

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 26(2)
(137-256) (1980)

1980

tom 26 nr 2
PL ISSN 0032-5422



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 korespondencje, adres prywatny, telefon miejsca pracy, tytuł artykułu (w języku polskim i angielskim), oraz — w prawym dolnym rogu — liczbę stron, liczbę rycin, wzorów i tabel oraz skrót tytułu (nie więcej niż 25 znaków drukarskich).

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

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

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

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

Dr. Wojciech Rode

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1980 TOM 26 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 26(2)
137-256 (1980)

Państwowe Wydawnictwo Naukowe

<http://rcin.org.pl>

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: K. Zakrzewski (Warszawa)

Zastępca: W. Ardelt (Warszawa)

Sekretarz: I. Szumiel (Warszawa)

Członkowie: S. Angielski (Gdańsk), M. Bagdasarian (Warszawa), M. Choraży (Gliwice), W. Drabikowski (Warszawa), M. Fikus (Warszawa), J. Gregorzyc (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa) D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejsbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawelkiewicz (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 5.II.1980 r.
Ark. wyd. 9,0, ark. druk. 7,5	Podpisano do druku w lipcu 1980 r.
Pap. druk sat. kl. IV 80 g. 70×100	Druk ukończono w lipcu 1980 r.
Zam. 239/12/80	Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

HANNA WEHR *)

Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i komórek

Some Aspects of the Metabolic Interrelationship between Plasma Lipoproteins and Cells

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Enzymy kontrolujące zawartość cholesterolu w komórkach
- III. Rodzinna hipercholesterolemia jako model w wyjaśnieniu mechanizmu pobierania cholesterolu przez komórki
- IV. Wiązanie lipoprotein przez komórki
- V. Wnikanie lipoprotein do komórek i ich degradacja
- VI. Hamowanie endogennej syntezy cholesterolu przez cholesterol egzogeny
- VII. Aktywacja estryfikacji cholesterolu
- VIII. Regulacja ilości receptorów LDL
- IX. Zastosowanie hodowli komórkowych w niektórych badaniach nad miażdżycą
- X. Uwalnianie cholesterolu z komórek do środowiska otaczającego. Przypuszczalna rola HDL w regulacji ilości cholesterolu komórkowego.
- XI. Reakcje lipoprotein osocza z komórkami wątroby i innymi komórkami
- XII. Zaburzenia regulacji syntezy cholesterolu w komórkach nowotworowych
- XIII. Reakcje lipoprotein z komórkami a obieg ogólny cholesterolu u człowieka
- XIV. Przypuszczalne mechanizmy gromadzenia się nadmiernych ilości cholesterolu w niektórych innych poza hipercholesterolemią wrodzonych chorobach metabolicznych
- XV. Zagadnienie specyficzności receptora LDL
- XVI. Problem pierwotnego defektu komórek hipercholesterolemicznych
- XVII. Uwagi końcowe

* Doc. dr hab., Zakład Genetyki, Instytut Psychoneurologiczny, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: Reduktaza HMG-CoA — reduktaza β -hydroksy- β -metyloglutarylokoenzymu A (E.C.1.1.1.34); LCAT — transferaza lecytynowo-cholesterolowa kwasów tłuszczowych (E.C.2.3.1.43); ACAT — transferaza acylo-CoA-cholesterolowa kwasów tłuszczowych (E.C.2.3.1.26); VLDL — lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości; LDL — lipoproteiny o niskiej gęstości; HDL — lipoproteiny o wysokiej gęstości.

Contents

- I. Introduction
- II. Enzymes controlling cholesterol content in the cells
- III. Familial hypercholesterolemia as a model for explaining mechanisms of cholesterol uptake by the cells
- IV. Binding of lipoproteins to the cells
- V. Internalization and degradation of lipoproteins within the cells
- VI. Suppression of endogenous cholesterol synthesis by exogenous cholesterol
- VII. Activation of cholesterol esterification
- VIII. Feedback regulation of LDL receptor
- IX. Cell culture and atherosclerosis research
- X. Cholesterol efflux from the cells to the medium. The possible role of HDL in the regulation of cell cholesterol content
- XI. Interaction of plasma lipoproteins with liver cells and with other cells
- XII. Impairment of feedback regulation of cholesterol biosynthesis in neoplastic cells
- XIII. Interaction of lipoproteins and cells and cholesterol circulation in the body
- XIV. The possible mechanisms of cholesterol storage in some other inherited diseases besides hypercholesterolemia
- XV. The problem of LDL receptor specificity
- XVI. On the primary defect of hypercholesterolemic cells
- XVII. Final remarks

I. Wstęp

Cholesterol jest niezbędny dla życia, wzrostu i prawidłowego funkcjonowania komórek, odgrywa bowiem ważną rolę w kontrolowaniu prze-

Podział i skład chemiczny lipoprotein osocza*)

Tabela 1

Nazwa frakcji skrót i gęstość w g/cm ³	Skład chemiczny w %				
	Trójglicerydy	Cholesterol wolny	Cholesterol zestryfikowa- ny	Fosfolipidy	Białko
Chylomikrony 0,94	80—95	1—3	2—5	3—7	1—2
Lipoproteiny o bardzo niskiej gęstości (VLDL) 0,94—1,006	50—65	7—12	4—13	15—20	8—12
Lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) 1,006—1,063	7—11	8	37—39	22	20—25
Lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL) 1,063—1,21	3—8	2—3	14—20	22—30	45—55

*) Dane powyższej tabeli były przedstawione w pracy pt. „Struktura i funkcja lipoproteidów krwi człowieka” H. Wehr (1975) Postępy Biochemii, 21, 75—93. Zamieszczono je powtórnie, aby ułatwić czytelnikowi zrozumienie obecnego artykułu.

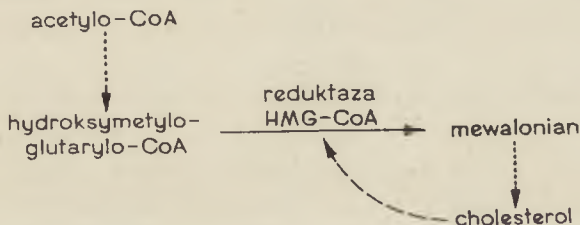
puszczalności ich błon. Z drugiej strony, nadmierne odkładanie cholesterolu jest zjawiskiem szkodliwym i prowadzić może nawet do śmierci komórki. Procesy decydujące o zawartości cholesterolu w tkankach znajdują się pod kontrolą skomplikowanych układów regulacyjnych.

