

Część druga książki obejmuje 11 rozdziałów i omawia właściwości fizyko-chemiczne oraz możliwości powstawania (wytwarzania) rodniko-jonu ponadtlenkowego w układach „in vivo” i „in vitro”. Zaakcentowano w niej także toksyczny charakter tego związku dla struktur biologicznych.

W kolejnej, trzeciej części (13 rozdziałów), przedstawiono dane dotyczące struktury oczyszczonego enzymu — erytrokuperiny oraz wyjaśniono mechanizm oddziaływania enzymu z substratem oparty na rezultatach badań kinetyki katalizowanej przez ten enzym reakcji. Ponadto omówiono wszystkie znane formy dysmutaz ponadtlenkowych, enzymów — jak się okazuje — charakterystycznych dla wszystkich organizmów tlenowych.

Część czwartą recenzowanej książki (13 rozdziałów) poświęcono wynikom badań funkcji metabolicznych SOD. Zaproponowano, częściowo hipotetyczny, mechanizm działania SOD w procesie fagocytozy bakterii przez leukocyty wielojądrowe ssaków, a także w procesach zabezpieczania mitochondriów i chloroplastów przed toksycznym działaniem rodniko-jonu ponadtlenkowego.

W części piątej (4 rozdziały) zasygnalizowano możliwości diagnozowania niektórych stanów patologicznych u ssaków (także u człowieka), opierając się na pomiarach aktywności SOD w surowicy krwi, a także zastosowania SOD lub jej „analogów” (orgoteina) jako leków przeciwzapalnych.

Recenzowana książka zawiera ponadto dwa rozdziały uzupełniające: pierwszy poświęcony historii odkrycia reakcji dysmutacji katalizowanej przez SOD i drugi krótko podsumowujący zawarty w książce materiał. Jednocześnie, jakkolwiek większość autorów dyskutuje prezentowane wyniki z danymi już opublikowanymi, szkoda, że w tej bogatej w kontrowersje publikacji zabrakło części poświęconej głosom w dyskusji uczestników seminarium.

W sumie, książka ta zawiera bardzo bogaty materiał eksperymentalny nierzadko poparty przejrzystymi wywodami teoretycznymi i stanowi przez to istotną pozycję w bieżącej literaturze naukowej. Z uwagi jednak na interdyscyplinarny charakter poruszanych zagadnień, przeznaczona jest ona raczej dla pracowników nauki, niekoniecznie biochemików, z pewnym stażem naukowym.

Dietary Fats and Oils in Human Nutrition

FAO Food and Nutrition Paper, Report of an Expert

Consultation FAO/WHO, Rzym, 21—30.09.1977, stron 94.

We wrześniu 1977 r. w Rzymie odbyła się konferencja ekspertów FAO i WHO poświęcona problematyce tłuszczów i olejów jadalnych w wyniku której opublikowano raport liczący 94 strony.

Jest to oficjalny dokument FAO i WHO odnośnie roli tłuszczów i olejów jadalnych w żywieniu człowieka. Znaczenie tych obrad jest bardzo doniosłe ze względu na fakt, że nawet w krajach wysoce rozwiniętych gospodarczo szerzą się choroby związane z niewłaściwym żywieniem. Tłuszcze w żywieniu człowieka stanowią problem złożony i kontrowersyjny.

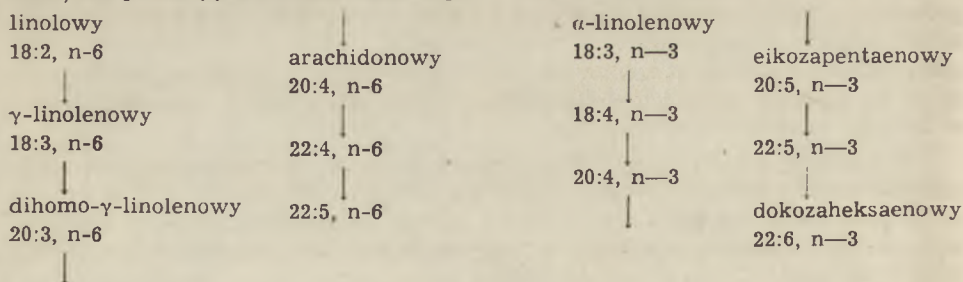
W ciągu ostatnich lat poczyniono znaczne postępy w badaniach nad wpływem spożywanych tłuszczów na organizm człowieka w wyniku których powstała potrzeba rewizji dotychczasowych poglądów odnośnie wartości tłuszczów jadalnych. Przy czym rysują się tu dwa podstawowe zagadnienia: znaczenie tłuszczów w żywieniu człowieka i aspekty bezpieczeństwa dla zdrowia człowieka. Opracowanie ekspertów FAO/WHO jest syntezą referatów przedstawionych na konferencji, zawiera dziesięć zasadniczych rozdziałów i wnioski.

Po wprowadzeniu w rozdziale pierwszym, rozdział drugi omawia podstawowe pojęcia i definicje dotyczące tłuszczów, olejów, ich klasyfikację oraz nomenklaturę niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Kolejne rozdziały zajmują się następującymi problemami: 1) tłuszcze jako źródło energii, 2) zastosowanie tłuszczów w żywieniu dorosłych i dzieci, 3) niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe, 4) rola NNKT we wczesnym rozwoju człowieka, 5) rola tłuszczów w prewencji i leczeniu choroby wieńcowej, otyłości i cukrzycy, 6) wpływ procesów technologicznych na wartość żywieniową tłuszczów i olejów, 7) uwagi ogólne ze szczególnym uwzględnieniem oleju rzepakowego oraz częściowo utwardzonego tłuszczu ryb morskich zawierającego długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe, 8) ostatnie tendencje produkcji, handlu i konsumpcji tłuszczów i olejów, 9) wpływ hodowli zwierząt i uprawy roślin na jakość i skład tłuszczów zwierzęcych i roślinnych.

Opracowanie zamykają wnioski końcowe zawierające sugerujące kierunki dalszych badań w tej dziedzinie.

Szczególnie interesujące wydają się uwagi zawarte w rozdziałach dotyczących NNKT.

Do niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych zaliczane są kwas linolowy ($C_{18:2, n-6}$) i kwas α -linolenowy ($C_{18:3, n-3}$) oraz powstające ich metabolity o dłuższych łańcuchach węglowych np. kwas arachidonowy ($C_{20:4, n-6}$) i kwas γ -linolenowy ($C_{18:3, n-6}$) powstające z kwasu linolowego:



(n — oznacza numer atomu węgla przy którym występuje pierwsze podwójne wiązanie licząc kolejność węgli od grupy metylowej CH_3).

W wyniku ostatnich badań stwierdzono, że minimalne zapotrzebowanie na niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT) u człowieka zdrowego jest pokryte jeżeli dostarczają one 3% ogólnej kaloryczności całodziennego pożywienia.

W okresie ciąży i karmienia niemowląt przez kobietę zalecane są większe ilości NNKT w pożywieniu. W okresie ciąży procent energii pochodzącej z NNKT powinien wynosić 4,5%, a dla matek karmiących 5—7% energii pochodzącej z NNKT.

Preparaty mleczne dla niemowląt powinny zawierać te same ilości NNKT co mleko dobrze odżywionej matki zawierające niezbędne nienasycone długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, a stosunek kwasów z rodziny n-6 do kwasów z rodziny n-3 powinien wynosić 5:1.

Stwierdzono ostatnio, że w mleku zdrowej dobrze odżywionej kobiety kwasy nienasycone długołańcuchowe $C_{20:3, n-6}$, $C_{20:4, n-6}$, $C_{22:4, n-6}$ i $C_{22:5, n-6}$ stanowią około 1% ogólnej ilości kwasów tłuszczowych, a kwasy $C_{20:5, n-3}$, $C_{22:2, n-3}$, i $C_{22:6, n-3}$ około 1,3% przy ogólnej zawartości wszystkich NNKT wynoszącej około 12,4% wszystkich kwasów tłuszczowych. NNKT zawarte w mleku zdrowej dobrze odżywionej matki dostarczają dziecku 5—6% ogólnej ilości Kalorii z tego 4—5% Kalorii pochodzi z kwasu linolowego $C_{18:2, n-6}$ i z kwasu α -linolenowego $C_{18:3, n-3}$, a 1% Kalorii z kwasów tłuszczowych o dłuższych łańcuchach (C_{20} i C_{22}). W ustroju kobiety podczas przemiany kwasów $C_{18:2, n-6}$ i $C_{18:3, n-3}$ do kwasów o dłuższych łańcuchach (C_{20} i C_{22}) następują straty stanowiące 1—2% energii, co uwzględnia się przy zwiększonych zaleceniach ilości NNKT dla kobiety karmiącej (5—7% ogólnej ilości Kalorii).

Stwierdzono również występowanie dużych ilości kwasów nienasyconych $C_{20:4, n-6}$ i $C_{22:6, n-3}$ w łożysku i tkankach płodu, głównie w fosfolipidach mózgu i wątroby. W związku z rozwojem płodu wzrasta zapotrzebowanie na NNKT i dlatego u kobiet ciężarnych zwiększono zalecaną ilość NNKT o 1,5% (w przeliczeniu na Kalorie) ponad zapotrzebowanie podstawowe.

W wyniku doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach stwierdzono, że niedobory NNKT w pożywieniu samicy ciężarnych obok niedoborów białkowych powodowały upośledzenie rozwoju mózgu płodu oraz wpływały na zwiększenie ilości martwych płodów.

Racja pokarmowa ludzi wykazujących ryzyko choroby wieńcowej, w otyłości lub cukrzycy powinna dostarczać 10—15% energii z białka, 30—35% z tłuszczu z obniżoną zawartością nasyconych kwasów tłuszczowych przy poziomie kwasu linolowego stanowiącego 1/3 wszystkich kwasów tłuszczowych. Zawartość cholesterolu nie powinna przekraczać 300 mg dziennie.

W ciągu ostatnich dziesięciu lat rola i znaczenie NNKT stały się przedmiotem wielu prac badawczych. Dotychczas głównie zwracano uwagę na znaczenie kwasu linolowego ($C_{18:2, n-6}$). Ostatnie badania wykazały, że kwas α -linolenowy ($C_{18:3, n-3}$) i jego metabolity 20 i 22 węglowe ($C_{20:5, n-3}$ i $C_{22:5, n-3}$) odgrywają specyficzną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu niektórych tkanek głównie mózgu i siatkówki oka. Dlatego należy uważać kwas α -linolenowy za niezbędny składnik pożywienia.

Ostatnio jako kryterium niedoborów NNKT w ustroju przyjmuje się stosunek kwasów $C_{20:3, n-9}$ *) do $C_{20:4, n-6}$ w fosfolipidach surowicy krwi zamiast przyjętego w 1964 r. kryterium wyrażonego stosunkiem całkowitej ilości kwasów trójnienasyconych do czteronienasyconych. Według ostatnich poglądów stosunek ten nie powinien przekraczać 0,2.

Ponadto przyjęto kilka innych parametrów opartych na analizie kwasów tłuszczowych lipidów surowicy krwi. W niedoborze NNKT podnosi się poziom $C_{18:1, n-7}$, $C_{18:1, n-9}$ i $C_{20:3, n-9}$ przy jednoczesnym zmniejszeniu poziomu kwasów z rodziny n-6.

Zawartość kwasu linolowego ($C_{18:2, n-6}$) w estrach cholesterolu surowicy krwi może być także używana jako wskaźnik zapotrzebowania ustroju na NNKT.

*) Kwas eikozatrienowy, metabolit kwasu oleinowego ($C_{18:1, n-9}$).