Jednostkami transportującymi cholesterol u zwierząt wyższych są lipoproteiny osocza. Znajdują się one również w płynie międzykomórkowym. Większość cholesterolu występuje w lipoproteinach w postaci zestryfikowanej resztami kwasów tłuszczowych.

W skład lipoprotein wchodzi i inne związki lipidowe (Tabela 1). Ich transport stanowi również ważną funkcję biologiczną tych białek. W tej pracy omówione będą prawie wyłącznie zagadnienia związane z metabolizmem cholesterolu.

II. Enzymy kontrolujące zawartość cholesterolu w komórkach

Synteza cholesterolu odbywa się w siateczce endoplazmatycznej. Jedną z początkowych reakcji jest redukcja utworzonego z trzech cząsteczek acetylo-CoA β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA do kwasu mewalonowego (Rycina 1). Aktywność reduktazy β -hydroksy- β -metyloglutarylo-CoA — enzymu katalizującego tę reakcję — jest czynnikiem decydującym o szybkości całego szlaku syntezy cholesterolu.



Ryc. 1. Udział reduktazy HMG-CoA w syntezie cholesterolu. Regulacja reakcji przez sprzężenie zwrotne.

Wolny cholesterol podlega w komórkach estryfikacji resztami długołańcuchowych kwasów tłuszczowych a jego nadmiar jest odkładany w postaci estrów. Reakcję katalizuje transferaza acylo-CoA-cholesterolowa kwasów tłuszczowych (ACAT) (26). Enzym występuje w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej.

W niektórych tkankach cholesterol podlega specyficznym przemianom. W wątrobie zachodzi konwersja cholesterolu do kwasów żółciowych. Katalizuje ją 7- α -hydroksylaza cholesterolu, także enzym mikrosomalny. Jest to główna droga katabolizmu cholesterolu. W mitochondriach komórek kory nadnerczy zachodzi przemiana cholesterolu w pregnenolon — ten etap decyduje o szybkości syntezy hormonów sterydowych. W prze-

mianie biorą udział odpowiednie hydroksylazy i liazy. Analogiczne procesy zachodzą w innych gruczołach dokrewnych wydzielających hormony sterydowe.

III. Rodzinna hipercholesterolemia jako model w wyjaśnieniu mechanizmu pobierania cholesterolu przez komórki

Rodzinna hipercholesterolemia jest częstą postacią hiperlipoproteinemii u człowieka. Według danych pochodzących z USA jedna na 500 osób jest nosicielem genu tej jednostki chorobowej (1). Choroba dziedziczy się w sposób dominujący, u homozygot objawia się niezwykle wysokim (nawet do 1000 mg %) poziomem cholesterolu osocza, odkładaniem złogów cholesterolu i bardzo wczesnie (już w wieku poniżej 10 lat) występującą miażdżycą tętnic. U heterozygot objawy są mniej nasilone ale i w tej postaci choroba stanowi poważne zagrożenie dla życia.

W roku 1973 stwierdzono, że aktywność reduktazy HMG-CoA hodowanych fibroblastów skóry zależy w dużym stopniu od obecności lipoprotein w pożywce. Komórki rosnące w nieobecności surowicy wykazują wyższą aktywność enzymu w porównaniu z jego aktywnością w pożywce zawierającej surowicę. Czynniki „tłumiące” zawarty jest w lipoproteinach niskiej gęstości (LDL — patrz Tabela 1) osocza ludzkiego oraz niektórych gatunków zwierząt (2). Wkrótce potem zauważono, że fibroblasty pochodzące od chorych na rodzinną hipercholesterolemię nie wykazują spadku aktywności reduktazy HMG-CoA (3) ani spadku szybkości włączania [^{14}C] octanu do cholesterolu (4) w obecności LDL w płynie hodowlanym.

Stwierdzone zaburzenia procesów regulacji syntezy cholesterolu zaliczyły na krótko rodzinną hipercholesterolemię do kandydatów na „regulacyjną” wrodzoną wadę metaboliczną (4). Fibroblasty hipercholesterolemiczne są jednak, jak się okazało, zdolne do regulowania syntezy cholesterolu, bowiem dodany do pożywki wolny cholesterol wywiera efekt hamujący (5).

Wkrótce potem Goldstein i Brown (6) przedstawili dane sugerujące, że przyczyną niereagowania na obecność LDL w rodzinnej hipercholesterolemii jest brak wiązania ich przez błonę komórkową. koncepcja ta pozwala zaliczyć rodzinną hipercholesterolemię do chorób spowodowanych niedoborem specyficznego białka, podobnie jak to ma miejsce w innych wrodzonych wadach metabolicznych. W tym wypadku niedobór dotyczy białka błony komórkowej. Pogląd ten został obecnie przyjęty (7). Goldstein i Brown stoją zdecydowanie na stanowisku jednogenowej teorii pochodzenia hipercholesterolemii (1,8), chociaż nie wyizolowano jeszcze białka receptorowego i chociaż oprócz „receptoronegatywnych” form tej choroby opisano „receptorodefektywne”, w których komórki homozygoty wiążą w pewnym, zmniejszonym stopniu, LDL (9—11).

Defekt molekularny fibroblastów pochodzących od homozygot rodzinnej hipercholesterolemii przyczynił się do wykrycia mechanizmu wchodzenia LDL do komórek i do poznania w ciągu paru następnych lat skomplikowanego układu zależności między lipoproteinami a komórkami.

IV. Wiązanie lipoprotein przez komórki

W krótkim czasie po umieszczeniu fibroblastów w pożywce zawierającej LDL znakowane jodem radioaktywnym ^{125}J obserwuje się wiązanie tych lipoprotein przez komórki. Osiąga ono szczyt po 2 godzinach i, przy niskich stężeniach, wykazuje proporcjonalną zależność od ilości białka LDL (głównym białkiem tej frakcji jest apolipoproteina B — patrz Tabela 2). Powyżej stężenia wynoszącego około $50 \mu\text{g/ml}$ krzywa zależności wiązania od stężenia białka załamuje się wyraźnie (12). Autorzy uważają, że pierwszy, stromy odcinek krzywej jest dowodem na istnienie w błonie komórkowej specyficznych receptorów o wysokim powinowactwie. Nadmiar nieznakowanych lipoprotein hamuje wiązanie wyso-

Tabela 2.