Również znając zawartość kwasów tłuszczowych fosfolipidów surowicy krwi można obliczyć procent Kalorii pochodzących z kwasu linolowego z wzoru:

$$\log_{10} \text{ kwasu linolowego} = 0,079 (C_{18:2, n-6} + C_{20:4, n-6} - C_{20:3, n-9}) - 1,9 \quad (I)$$

w którym kwas linolowy jest wyrażony w procentach ogólnej kaloryczności spożytej racji pokarmowej, a trzy pozostałe kwasy tłuszczowe są wyrażone w procentach ogólnej ilości kwasów tłuszczowych fosfolipidów surowicy krwi u dzieci. Dla zdrowych dzieci karmionych piersią otrzymano wynik 5,1% Kalorii stosując wzór I a stosując wzór II otrzymano wynik 4, 8% Kalorii:

$$\log_{10} \text{ kwasu linolowego} = 5,8 (\log_{10} \text{ wszystkich kw. } n-6) - 8,5 \quad (II)$$

Nieprawidłowość w przemianie kwasu linolowego $C_{18:2, n-6}$ do $C_{20:4, n-6}$ może być wykryta przez wyliczenie stosunku $C_{18:2, n-6}$ do $C_{20:4, n-6}$. Normalnie u dzieci ten stosunek wynosi $1,67 \pm 0,62$ podczas gdy w ostrym niedoborze NNKT około 1,2.

Spośród przedstawionych w niniejszym opracowaniu 19 kierunków przyszłych badań, na szczególną uwagę zasługują następujące problemy:

- Badania nad zapotrzebowaniem na NNKT ze szczególnym uwzględnieniem roli tych kwasów w ustroju oraz ich ilości niezbędnych dla wzrostu, regeneracji tkanek i biosyntezy prostaglandyn.
- Poszukiwania nowych kryteriów oceny niedoborów NNKT u ludzi.
- Badania mające na celu określenie optymalnego zapotrzebowania ustroju na NNKT z uwzględnieniem wieku oraz różnych stanów fizjologicznych (ciąża, laktacja).
- Wpływ dodatkowego pożywienia zawierającego NNKT na stan zdrowia i stan odżywiania dzieci karmionych piersią przez źle odżywione matki i dzieci wcześniej odstawionych od piersi.
- Badania nad wpływem zmian składu kwasów tłuszczowych w pożywieniu na skład lipidów surowicy krwi u dzieci.
- Dalsze badania nad rolą tłuszczów w etiopatogenezie choroby wieńcowej.
- Zastosowanie ulepszonych bardziej precyzyjnych metod analitycznych oznaczania zawartości witaminy E w pożywieniu.
- Wpływ przeciwutleniaczy na metabolizm NNKT.
- Dalsze badania nad olejem rzepakowym mające na celu znalezienie innej substancji poza kwasem erukowym — odpowiedzialnej za zmiany w sercu u zwierząt.
- Opracowanie bardziej nowoczesnych metod analitycznych oznaczania kwasów tłuszczowych *cis* i izomerów *trans* w pożywieniu.

Omawiana publikacja ta jest niezwykle cenna, bardzo zwięźle przedstawiono rolę tłuszczu w żywieniu człowieka. Jednocześnie dość bogato uzupełniona jest materiałem tabelarycznym zawierającym dane o składzie tłuszczów, ich produkcji i dystrybucji. Zwraca również uwagę na pożądane zmiany w stosowanych procesach technologicznych.

G. Okolska

Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins

Red. Mendel Friedman

Plenum Press, 1978, New York, London, stron 882, cena \$ 83,40.

Książka stanowi zbiór 40 głównych referatów przedstawionych na Sympozjum pt.: „Improvement of Protein Nutritive Quality of Foods and Feeds”, w Chicago 1977 r.

Według szacunkowych danych ponad 500 milionów ludzi cierpi obecnie na niedobór białka w pożywieniu. Liczba osób cierpiących na niedożywienie białkowe narasta z każdym rokiem w miarę przyrostu naturalnego ludności, za którym niestety nie podąża odpowiedni przyrost ilości żywności. Istnieje zatem konieczność szybkiego zwiększenia produkcji żywności a szczególnie pełnowartościowego białka zarówno na zaspokojenie bezpośrednich potrzeb konsumpcyjnych ludności oraz pośrednio na pokrycie potrzeb żywienia zwierząt hodowlanych.

Wartość biologiczna białka tj. wartość żywieniowa zależy od jego składu aminokwasowego, a szczególnie od zawartości aminokwasów egzogennych. Wiele produktów spożywczych, szczególnie pochodzenia roślinnego, wykazuje mniejszą wartość biologiczną białka, ze względu na niską zawartość wielu aminokwasów egzogennych. Szczególnie odnosi się to do białek zbożowych wykazujących mniejszą zawartość takich aminokwasów jak izoleucyna, lizyna, treonina i tryptofan oraz roślin strączkowych, które są często ubogim źródłem metioniny.

W celu dostarczenia właściwego białka wzrastającej stale na kuli ziemskiej ludności (ok. 2% rocznie) należy podjąć wielokierunkową akcję w dziedzinie rolnictwa, hodowli oraz przetwórstwa żywności. Trzeba zmobilizować w większym stopniu niż dotychczas środki w dziedzinie uzyskiwania nowych odmian roślin i zwierząt hodowlanych oraz w przetwórstwie żywności. Należy w tym celu zaangażować genetyków, chemików i technologów żywności oraz biochemików, żywieniowców, dietetyków, lekarzy, toksykologów żywności a także ekonomistów zajmujących się zagadnieniami produkcji żywności i wyżywienia.

W związku z tym została zorganizowana międzynarodowa konferencja celem kompleksowego omówienia problemów związanych z produkcją żywności zawierającej pełnowartościowe białko (nowe odmiany wysokobiałkowych roślin, nowe odmiany zwierząt hodowlanych), nowoczesnym przetwórstwem żywności i wytwarzaniem pełnowartościowych produktów spożywczych o najkorzystniejszym składzie aminokwasowym białek, łącznie ze wzbogacaniem w odpowiednie aminokwasy produktów niepełnowartościowych. Szczególną uwagę zwrócono na omówienie nowoczesnych procesów technologicznych w przetwórstwie żywności, mających na celu jak największą ochronę białka w procesie obróbki chemicznej i termicznej. Uwzględniono także chemiczną i mikrobiologiczną syntezę egzogennych aminokwasów a także zagadnienia interakcji pomiędzy aminokwasami lub białkiem a innymi składnikami żywności w procesie jej produkcji i magazynowania. Osobnym tematem obrad były aspekty gospodarcze dotyczące kosztów wytwarzania oraz wzbogacania żywności. Przeprowadzono także weryfikację metod dotyczących biologicznej oceny białek ze szczególnym uwzględnieniem procesów przyswajania białka wzbogaconego w aminokwasy a także zagadnienia antagonizmu pomiędzy poszczególnymi aminokwasami w procesie przemian metabolicznych.

Dużo miejsca poświęcono specjalnym preparatom białkowym stosowanym w dożywianiu dzieci i młodzieży w krajach rozwijających się. Poruszone zostały także zagadnienia norm zapotrzebowania na białko i aminokwasy. Zagadnienia te zostały

przedstawione w referatach, z których ponad połowa zamówiona została specjalnie przez komitet organizacyjny sympozjum.

Monografia ta jest więc zbiorem doniesień z prac doświadczalnych oraz specjalnie zamówionych referatów wodzących. Ogółem zawiera ona 40 referatów opracowanych przez wybitnych specjalistów — genetyków, chemików, biochemików, technologów, fizjologów i żywniowców.

Warto zwrócić szczególną uwagę na następujące prace:

1. R. P. Abernathy i S. J. Ritchey: *Position paper on RDA for protein for children*. W pracy tej poruszono zagadnienia norm zapotrzebowania na białko dla dzieci. Podkreślono, że *Recommended Dietary Allowances* (RDA) ulegają co 5 lat rewizji w celu określenia zapotrzebowania na białko zgodnie z aktualnym stanem wiedzy. Podkreślono, że w 1958 r. zalecane normy na białko dla dzieci w wieku 7—9 lat wynosiły 60 g/dzień i uległy obniżeniu do 36 g w roku 1974, tj. uległy zmniejszeniu o około 40%. W pracy tej wykazano, że przy typowym mieszanym pożywieniu amerykańskim, należy zabezpieczyć spożycie około 45 g białka/dzień. Jeżeli uwzględnimy margines bezpieczeństwa wynoszący 30%, wówczas norma spożycia wyniesie około 58,5 g białka/dzień.

Warto nadmienić, że w nowszym piśmiennictwie światowym przedstawiono poglądy, świadczące o konieczności rewizji zbyt niskich norm spożycia białka, proponowanych przez ekspertów FAO/WHO. Zagadnienia te zostały ostatnio przedstawione w polskim piśmiennictwie („Białko i tłuszcze w żywieniu człowieka”, red. S. Ziemiański, Wyd. Wszechnica Polskiej Akademii Nauk. Problemy Naukowe Współczesności. Ossolineum — Wrocław 1979).

2. Helen E. Clark, Marie F. Brewer, Lynn B. Bailey: *Effect on nitrogen retention by adults of different proportions of indispensable amino acids in isonitrogenous cereal-based diets*. W pracy tej przedstawiono wyniki różnorodnych badań przeprowadzonych na młodych dorosłych mężczyznach, którym podawano w pożywieniu białka roślinne wzbogacane w aminokwasy w różnych zestawieniach. Zaproponowano najkorzystniejszy zestaw produktów białkowych, zawierających niepełnowartościowe białko.

3. Hamish N. Munro: *Nutritional Consequences of excess amino acid intake*. W pracy poruszono możliwe niekorzystne następstwa nadmiernego spożycia aminokwasów i niebezpieczeństwa związanego z niekontrolowanym wzbogacaniem żywności w aminokwasy.

4. Gene A. Spiller, Joan E. Gates: *Defining dietary plant fibers in human nutrition*. Autorzy przedstawiali wiele cennych danych odnośnie błonnika pożywienia łącznie z definicją chemiczną i kliniczną a także metodami oznaczania tego ważnego składnika pożywienia. Jak wiadomo błonnik nie jest trawiony i wykorzystany przez człowieka lecz jest niezbędny w pożywieniu ze względu na jego rolę w regulacji czynności motorycznej przewodu pokarmowego.

Wiele prac poświęcono wzbogacaniu białka i jego produkcji łącznie z możliwością wykorzystania niekonwencjonalnych źródeł białka z zastosowaniem nowych metod chemicznych i mikrobiologicznych oraz współczesnych metod oznaczania aminokwasów i białka.

Bardzo cennym uzupełnieniem 39 prac, przedstawionych w omawianej monografii jest praca M. Friedmana pt.: *Glossary of abbreviations and definitions of nutritional terms*, w której przedstawiono alfabetycznie skróty terminów i ich wytłumaczenie, stosowanych w piśmiennictwie żywniowym w zakresie białek i aminokwasów.

Monografia jest cennym źródłem współczesnej informacji nt. aminokwasów i białka w żywieniu człowieka i zwierząt hodowlanych.

S. Ziemiański

D. De Nettancourt

Incompatibility in angiosperms,

Monographs on theoretical and applied genetics, 3,

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, XIV+230 stron.

Zjawiska niezgodności odgrywają wielką rolę w życiu roślin, wpływając na strukturę genetyczną ich populacji. W ujęciu autora omawianej książki terminem niezgodność należy obejmować tylko te przypadki, w których ziarno pyłku padające na znamię albo zupełnie nie kiełkuje, albo łagiewka pyłkowa degeneruje w trakcie penetracji znamienia lub szyjki słupka. Mówimy więc o niezgodności tylko wówczas, gdy niemożliwe jest dokonanie zapłodnienia. Tak zdefiniowana niezgodność może zapobiegać wsobności przez niedopuszczenie do samozapłodnienia (tzw. samoniezgodność) lub ograniczać krzyżowanie pomiędzy organizmami o bardzo różnych genotypach i stanowi wówczas jedną z barier izolacyjnych (niezgodność międzygatunkowa *).