Niektóre dane na temat apolipoprotein osocza człowieka

Nazwa	Synonimy	Główne miejsca występowania	Funkcja biologiczna	Inne dane
A I		HDL	aktywacja LCAT	krańcowo niskie stężenia w osoczu chorych na chorobę tangierską
A II B		HDL LDL VLDL chylomikrony	transport trójglicerydów i cholesterolu	podwyższenie poziomu w osoczu chorych na rodzinną hipercholesterolemię
C I		VLDL chylomikrony	prawdopodobnie aktywacja LCAT	
C II		HDL VLDL chylomikrony	aktywacja lipazy lipoproteinowej	
C III		HDL VLDL chylomikrony	w niektórych warunkach hamowanie lipazy lipoproteinowej	
D	A III peptyd cienkiej linii	HDL	prawdopodobnie aktywacja LCAT	
E	białko bogate w argininę (ARP)	VLDL	prawdopodobnie rola w reakcji LCAT i możliwa rola w transporcie cholesterolu	wzrost poziomu w osoczu zwierząt karmionych cholesterollem i w niektórych postaciach hiperlipoproteinemii u ludzi

kiego powinowactwa, jony wapnia wywierają na nie wpływ stymulujący, a umiarkowane działanie na komórki pronazą niszczy ich zdolność wiążącą. Wiązanie lipoprotein zachodzi już w niskich temperaturach (4°C). Jest ono wstępnym zjawiskiem w pobieraniu lipoprotein przez komórkę a receptory spełniają rolę czynników regulujących pobieranie.

Funkcję receptora LDL badano ostatnio również w układzie bezkomórkowym (13). Aktywność receptorową stwierdzono we frakcji homogenatu fibroblastów lub limfocytów sedymentującej przy $100000 \times g$. Posiada ona te same własności hamowania i aktywacji co wiązanie przez całe komórki. Optimum pH procesu wiązania wynosi 7,5.

Oprócz wiązania typu wysokiego powinowactwa komórki są również zdolne do pobierania LDL w procesie endocytozy. Wstępnym jej etapem jest również przyłączenie lipoprotein do powierzchni komórki. Takie wiązanie nazwane wiązaniem niskiego powinowactwa (14) nie wykazuje nasycenia wysokimi stężeniami LDL, nie jest stymulowane jonami wapnia ani niszczone działaniem pronazy.

Lipoproteiny wiązane tak jednym jak i drugim z podanych powyżej mechanizmów mogą wchodzić do wnętrza komórki, podlegać w niej przemianom i przekazywać cholesterol oraz inne składniki.

Komórki pochodzące od „receptoronegatywnych” homozygot rodzinnej hipercholesterolemii nie wiązały LDL wiązaniem wysokiego powinowactwa (6).

V. Wnikanie lipoprotein do komórek i ich degradacja

Dzięki połączeniu LDL z ferrytyną (15, 16) udało się prześledzić w mikroskopie elektronowym przebieg wnikania lipoprotein do wnętrza komórki. Stwierdzono, że ponad 70% ferrytyny umiejscowiło się we fragmentach błony komórkowej, które określano jako odcinki „okryte” („*coated*” regions). W temperaturze 37°C przekształcały się one w „okryte” pęcherzyki („*coated*” vesicles), które transportowały kompleksy LDL z ferrytyną do lizosomów.

W temperaturze 4°C wnikanie lipoprotein praktycznie nie zachodzi. Za najprostszy sposób odróżnienia wiązania od wnikania do komórek proponowano w związku z tym oznaczanie radioaktywności komórek po ich inkubacji ze znakowanymi lipoproteinami w dwu różnych temperaturach: 4° i 37°C (11, 17).

Po wniknięciu do komórki lipoproteiny są rozkładane w lizosomach. Uwalnianie rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym produktów degradacji znakowanego [¹²⁵J] białka LDL do płynu otaczającego wzrasta liniowo przez co najmniej 30 godzin od rozpoczęcia wiązania. Zidentyfikowano w nich niskocząsteczkowe peptydy oraz 3-jodotyrozynę (11). Degradację proteolityczną LDL stwierdzono również w bezkomórkowych

wyciągach uzyskanych z fibroblastów (18). Maksymalną wydajność reakcji obserwuje się w pH 4. Jest ona hamowana chlorochiną — inhibitorem wielu procesów lizosomalnych, jak również konkanawaliną A, która ma zdolność hamowania lizosomalnej katepsyny B.

W degradacji LDL bierze poza tym udział drugi enzym lizosomów, lipaza o kwaśnym optimum pH. Rozkłada ona trójglicerydy i zawarte w lipoproteinach estry cholesterolu (19). Wrodzony niedobór tego właśnie enzymu jest przyczyną jednej z chorób lizosomalnych — choroby Wolmana. Niedobór mniejszego stopnia powoduje łagodniejszą postać — chorobę spichrzania estrów cholesterolu (CESD). Obserwacje hodowli fibroblastów pochodzących od chorych wskazują na istotną rolę kwaśnej lipazy w katabolizmie LDL. Komórki gromadziły estry cholesterolu o składzie kwasów tłuszczowych takim, jaki występuje w lipoproteinach osocza, co przemawia za tym, że nie były one w ogóle rozkładane (20).

Cholesterol uwolniony ze swoich połączeń z lipoproteinami przez działanie enzymów lizosomalnych pozostaje do dyspozycji komórki, przechodzi do przestrzeni pozalizosomalnej i może być wykorzystany do syntezy błon.

Cholesterol wywiera trzy ważne efekty metaboliczne, a mianowicie: 1. hamuje reduktazę HMG-CoA (Ryc. 1), 2. stymuluje esterazę cholesterolu i 3. hamuje syntezę receptora LDL błony komórkowej. Cholesterol przejawia działanie niezależnie od tego, w jakiej postaci jest dostarczany do komórki. In vivo naturalnym dostarczycielem cholesterolu są lipoproteiny i w ten sposób kontrolują one procesy jego metabolizmu wewnątrzkomórkowego.

VI. Hamowanie endogennej syntezy cholesterolu przez cholesterol egzogeny

Hamujący wpływ cholesterolu na reduktazę HMG-CoA — enzym kontrolujący syntezę tego związku — jest dwojakiego rodzaju. Działanie szybkie, ujawniające się w ciągu 2 godzin polega na bezpośrednim działaniu cholesterolu na aktywność enzymatyczną, okres półtrwania reduktazy HMG-CoA wynosi bowiem około 3 godziny (21). Mechanizm tego wpływu nie jest jasny. Może on polegać na modyfikacji błon siateczki endoplazmatycznej, gdzie występuje enzym (22), przy czym rolę odgrywać może ilość cholesterolu znajdująca się w bezpośrednim sąsiedztwie reduktazy HMG-CoA (23). Ostatnio wykazano (24), że fosforylacja i defosforylacja tego enzymu prowadzi do szybkich, naprzemiennych zmian jego aktywności, nie wiadomo jednak czy ma to związek z wpływem cholesterolu.