Większą część książki poświęcono samoniezgodności, jako zjawisku znacznie lepiej i wszechstronnie poznanej. Dużą zasługą autora jest zebranie rozproszonych w trudno często dostępnych źródłach wyników badań dotyczących najróżnorodniejszych aspektów tego zjawiska. Obraz, który się w czasie czytania książki wyłania, jest niejednokrotnie intrygujący a zawsze interesujący. Istotą zjawiska samoniezgodności wydaje się być rozpoznanie ziarna pyłku o odpowiednim fenotypie przez znamię lub szyjkę słupka. To rozpoznanie przypomina zjawiska immunologiczne u zwierząt, ale tutaj wynikiem jest odrzucenie pyłków mających ten sam fenotyp co słupek. Mowa tu o fenotypie, ponieważ zdolność rozpoznania warunkują substancje białkowe produkowane albo przez roślinę macierzystą, albo przez ziarno pyłku, a znajdujące się w ścianie ziarna pyłku. W pierwszym przypadku tworzą się one w tapetum pylników i odkładane są w zewnętrznych warstwach ścian. Reprezentują wówczas jeden fenotyp niezależnie od genotypu ziarna (które to genotypy segregują, w przypadku heterozygot, w stosunku 1:1). Gdy omawiane substancje wytwarzane są przez samo ziarno pyłku, odkładają się w wewnętrznych warstwach ściany i wówczas fenotyp ziarna zgodny jest z jego genotypem. W pierwszym przypadku mówimy o sporofitowym, w drugim zaś o gametofitowym systemie samoniezgodności. Rozpoznanie pyłku uruchamia następnie słabo poznane procesy metaboliczne warunkujące albo normalny wzrost łagiewki lub też jego wyraźne zahamowanie. Nasze wiadomości na temat mechanizmu takiego hamowania są bardzo nikłe: z pięknych obrazów ultrastrukturalnych otrzymanych przy pomocy mikroskopu elektronowego wynika jednak niedwuznacznie, że zmiany w metabolizmie hamowanych łagiewek są bardzo daleko idące.

Szczegółowo przedstawiono także w monografii podłoże genetyczne samoniezgodności. Jak to od dosyć dawna wiadomo, mechanizmy genetyczne są tutaj na ogół dosyć proste. Osobliwością, znaną także dosyć powszechnie, jest fakt, że niektóre geny (zwane genami S) występują w niespotykanej gdzie indziej liczbie alleli — może ich być nawet kilkadziesiąt w obrębie jednej, niewielkiej nawet populacji

* To podkreślenie definicji zjawiska niezgodności wydaje się konieczne, ponieważ termin ten stosowany jest w różnych znaczeniach. Z jednej strony bowiem używa się go (najczęściej) jedynie dla przypadków uniemożliwienia samozapłodnienia) a więc w sensie *self-incompatibility* — samoniezgodność w ujęciu de Nettancourt'a), z drugiej zaś włącza się tu także zakłócenie w rozwoju utworzonych zygot (*postfertilisation incompatibility* — por. np. Słownik terminów genetycznych, PWN, 1974).

roślinnej. Każdy z tych alleli produkuje oczywiście odmienne białko, które można odróżnić za pomocą reakcji immunochemicznych. Niezwykłą właściwością locus S jest dalej i to, że dotychczas nie udało się, mimo wielokrotnych prób, otrzymanie nowych alleli tego genu na drodze stosowania środków mutagennych (zarówno promienionowania jak i mutagenów chemicznych), choć allele takie tworzą się często samorzutnie w trakcie stosowania chowu wsobnego. Jest to zagadnienie, które może rzucić wg autora nowe światło na mechanizmy działania sztucznych mutagenów u roślin.

Jak powiedziano wyżej, autor zalicza do zjawisk niezgodności także uniemożliwienie zapłodnienia komórki jajowej przez ziarna pyłku wyprodukowane przez inny gatunek, nazywając zjawisko takie niezgodnością międzygatunkową. Choć zjawisko niezgodności międzygatunkowej poznano znacznie słabiej niż samoniezgodność, to jednak zdaje się nie ulegać wątpliwości, że zasadnicze mechanizmy są w obu przypadkach bardzo podobne i polegają na chemicznym rozpoznawaniu ziarna pyłku. W przypadku jednak niezgodności międzygatunkowej odrzucane są ziarna obce. Tak więc ten sam podstawowy mechanizm rozpoznawania białek służy z jednej strony jako środek zapobiegający nadmiernej wsobności, z drugiej jako bariera uniemożliwiająca przepływ genów między populacjami należącymi do różnych gatunków. Tę część książki potraktowano bardziej pobieżnie i nie tak przekonująco jak pierwszą mówiącą o samoniezgodności. Wszystko to zapewne z faktu bardzo słabego poznania zagadnień niezgodności międzygatunkowej.

Książkę kończy rozdział ukazujący perspektywy badań nad niezgodnością. Mają one z jednej strony aspekt wybitnie praktyczny, służący, jak to autor określił „udoskonaleniu naszych umiejętności udomowienia systemu rozmnażania roślin wyższych” („The improvement of our capacity to domesticate the breeding system of higher plants”). Z drugiej zaś strony mogą służyć jako model w szeregu badań podstawowych, takich jak: wyjaśnienie działania genów i jego regulacji u organizmów eukariotycznych, oraz mechanizmów biochemicznych dominacji, epistazy i innych interakcji między genami; rola białek jako sygnałów biologicznych — może to mieć znaczenie dla zagadnień odporności immunologicznej a także biologii układu żywi-ciel-pasożyt. Można by jeszcze dodać, że badania niezgodności mogą mieć ogromne znaczenie dla poznania procesów morfogenetycznych u roślin. Jest bowiem coraz bardziej oczywiste, że w przekazywaniu informacji z komórki do komórki obok stosunkowo wolno działających hormonów roślinnych muszą grać rolę zjawiska przebiegające na powierzchni komórki, analogicznie jak to się dzieje u zwierząt. Ten aspekt naświetlony jest doskonale w niedawno opublikowanym artykule przeglądowym innego wybitnego znawcy zjawisk niezgodności, J. Heslopa-Harrisona (*Genetics and physiology of angiosperma incompatibility systems*, Proc. R. Soc., Lond. B 202, 73—92, 1978). Artykuł ten polecić można jako znakomite uzupełnienie recenzowanej książki. Nie ulega wątpliwości, że niezgodność może być atrakcyjną dziedziną badań biochemicznych.

Książkę napisano jasno, wydana na kredowym papierze, zawiera szereg doskonałych zdjęć z mikroskopu elektronowego. Autor zamieszcza szereg pomysłowych diagramów ułatwiających zrozumienie nie zawsze przecież prostych zagadnień. Książka może być niewątpliwie wzorem monografii naukowej — łączy bowiem wszechstronność opracowania z syntetycznym, oszczędnym przedstawieniem wszystkich zagadnień — cały tekst liczy zaledwie 200 stron. Bogaty (liczący ponad 500 pozycji) spis literatury oryginalnej pozwala na szczegółowe zapoznanie się z poszczególnymi zagadnieniami. Z zauważonych usterek najpoważniejszą jest mylne objaśnienie ry-ciny 12 na stronie 60. Fotografie a i b są niewątpliwie obrazami całych ziarn pyłku, natomiast c i d fragmentami powierzchni ścian komórkowych.

J. Szweykowski

G. R. Waller, E. K. Nowacki

Alkaloid Biology and Metabolism in Plants

Plenum Press 1978, New York, stron 294, cena \$ 27.

Ogromny postęp w dziedzinie biochemii i fizjologii alkaloidów przyczynił się do możliwości bliższego ich scharakteryzowania nie tylko jako szeroko stosowanych w medycynie leków, ale również do poznania takich zagadnień jak: miejsce i drogi ich powstawania, wpływ na te procesy czynników genetycznych czy środowiska, rola w roślinie oraz powiązanie z innymi związkami. Omówienie tych problemów znaleźć można w książce Wallera i Nowackiego. Zawiera ona 249 stron treści, 24 strony piśmiennictwa i 20 stron indeksu autorskiego. Jest bogato ilustrowana rysunkami, fotografiami, tabelami, schematami, wzorami i wykresami. Treść podzielona jest na wstęp i sześć rozdziałów. Każdy rozdział zakończony jest krótkim podsumowaniem i wnioskami.

We wstępie autorzy omawiają powody, dla których problemy związane z badaniami alkaloidów są wciąż w centrum uwagi wielu nauk farmaceutycznych, medycznych, biologicznych, chemicznych i rolniczych.

Rozdział pierwszy poświęcony jest zagadnieniom możliwości wykorzystania alkaloidów w badaniach taksonomicznych, jako wskaźnika pokrewieństwa filogenetycznego. Autorzy omawiają występowanie analogicznych alkaloidów w blisko spokrewnionych taksonach oraz w znajdujących się bardzo odległych od siebie jednostkach systematycznych. Zwracają uwagę na konieczność poznania drogi powstawania alkaloidów, na możliwość znalezienia nie tylko wspólnych dla alkaloidów prekursorów, ale i związków zbliżonych bardzo budową do alkaloidów np. aminoalkoholi, które mogą mieć bardziej istotne znaczenie z punktu widzenia taksonomii niż alkaloidy. Podkreślają też, że alkaloidy mają mniejsze znaczenie jako wskaźniki filogenetycznego pokrewieństwa w przypadku dużych jednostek systematycznych, natomiast w obrębie małych mogą mieć ogromne znaczenie.

W rozdziale drugim autorzy szeroko omawiają szereg doświadczeń, które wskazują na wpływ genów dominujących i recesywnych na powstawanie alkaloidów. Na przykładach głównie alkaloidów chinolizydynowych, pirydylopirolowych, bądź pochodnych morfanu wyjaśniają powstawanie krzyżówek o różnych zawartościach i różnym składzie zespołu alkaloidów.

Rozdział trzeci poświęcono zagadnieniom wpływu czynników środowiska takich jak światło, woda, klimat, rodzaj i zasobność gleby na powstawanie alkaloidów.

Rozdział czwarty omawia miejsce powstawania oraz nagromadzania się alkaloidów. Najczęściej powstają one w młodych szybko rosnących tkankach przy czym w określonych gatunkach synteza zachodzi w różnych organach jako korzeń czy część nadziemna rośliny w innych we wszystkich częściach. Młode owoce i nasiona są zwykle bogate w alkaloidy, przy czym niektóre owoce tracą te zdolności w miarę dojrzewania. Procesy, które przyspieszają wzrost roślinny zwykle wpływają na zwiększenie produkcji alkaloidów.

W rozdziale piątym omawiana jest rola alkaloidów. Autorzy dyskutują 5 znanych hipotez niekiedy kontrowersyjnych. I tak przytaczają przykłady kiedy alkaloidy działają stymulująco, bądź hamują wzrost innych roślin — nie mogą jednak być uważane za regulatory wzrostu. Niektóre alkaloidy wykazują wyraźne działanie fungistatyczne, inne jednak działają stymulująco na wzrost grzybów, które mogą je nawet wykorzystywać jako źródła węgla do swego wzrostu. Przegląd doświadczeń wskazuje raczej na pewną rolę jaką odgrywać mogą alkaloidy w ochronie roślin

przed infekcją bakterii bądź grzybów. Autorzy przytaczają również szereg przykładów i doświadczeń, z których wynika niewielka rola alkaloidów jako związków chroniących rośliny przed owadami. Najbardziej powszechnym jest pogląd, że alkaloidy są końcowymi produktami przemiany materii, których roślina nie usuwa ze względu na brak odpowiednich narządów. Autorzy nie podzielają tego poglądu. Gdyby alkaloidy były produktami, których roślina nie potrzebuje byłyby gromadzone np. w opadających liściach. Tymczasem są one z liści odprowadzane a gromadzone na przykład w nasionach. Zdaniem autorów — może niedostatecznie jeszcze udokumentowanym — alkaloidy mają dla niektórych roślin znaczenie ochronne, biorą też udział w przemianach o czym mowa w rozdziale 6. Autorzy obszernie omawiają tu procesy odbudowy i przekształceń alkaloidów — podobnie jak i w poprzednich rozdziałach przytaczają zarówno wyniki badań własnych jak i innych naukowców.