Oprócz szybkiego, bezpośredniego wpływu na aktywność enzymatyczną, cholesterol hamuje syntezę reduktazy HMG-CoA (5). Cykloheksimid znosi ten efekt. Zahamowanie syntezy enzymu jest oczywiście pro-

cesem bardziej długotrwałym niż zahamowanie jego aktywności.

Stopień hamowania aktywności reduktazy HMG-CoA przez cholesterol jest różny dla różnych rodzajów komórek oraz dla tych samych komórek znajdujących się w różnych fazach wzrostu (5, 12).

Fibroblasty pochodzące od „receptoronegatywnych” homozygot rodzinnej hipercholesterolemii nie reagują oczywiście, jak o tym już była mowa, spadkiem aktywności reduktazy HMG-CoA na cholesterol związany z lipoproteinami. Aktywność enzymu w takich komórkach hodowanych w pożywce zawierającej LDL jest wyższa niż w komórkach kontrolnych rosnących w tych samych warunkach. Nie stwierdzono w nich jednak zwiększenia całkowitej zawartości cholesterolu (25).

Normalne fibroblasty płodowe (wyhodowane z płynu owodniowego) reagują podobnie jak fibroblasty skóry na obecność LDL. Stwarza to możliwość diagnostyki prenatalnej płodów dotkniętych rodzinną hipercholesterolemią (26).

Zauważono, że niektóre utlenione pochodne cholesterolu są znacznie (około 100 razy) silniejszymi inhibitorami reduktazy HMG-CoA niż sam cholesterol (21, 27). Najefektywniejsze pod tym względem są: 25-hydroksycholesterol, 20- α -hydroksycholesterol i 7-ketocholesterol. Koniecznym dla działania hamującego elementem strukturalnym jest niezestryfikowana grupa w pozycji 3 pierścienia sterydowego. Obecność grupy ketonowej lub hydroksylowej w pozycji 6, 7 lub 25 zwiększa znacznie efekt. Związki te działają w stężeniach od 5×10^{-8} M do 5×10^{-7} M (22). W wyższych stężeniach hamują całkowicie wzrost komórek.

Utlenione pochodne mają charakter bardziej polarny niż sam cholesterol. Wysłunięto przypuszczenie, że to one, występujące w śladowych ilościach razem z cholesterolem są właściwymi inhibitorami reduktazy HMG-CoA (28).

VII. Aktywacja estryfikacji cholesterolu

Estryfikacja mierzona ilością [14 C] oleinianu włączonego do frakcji estrów cholesterolu wzrasta 30–40-krotnie pod wpływem LDL (29). Wzrost estryfikacji następuje pomimo faktu, że lipoproteiny hamują endogenną syntezę cholesterolu, tak więc o aktywacji estryfikacji nie decyduje wzrost stężenia wyjściowego substratu. Dodany do pożywki wolny cholesterol jak również jego pochodne też silnie aktywują enzym estryfikujący (ACAT). (29, 30).

Estryfikacja pochodzącego z LDL cholesterolu jest właściwie jego restryfikacją. Około 70% cholesterolu tej frakcji lipoprotein występuje bowiem w postaci estrów, które na wcześniejszym etapie interakcji lipoproteina—komórka są rozkładane w lizosomach, jak to było powyżej opisane. Taki przebieg zjawiska nie pozostaje bez wpływu na skład estrów.

Głównym kwasem tłuszczowym estrów cholesterolu LDL jest wielonienasycony kwas linolowy, w procesie restryfikacji w komórce, natomiast, przyłączane są przede wszystkim kwasy jednonienasycone: olejowy i palmitoolejowy. Tak więc w ogólnym efekcie w procesie, w którym pośredniczy komórkowy receptor LDL, następuje nie tylko wejście cholesterolu do komórki, lecz również przesunięcie w składzie jego estrów z wielonienasyconych w kierunku bardziej nasyconych (31).

LDL nie wpływają na zahamowanie syntezy cholesterolu ani na aktywację jego estryfikacji w fibroblastach pochodzących od chorych na wspomnianą powyżej chorobę Wolmana. Powodem jest brak kwaśnej lipazy i nieuwalnianie cholesterolu z jego połączeń z estrami. Zupełnie podobnie zachowują się fibroblasty homozygoty rodzinnej hipercholesterolemii, w których przyczyną braku oddziaływania na LDL jest nieobecność receptora wysokiego powinowactwa w błonie komórkowej i niemożność pobrania tych lipoprotein do wnętrza komórki. Mieszana hodowla obu rodzajów fibroblastów wykazywała prawidłową odpowiedź metaboliczną (32). Mechanizm korekcji polegał na uwalnianiu do płynu hodowlanego kwaśnej lipazy pochodzącej z komórek hipercholesterolemicznych i wykorzystaniu jej przez komórki pochodzące od pacjenta z chorobą Wolmana.

VIII. Regulacja ilości receptorów LDL

W fibroblastach inkubowanych z LDL obserwuje się stopniowy spadek zdolności wiązania tych lipoprotein do specyficznych receptorów wysokiego powinowactwa (33). Podobny efekt wywołuje cholesterol Nielipoproteinowy. Mechanizm tego zjawiska polega według wszelkiego prawdopodobieństwa na zahamowaniu syntezy receptora. W wyniku komórka pobiera mniej cholesterolu z płynu otaczającego. Obliczono, że okres półtrwania specyficznego receptora dla LDL wynosi około 25 godzin. Tak więc ten sposób regulacji stężenia cholesterolu komórkowego jest powolniejszy i bardziej długotrwały niż poprzednio opisane.

Zauważono, że preinkubacja komórek z insuliną zwiększa wiązanie i degradację LDL. Mechanizm polegać może na wzroście syntezy receptora LDL (34).

Brown i Goldstein uważają (31), że w komórkach rosnących w obecności surowicy ustala się stan równowagi, w którym endogenna synteza cholesterolu jest zahamowana. Komórki wykorzystują cholesterol dostarczany im przez LDL, dopasowując aktywność receptora tak, aby utrzymać stały, niezbędny do prawidłowego funkcjonowania poziom cholesterolu. W komórkach pozbawionych dopływu cholesterolu, rosnących w nieobecności LDL lub tak jak w hipercholesterolemii, nie posiadających

receptora, synteza zwiększa się i w ten sposób następuje zaopatrzenie komórki w potrzebną dla życia ilość cholesterolu.