Książka jest napisana żywo, bardzo interesująco i świadczy o istotnym zaangażowaniu autorów w problemy biochemii i fizjologii alkaloidów. Zawiera też bogate informacje z tych dziedzin. Obszerne, podane w każdym rozdziale osobno piśmiennictwo obejmuje prace do 1975 r.

Książka G. R. Wallera i E. K. Nowackiego przeznaczona jest w zasadzie dla pracowników naukowych zajmujących się problemami alkaloidów. Mogą z niej również korzystać studenci wyższych lat wydziałów Biochemii, Biologii, Farmacji oraz niektórych wydziałów Akademii Rolniczych pod warunkiem dobrego opanowania podstaw biochemii i biologii. Książka jest z pewnością cenną pozycją z dziedziny badań alkaloidów. Dotychczasowe obejmowały raczej problemy chemizmu alkaloidów, technologii ich otrzymywania, a ostatnio biosyntezy. Brak było opracowania, które w sposób syntetyczny podsumowałoby dorobek kilku dziesiątków lat w dziedzinie biologii, a zwłaszcza metabolizmu alkaloidów w roślinach. Rolę tę spełnia recenzowana książka. Przetłumaczenie jej na język polski zwiększyłoby znacznie możliwość korzystania przez studentów.

H. Strzelecka

Wolfgang Fritsche

Biochemische Grundlagen der Industriellen Mikrobiologie,

1978, VEB Gustav Fischer, Jena, stron 191, cena M. 38.

Tytuł książki Wolfganga Fritscha „Biochemische Grundlagen der Industriellen Mikrobiologie” można przetłumaczyć jako „Biochemiczne podstawy mikrobiologii przemysłowej”. Autor jest pracownikiem Uniwersytetu Marcina Luthra w Halle — Wittenberg. Wydawnictwo VEB Gustav Fischer, Verlag, Jena, NRD. Recenzent książki dr Roland Itterheim.

Całość książki podzielono na 10 dość rzeczowo powiązanych rozdziałów. Treścią książki jest opis przemian i procesów biochemicznych zachodzących przy udziale mikroorganizmów. Autor przedstawia te trudne procesy dość oryginalnie rozpoczynając od problemów ogólnych a następnie jasno omawia problemy szczegółowe. Sposób prezentacji problemów jest zarówno precyzyjny i jasny. Autor korzystał z bardzo bogatej literatury z tego zakresu, głównie publikowanej w latach 1966—1977.

Cechą charakterystyczną tej książki jest omawianie biochemicznego podłoża zjawisk mikrobiologicznych. Podobny sposób omawiania i wyjaśniania procesów znaleźć

można w książce J. Paluch „Podstawy mikrobiologii przemysłowej”, czy też S. Aiba, H. Humphrey i N. F. Milbisa pt.: „Inżynieria biochemiczna”. W książce opracowanej przez Wolfganga Fritsche przedstawiono bardziej szczegółowo i wyjątkowo zrozumiale procesy biochemiczne z pośrednimi etapami biosyntezy lub degradacji. Świadczą o tym chociażby licznie zamieszczone schematy poszczególnych cykli biochemicznych.

W książce omówiono szeroki zakres procesów wywoływanych przez mikroorganizmy jak procesy związane z wytwarzaniem witamin, aminokwasów, enzymów, antybiotyków, kwasów organicznych i innych metabolitów. Zaprezentowano przy tym nie tylko zjawiska wytwarzania i wydzielania metabolitów pierwotnych i wtórnych, ale również omówiono kierunki i możliwości regulacji tych procesów, na przykład przyspieszanie, hamowanie. Omówiono też chyba po raz pierwszy możliwości optymalizacji zachodzących procesów i zjawisk.

Autor starał się omówić wszystkie lepiej poznane bakterie, drożdże, grzyby i promieniowce. Jest to najbardziej kompleksowe zebranie i usystematyzowanie osiągnięć nauki w tym zakresie.

Pewnym niedociągnięciem książki jest wykaz piśmiennictwa, który został zamieszczony na końcu książki. Byłoby znacznie korzystniej gdyby piśmiennictwo zamieszczono po każdym rozdziale.

Układ książki i zawarta w niej treść jest bardziej przydatna mikrobiologom niż biochemikom, chociaż i dla nich zawiera wartościowy materiał poznawczy. Jest ona również wartościową pozycją dla pracowników przemysłu spożywczego, farmaceutycznego i toksykologów. Może służyć jako cenny podręcznik dla studentów wydziałów biologii, technologii żywności, niektórych kierunków medycyny i weterynarii a nawet wydziałów rolniczych.

Książka stanowi wartościową pozycję i winna być przetłumaczona na język polski i wydana możliwie szybko.

S. Poznański

SPRAWOZDANIE

Konferencja Cogene, Committee on Genetic Experimentation n.t. Rekombinacji DNA *in vitro*

Wye k/Ashford (Anglia) 1—4 kwiecień 1979

W kwietniu odbyła się w Anglii konferencja Cogenu poświęcona rekombinacji DNA *in vitro*. Cogene powołany został w 1977 roku przez *International Council of Scientific Unions* (ISCU), organizację zrzeszającą 18 międzynarodowych Towarzystw naukowych oraz ponad 60 organizacji narodowych, takich jak akademie nauk, rady naukowe itp. Cogene stanowi interdyscyplinarną, międzynarodową radę naukową w zakresie badań rekombinacji DNA *in vitro*, ma służyć radą rządów, międzynarodowym agencjom, grupom naukowym. W szczególności Cogene zajmuje się przygotowaniem aktualnych raportów o naukowej i praktycznej stronie takich badań, korzyściach, które mogą z nich wynikać, o bezpieczeństwie badań i dostępności bezpiecznych laboratoriów biologicznych, rozważa też konsekwencje, które mogą wyniknąć z niekontrolowanego rozprzestrzenienia się organizmów zawierających zrekombinowany DNA, ułatwia ponadto kontakty międzynarodowe naukowców, pomaga w organizacji szkolenia w technikach rekombinacji *in vitro*, organizuje konferencje poświęcone tej tematyce. Takim właśnie spotkaniem była konferencja w Wye. Porównywano ją z często cytowaną konferencją w Asilomar (1975 r.), w czasie której po raz pierwszy rozważano korzyści i zagrożenia płynące ze stosowania technik rekombinacji DNA *in vitro*. Około 30% uczestników konferencji w Wye była na konferencji w Asilomar.