IX. Zastosowanie hodowli komórkowych w niektórych badaniach nad miażdżycą

W miażdżycowo zmienionych mięśniach gładkich tętnic stwierdza się obecność dużych ilości estrów cholesterolu. Chęć wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska była i jest bodźcem w podejmowaniu prac z zakresu wzajemnego oddziaływania lipoprotein i komórek, regulacji syntezy cholesterolu oraz jego estryfikacji w komórkach.

Stwierdzono, że hodowane komórki mięśni gładkich aorty zwierząt (35—37) jak również człowieka (38) wiążą, pobierają i degradują lipoproteiny podobnie jak fibroblasty i że wywołuje to takie same efekty metaboliczne co w fibroblastach tzn. zahamowanie syntezy cholesterolu i zwiększenie jego estryfikacji. Wiązanie lipoprotein wykazywało pewne różnice gatunkowe. U człowieka dotyczyło przede wszystkim LDL i VLDL (38) (patrz Tabela 1), u szczura — HDL (39). Pobieranie lipoprotein homologicznych było wyższe niż pobieranie tych samych frakcji pochodzących od innego gatunku (40).

Komórki mięśni gładkich tętnic są mniej aktywne niż fibroblasty pod względem degradacji lipoprotein (39, 40). Reagują również w mniejszym stopniu zmianą szybkości syntezy cholesterolu na jego ubytek z komórki (41).

W poszukiwaniu czynników, które mogą wpływać na zwiększenie odkładania cholesterolu w komórkach mięśni gładkich tętnic Albers i Bierman (42) badali, jak wpływa niedotlenienie na reakcje między lipoproteinami a komórkami. Stwierdzili, że wiązanie LDL w tych komórkach nie ulegało zmianie, komórki rosnące przy niższym stężeniu tlenu wykazywały jednak zmniejszoną degradację [125 J] LDL — przyczyną była prawdopodobnie obniżona aktywność enzymów lizosomalnych. Ci sami autorzy wykazali (43), że komórki mięśni gładkich tętnic mają mniejszą niż fibroblasty zdolność regulacji syntezy receptora LDL błony komórkowej. Ta różnica mogłaby być przyczyną łatwości gromadzenia estrów cholesterolu.

Komórki mięśni gładkich tętnic są miejscem odkładania lipidów w procesie powstawania zmian miażdżycowych. W magazynowaniu tych związków odgrywać mogą jednak również ważną rolę komórki śródbłónka naczyń stykające się bezpośrednio z krwią i tym samym stanowiące naturalną barierę przed wchodzeniem lipoprotein do komórek mięśniowych. Stwierdzono (44), że komórki śródbłónka aorty królika wiązały, pobierały i degradowały LDL, ale wolniej niż fibroblasty i wolniej niż komórki mięśni gładkich tętnic. Nasylenie wiązań wysokiego powinow-

wactwa następowało już przy stężeniu 5 μg białka LDL w ml płynu otaczającego, ale wnikanie i degradacja LDL wzrastały aż do bardzo wysokich stężeń tego białka. Świadczyłyby to o znaczeniu wiązania niskiego powinowactwa w zjawisku pobierania LDL przez komórki. W tkankowej hodowli śródbłonna naczyń wołu (45) stwierdzono, że komórki przylegające ściśle do siebie w naczyniu hodowlanym (w fazie „confluent”) są mało aktywne w pobieraniu LDL. Jeżeli przerwie się — „skaleczy” taką hodowlę, komórki, prawdopodobnie dzięki uwolnieniu części swojej powierzchni, zaczynają w większym stopniu wiązać lipoproteiny i gromadzić lipidy.

Związek między brakiem lub niedoborem receptorów LDL w błonie komórkowej i gromadzeniem cholesterolu w zmianach miażdżycowych nie jest jasny. Można sądzić, że blok w katabolizmie LDL i wynikający z niego wzrost stężenia tej frakcji w osoczu przyczynia się do odkładania cholesterolu w tętnicach.

X. Uwalnianie cholesterolu z komórek do środowiska otaczającego. Przypuszczalna rola HDL w regulacji ilości cholesterolu komórkowego

Stein i współautorzy badając komórki mięśni gładkich aorty szczura (46), komórki raka wysiękowego (*Landschütz ascites cells*) (47) jak również fibroblasty (41) stwierdzili, że najwięcej cholesterolu przechodziło do pożywki w obecności mieszaniny delipidowanych białek frakcji HDL z fosfolipidami.

W doświadczeniach z różnymi komórkami postulowano niejednokrotnie znaczenie całej frakcji HDL w odbieraniu cholesterolu (będzie o tym jeszcze dalej mowa), nie zostało ono jednak dotychczas dostatecznie udokumentowane a mechanizm tego procesu pozostaje zupełnie nieznanym.

Również inne obserwacje zwracają uwagę na udział HDL w komórkowym metabolizmie cholesterolu. Stwierdzano istnienie odwrotnej korelacji między poziomem HDL w osoczu i wielkością całkowitej ogólnoustrojowej puli cholesterolu (48) oraz między ich poziomem i częstością występowania zmian miażdżycowych u ludzi (49). W pracowni Steinberga prześledzono szczegółowo współzależność między HDL i LDL w reakcjach z fibroblastami człowieka. HDL hamowały wiązanie [¹²⁵I] LDL, lecz zdaniem autorów zjawisko nie polega na rywalizacji o te same wiązania. Uważają, że wiązanie HDL nie jest regulowane przez komórkę i że pobieranie ich można przypisać procesom pinocytozy. Wnikanie do komórek i degradacja tych lipoprotein przebiegają bardzo wolno (51—53).

W obecności LDL ogólna ilość cholesterolu w komórkach wzrasta pomimo, że jego synteza wewnątrzkomórkowa jest zahamowana (50). HDL nie powodują wzrostu zawartości cholesterolu (52). Podane razem z LDL zmniejszają powodowany przez tę frakcję jego przyrost w komórkach

śródbłonka naczyń (44). Miller wykazał ostatnio, że krótka (około 3 godzinna) inkubacja fibroblastów z HDL wywiera hamujący wpływ na wiązanie LDL, jednak długa (48 godzinna) hodowla w obecności tych pierwszych daje efekt odwrotny — zwiększa bowiem syntezę receptora LDL błony komórkowej. Autor jest przekonany, że przyczyną jest oddawanie cholesterolu komórkowego do HDL. Uważa on, że ten właśnie mechanizm wyjaśnia obserwowaną często ujemną korelację między stężeniem LDL i HDL w osoczu.

XI. Reakcje lipoprotein osocza z komórkami wątroby i innymi komórkami

Wątroba jest narządem odgrywającym bardzo ważną rolę w ogólnoustrojowej gospodarce cholesterolem, jest głównym miejscem jego syntezy i katabolizmu oraz syntezy większości apolipoprotein. Pomimo to rola lipoprotein w regulacji metabolizmu cholesterolu w tym narządzie nie została dokładnie poznana. Główną tego przyczyną są trudności z hodowlą hepatocytów.

Nervi i współpracownicy uważają (55—57), że synteza cholesterolu w wątrobie jest najbardziej hamowana przez lipoproteiny transportujące cholesterol pokarmowy. Powstające w jelicie chylomikrony przechodzą do krwioobiegu i po odłączeniu od nich większości trójglicerydów zamieniają się w tzw. „remnants” czyli „resztki” chylomikronów, zawierające jeszcze dość dużo cholesterolu. Ta właśnie odmiana lipoprotein jest bardzo aktywna w dostarczaniu cholesterolu do wątroby i w hamowaniu jego syntezy (57).

Zauważono, że obecność w diecie nienasyconych kwasów tłuszczowych wpływa na zwiększenie hamowania syntezy cholesterolu w wątrobie przez cholesterol pokarmowy (58).

Wielu autorów uważa, że hepatocyty posiadają, podobnie jak inne komórki, receptory wysokiego powinowactwa dla LDL (59—61). Jednak wyniki badań nad wpływem tych lipoprotein na metabolizm cholesterolu w wątrobie nie są zgodne — według jednych LDL hamują syntezę cholesterolu (62, 63), według innych nie przejawiają takiego działania (60, 61).

W doświadczeniach na świnich stwierdzono, że wyłączenie z krążenia wątroby powoduje szybkie zniknięcie LDL z krwioobiegu (64). Należy sądzić, że katabolizm LDL zachodzi przede wszystkim w tkankach obwodowych (65, 66) i w związku z tym wiązanie LDL przez komórki wątroby prawdopodobnie nie ma dużego znaczenia ilościowego.

Niezgodności istnieją również na temat funkcji HDL. Z jednej strony stwierdzono pod ich wpływem wzrost aktywności reduktazy HMG-CoA wątrobowej (62, 63), co przypisywano głównie ubytkowi cholesterolu

z komórki. Niezupełnie zgodne z powyższym są obserwacje stwierdzające szybki rozpad HDL w komórkach wątrobowych (szybszy w komórkach niemięsżowych niż mięsżowych) (66, 67).

Większość przytoczonych powyżej prac wykonywana była przy użyciu skrawków wątroby, tylko w nielicznych stosowano hodowle hepatocytów (60—62).

W krótkotrwałych doświadczeniach (6 godzin) lipoproteiny nie wykazywały wpływu na syntezę cholesterolu hodowli komórek błony śluzowej jelita psa. W tych samych warunkach stwierdzono hamujący wpływ na reduktazę HMG-CoA wolnego cholesterolu, jego utlenionych pochodnych oraz kwasów żółciowych (68).

Nadnercza szczura pobierały [^{14}C] cholesterol 2—3 razy szybciej niż z LDL, a uprzednie podawanie zwierzętom ACTH zwiększało to pobieranie (69). HDL były również silniejszym inhibitorem syntezy cholesterolu z octanu w inkubowanych skrawkach nadnerczy (70).

Doświadczenia z tkanką płucną dotyczą tylko katabolizmu części białkowej lipoprotein (71). Perfuzja płuca [^{125}J] VLDL powoduje degradację apolipoprotein grupy C (patrz Tabela 2). Białka te wpływają na aktywność lipazy lipoproteinowej, która katalizuje rozpad części lipidowej VLDL. Tak więc płuco mogłoby tą drogą odgrywać rolę w katabolizmie lipoprotein frakcji VLDL.

Współzależność lipoprotein i tkanki nerwowej badano w hodowli komórek glejaka i komórek neuroblastoma. Zarówno frakcja LDL jak i wolne sterole (cholesterol, desmosterol i 7-ketocholesterol) hamowały aktywność reduktazy HMG-CoA badanych komórek, przy czym wpływ na komórki glejaka był większy (72). Zmiany w szybkości estryfikacji cholesterolu obserwowano wyłącznie w komórkach glejaka (73).

Synteza cholesterolu w centralnym układzie nerwowym jest ważnym elementem mielinizacji. Jego odkładanie jest szczególnie intensywne w okresie rozwoju, a komórki gleju najprawdopodobniej odgrywają ważną rolę w tym procesie. W przytoczonych pracach (72, 73) nie został jednak uwzględniony fakt, że badane klony były liniami nowotworowymi, w których mogą występować zmiany w oddziaływaniu reduktazy HMG-CoA na inhibitory (będzie o tym mowa poniżej).

Wiązanie LDL przez receptory wysokiego powinowactwa stwierdzono w hodowli komórek limfoidalnych (74) oraz w limfocytach krwi obwodowej (75).

Fogelman i wsp. (76) próbowali zastosować białe krwinki do badania różnic w syntezie cholesterolu między heterozygotami rodzinnej hipercholesterolemii a osobami zdrowymi. Pewną trudność stanowi odmienny metabolizm związków sterydowych w różnych typach białych krwinek (77). W regulacji aktywności reduktazy HMG-CoA autorzy przypisują decydujące znaczenie uwalnianiu cholesterolu z komórek.

XII. Zaburzenia regulacji syntezy cholesterolu w komórkach nowotworowych

W skrawkach guza hepatoma (78—80) oraz w limfocytach (81) i leukocytach (82) białaczkowych obserwowano zanik regulacyjnego sprzężenia zwrotnego syntezy cholesterolu (Ryc. 1).

Włączanie [^{14}C] octanu do cholesterolu było około 30 razy wyższe w limfocytach białaczkowych niż w normalnych, obserwowano również podobnego rzędu wzrost aktywności reduktazy HMG-CoA. Ani cholesterol, ani jego utlenione pochodne nie wywierały wpływu na reduktazę HMG-CoA. Utrata cholesterolu z komórki nie zwiększała biosyntezy steroli (83).

Brak regulacji syntezy cholesterolu zaliczono do bardzo ciężkich zmian metabolicznych komórek nowotworowych (84). Mechanizm zjawiska nie jest wyjaśniony. Stwierdzono pewne różnice wrażliwości na temperaturę reduktazy HMG-CoA, izolowanej z limfocytów białaczkowych w porównaniu z normalnymi (84). Nie wiadomo jednak czy pierwotne są zmiany we właściwościach enzymu, czy też odwrotnie — zmiany te są już skutkiem nagromadzenia w błonach komórkowych nadmiernych ilości cholesterolu.