Do Wye, maleńkiej osady, której nie ma nawet na mniej szczegółowych mapach, zjechało około 160 osób: z USA, Kanady, Australii, Nowej Zelandii, Taiwanu, Afryki Płd., Kenii, Malazji, Japonii, ZSRR, Wielkiej Brytanii, RFN, Francji, Włoch, Hiszpanii, Norwegii, Portugalii, Finlandii, Węgier, Szwecji, Danii, Belgii, Szwajcarii, Holandii, Jugosławii, NRD, Czechosłowacji, Bułgarii, Polski — można zatem bez przesady powiedzieć, że obecny był „cały świat”. Program konferencji podzielono na dwie części: w pierwszej wybitni przedstawiciele nauki, aktywnie zaangażowani w badaniu rekombinacji DNA *in vitro*, podsumowali stan badań i najważniejsze osiągnięcia w tej dziedzinie, a także przedstawili perspektywy na przyszłość. O tym kierunku mówią tytuły referatów: G. Bernardi — Organizacja i ewolucja genomu eukariotów; A. Campbell — Naturalne sposoby wymiany i zmiany materiału genetycznego; P. Starlinger — Transpozony i IS; N. S. Cohen — Techniki rekombinacji DNA; K. Murray — Nowe dane o genetyce molekularnej prokariotów; J. Sambrook — Nowe dane o genetyce molekularnej wirusów; J. Schell — Nowe dane o genetyce molekularnej grzybów i roślin; S. Ehrlich — Ekspresja obcych genów; R. Rutter — Produkcja pożytecznych białek; C. Weissmann — Inne potencjalne zastosowania rekombinacji genetycznej *in vitro*.

W drugiej części konferencji przedstawiono historię (do Wye zaproszono profesora C. Wienera z MIT, historyka, dla którego rekombinacja DNA *in vitro* stanowi

POSTĘPY BIOCHEMII

September 1979

ARTICLES IN POLISH

Volume 25

Number 3

L. Kłyszczek-Stefanowicz — Heterogeneity and Specificity of Non-histone Proteins Contents (Dept. Biochem., Inst., Biochem. Biophys., University of Łódź, Łódź)	287
K. Taylor, A. Taylor — The Use of Bacteriophage λ Fragments in the Construction of Plasmid Vectors for Gene Cloning. Included: Restriction Map of λ DNA (Dept. Biochem., University of Gdańsk, Gdańsk)	351
I. Skrzypek-Osiecka — Receptors of Peptide hormones (Dept. Biochem., Inst. Biopharmacy, School of Medicine, Warszawa)	373
A. Potempska — Biochemical Characteristics of Neurotubules (Dept. Biochem. Nervous System and Muscle, Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci, Warszawa)	401
J. Ułas — Methods of Separation of Neuronal and Glial Cells: their Application for Biochemical Investigation (Dept. Biochem. Nervous System and Muscle, Nencki Inst. Exp. Biol., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	417
Book reviews	437
Meeting Report	457
Announcement	372, 460

POSTĘPY BIOCHEMII

— kwartalnik

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej

rocznie zł 80.—

półrocznie zł 40.—

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

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

Jednostki gospodarki społecznej, 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.

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 przedstawionej 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.

Pipa 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 stroną cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

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

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

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

Tabele należy kolejno numerować cyframi arabskimi. Tytuł tabeli i nagłówki rubryk powinny jasno opisywać ich treść zaznaczając, z jakich (jakiej) prac(y) pochodzą informacje podane w tabeli.

Ryciny, tj. wykresy, rysunki, schematy lub fotografie należy opatrzyć numeracją w kolejności ich omówienia w tekście. Przyjmuje się zasadę numeracji rycin cyframi arabskimi, a 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 spójność artykułu zaleca się autorom konstruowanie oryginalnych rysunków i zbiorczych tabel na podstawie danych z piśmiennictwa. Prawie wszystkie czasopisma zastrzegają sobie wyłączność druku prac wraz z ich dokumentacją (*Copyright*). Przed włączeniem tabel, wykresów czy schematów do artykułu przeznaczonego do publikacji w *Postęпах Biochemii* należy uzyskać zgodę na przedruk i przedłożyć ją Redakcji.

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

SPIS TREŚCI

L. Kłyszewko-Stefanowicz—Niejednorodność i specyficzność białek niehistonowych — Referat sympozjalny wygłoszony 8.09.1978 podczas XVI Zjazdu PTBioch.	287
K. Taylor, A. Taylor—Wykorzystanie fragmentów DNA bakteriofaga λ w konstrukcji wektorów plazmidowych dla klonowania genów. Mapa restrykcyjna λ DNA	351
I. Skrzypek-Osiecka—Receptory hormonów peptydowych	373
A. Potempska—Biochemiczna charakterystyka neurotubuli	401
J. Ułas—Metody rozdziału komórek neuronalnych i glejowych: ich wykorzystanie w badaniach biochemicznych	417
Recenzje książek:	
The Molecular Biology of Membranes	437
Advances in Neurochemistry, t. 3	438
Contemporary Topics in Molecular Immunology, t. 7	439
Advances in Experimental Medicine and Biology, t. 98	440
Hemolytic Anemia in Disorders of Red Cell Metabolism	441
Trace Elements and Iron in Human Metabolism	443
Superoxide and Superoxide Dismutases	444
Dietary Fats and Oils in Human Nutrition	446
Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins	449
Incompatibility in Angiosperms	451
Alkaloid Biology and Metabolism in Plants	453
Biochemische Grundlagen der Industriellen Microbiologie	454
Sprawozdanie: Konferencja Cogene n.t. Rekombinacji DNA <i>in vitro</i> (<i>M. Fikus</i>)	457
Komunikaty	372, 460