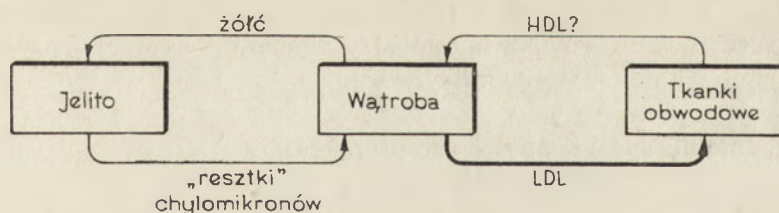
Ho i wsp. (85) obserwowali również wzrost syntezy cholesterolu w leukocytach białaczkowych. Wbrew przedstawionym powyżej poglądom uważają oni, że przyczyną jest przyspieszony obrót składników błon komórkowych i zwiększony skutek tego ubytek cholesterolu z tych komórek.

XIII. Reakcje lipoprotein z komórkami a obieg ogólny cholesterolu u człowieka

Oprócz transportu netto zachodzi również niespecyficzna wymiana cholesterolu między krążącymi lipoproteinami a komórkami (86). Nie należy o niej zapominać przy rozpatrywaniu ogólnego obiegu tego związku w ustroju.

Istniejące informacje pozwalają na próbę przedstawienia roli lipoprotein w ogólnoustrojowej gospodarce cholesterolem. Znaczna część cholesterolu z pożywienia oraz cholesterolu syntetyzowanego w wątrobie jest transportowana z frakcją LDL do różnych tkanek obwodowych. Funkcją HDL byłby transport cholesterolu z komórek obwodowych do wątroby, która jest miejscem jego dalszych przemian i główną drogą jego wydalania. Rycina 2 przedstawia uproszczony przebieg wędrówki cholesterolu w ustroju człowieka.

O tym jak dużą rolę w ogólnym metabolizmie odgrywa rozpad LDL



Ryc. 2. Schemat ilustrujący prawdopodobną rolę lipoprotein w ogólnoustrojowym transporcie cholesterolu.

w komórkach świadczyć może choroba Wolmana. Dzieci dotknięte nią giną w pierwszych miesiącach życia — wcześniej niż w niedoborach innych enzymów lizosomalnych (87).

Innym przykładem ogólnoustrojowego znaczenia omawianych procesów jest rodzinna hipercholesterolemia, w której przeszkoda w pierwszej fazie katabolizmu LDL w komórkach obwodowych doprowadza w konsekwencji do poważnego niebezpieczeństwa dla życia w postaci wczesnej miażdżycy tętnic.

XIV. Przypuszczalne mechanizmy gromadzenia się nadmiernych ilości cholesterolu w tkankach w niektórych innych poza hipercholesterolemią wrodzonych chorobach metabolicznych

We wrodzonym niedoborze lipoprotein wysokiej gęstości w tzw. chorobie tangierskiej — w osoczu stwierdza się tylko śladowe ilości obu głównych apolipoprotein HDL — apolipoproteiny AI i apolipoproteiny AII (patrz Tabela 2). U chorych obserwuje się gromadzenie estrów cholesterolu w różnych narządach. Przyczyną gromadzenia cholesterolu może być, w związku z tym co podawano poprzednio, brak naturalnego odbiorcy jego z tkanek pozawątrobowych.

Wyjaśnienia szukać można jednak również w fakcie, że apolipoproteina AI jest aktywatorem enzymu odpowiedzialnego za estryfikację cholesterolu w osoczu — transferazy lecytynowo-cholesterolowej kwasów tłuszczowych (LCAT) (88). Frakcja HDL jest substratem reakcji katalizowanej przez LCAT. Brak zarówno aktywatora jak i właściwego substratu reakcji estryfikacji prowadzić może do zachwiania równowagi między cholesterolem wolnym osocza i tkanek zgodnie z koncepcją Głomsęta, który uważał LCAT za enzym chroniący błony komórkowe przed nadmiarem cholesterolu (89).

We wrodzonym niedoborze LCAT obserwuje się duże zmiany w składzie i budowie lipoprotein osocza (90). W układzie siateczkowo-śródbłonkowym gromadzony jest cholesterol (głównie niezestryfikowany). Gromadzenie cholesterolu wynikać może, podobnie jak w chorobie tangier-

skiej, z tego, że zmienione HDL nie są zdolne do odbierania go z tkanek lub też z zachwiania równowagi między tkankami a osoczem wskutek braku enzymu katalizującego estryfikację.

XV. Zagadnienie specyficzności receptora LDL

Teoria Goldsteina i Browna zakłada istnienie w błonie komórkowej specyficznego receptora wysokiego powinowactwa w stosunku do białka B — głównego składnika frakcji LDL (patrz Tabela 2). Stwierdzono, że zdrowe komórki wiążą całkowicie pozbawioną lipidów apolipoproteinę B (91, 92). W tym świetle nie można jednak wytłumaczyć wiązania HDL królika przez komórki mięśni gładkich tętnic (39) ani wiązania HDL_c — patologicznej lipoproteiny pojawiającej się w osoczu świń karmionych dużymi ilościami cholesterolu (93), żadne z tych białek nie zawiera bowiem apolipoproteiny B. Innerarity i Mahley (94) stwierdzili ostatnio, że wiązanie HDL_c było nawet znacznie wyższe niż ludzkich LDL. Autorzy ci uważają, że oprócz apolipoproteiny B te same receptory mogą również wiązać bogatą w argininę apolipoproteinę E („*arginine rich apoprotein*”) (patrz Tabela 2). Ta ostatnia występuje w znacznych ilościach w obu wspomnianych wyżej rodzajach HDL — szczurzych (95) i HDL_c (93). W wiązaniu mogłyby odgrywać rolę wspólne dla obu apolipoprotein B i E dodatkowo naładowane fragmenty sekwencji aminokwasów. Aby udowodnić tę hipotezę Mahley i współautorzy (96) selektywnie modyfikowali reszty argininowe tych białek, co zapobiegało ich wiązaniu. Reszty argininy byłyby więc miejscem rozpoznawczym dla receptora wysokiego powinowactwa a specyficzność receptorów mniej wysoka niż to początkowo przypuszczano.

LDL próbowano również modyfikować w inny sposób. Częściowe trawienie trypsyną nie wpływało na wiązanie ich do powierzchni normalnych komórek (97). Kationizowane LDL traciły swoje cechy rozpoznawcze (98). Były one wiązane, pobierane przez komórki i rozkładane w lizosomach, lecz proces ten nie pozostawał pod kontrolą receptora, co prowadziło do gromadzenia nadmiernych ilości cholesterolu.

XVI. Problem pierwotnego defektu komórek hipercholesterolemicznych

Koncepcja o braku receptora wysokiego powinowactwa dla LDL w błonie komórkowej w „receptoronegatywnej” postaci rodzinnej hipercholesterolemii została uznana za słuszną przez większość autorów zajmujących się tym problemem. Jednak Fung i współautorzy (99) stwierdzili w fibroblastach pochodzących od homozygoty z taką właśnie postacią choroby zmniejszenie syntezy cholesterolu i spadek aktywności reduktazy HMG-CoA pod wpływem LDL. Cechą patologiczną tych komórek był jedynie zupełny brak aktywacji estryfikacji cholesterolu.

W 1976 roku opisano przypadki rodzinnej hipercholesterolemii (100, 101), których defekt polegał nie na braku wiązania lecz na niezdolności do wnikania LDL do komórek. Goldstein i Brown (102) zbadali heterozygotycznego pacjenta, który po jednym z rodziców odziedziczył cechę „zwykłej” hipercholesterolemii a po drugim wariant, który charakteryzuje się niezdolnością do wnikania. Mutacje miały charakter alleliczny. Badanie fibroblastów tego pacjenta w mikroskopie elektronowym wykazało, że posiadane (w 50%) receptory nie znajdowały się, jak w komórkach kontrolnych w „okrytych” wgłębieniach, lecz były zlokalizowane w „nieokrytych” miejscach błony komórkowej, co widocznie uniemożliwiało ich wnikanie do komórki. Autorzy uważają w związku z powyższym, że oprócz wiązania normalną funkcją receptora LDL jest również udział we wnikaniu związanej lipoproteiny do wnętrza komórki. Opisane warianty hipercholesterolemii byłyby więc dwiema różnymi mutacjami tego samego białka.

Chatterjee i wsp. (103, 104) wykazali, że fibroblasty pochodzące od pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią zawierały większą niż w normie ilość sfingolipidów oraz miały zmieniony skład sfingolipidów powierzchniowych. Stwierdzono również różnice w zawartości fosfolipidów oraz zmiany w glikoproteinach błony komórkowej. Związek zaobserwowanych faktów z nienormalnym wiązaniem lipoprotein przez komórki pozostaje na razie niewyjaśniony.

Zupełnie odmienny pogląd na pierwotną przyczynę hipercholesterolemii reprezentują Fogelman i wsp. (76, 105), którzy twierdzą, że leukocyty heterozygot uwalniają do płynu otaczającego więcej cholesterolu niż komórki kontrolne. Zwiększona utrata z komórki jest według tych autorów przyczyną dalszych skutków choroby.

Odmiennosc komórek hipercholesterolemicznych badano również przez porównanie zachowania się ich w stosunku do zmodyfikowanych lipoprotein. Działanie trypsyną na lipoproteiny zwiększało znacznie ich degradację w komórkach hipercholesterolemicznych, nie miało natomiast wpływu na ich rozpad w fibroblastach kontrolnych (97). Stwierdzono również, że komórki hipercholesterolemiczne wiązały więcej HDL niż komórki normalne (106).

Wszystkie te obserwacje trudno ująć w chwili obecnej w jedną całość. Możliwe, że jest to spowodowane istnieniem kilku genotypów rodzinnej hipercholesterolemii.

XVII. Uwagi końcowe

Niezależnie od tego, czy teoria o braku lub niedoborze białka wiążącego LDL w rodzinnej hipercholesterolemii znajdzie swoje ostateczne potwierdzenie, czy ulegnie jakimś modyfikacjom i tak nie ma wątpliwości,

że prowadzone w tym kierunku badania wyjaśniły bardzo wiele w zagadnieniu wzajemnego oddziaływania komórek i lipoprotein osocza.

Badania nad rodzinną hipercholesterolemią oraz nad wiązaniem lipoprotein podkreślają znaczenie receptorów komórkowych w patologii i medycynie. Wyrazem zainteresowania tym zagadnieniem jest między innymi chyba zorganizowanie na XI Międzynarodowym Kongresie Biochemii w Toronto w 1979 roku sympozjum na ten właśnie temat. Sympozjum temu przewodniczył J. L. Goldstein — jeden z współtwórców receptorowego wywodu chorobowego rodzinnej hipercholesterolemii.

Zaakceptowano do druku 1.12.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Goldstein J. L., Brown M. S. (1975), *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 15—25.
2. Brown M. S., Dana S. E., Goldstein J. L. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 2162—2166.
3. Goldstein J. L., Brown M. S. (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 2804—2808.
4. Khachadurian A. K., Kawahara F. S. (1974), *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 1—15.
5. Brown M. S., Dana S. E., Goldstein J. L. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 789—796.
6. Brown M. S., Goldstein J. L. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.* **71**, 788—792.
7. Fredrickson D. S., Goldstein J. L., Brown M. S. (1978), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, red. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S., str. 604—655, McGraw-Hill Book Company, New York.
8. Goldstein J. L., Sobhani M. K., Faust J. R., Brown M. S. (1976), *Cell*, **9**, 195—203.
9. Avigan J., Bhathena S. J., Schreiner M. E. (1975), *J. Lipid. Res.*, **16**, 151—154.
10. Breslow J. L., Spaulding D. R., Lux S. E., Levy R. I., Lees R. S. (1975), *New Engl. J. Med.*, **293**, 900—903.
11. Goldstein J. L., Dana S. E., Brunschede G. Y., Brown M. S. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 1092—1096.
12. Goldstein J. L., Brown M. S. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5153—5162.
13. Basu S. K., Goldstein J. L., Brown M. S. (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3852—3856.
14. Brown M. S., Goldstein J. L. (1974), *Circulation*, **50** (Suppl. 3), 269.
15. Anderson R. G. W., Goldstein J. L., Brown M. S. (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 2434—2438.
16. Anderson R. G. W., Brown M. S., Goldstein J. L. (1977), *Cell*, **10**, 351—364.
17. Goldstein J. L., Basu S. K., Brunschede G. Y., Brown M. S. (1976), *Cell*, **7**, 85—95.
18. Goldstein J. L., Brunschede G. Y., Brown M. S. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7854—7862.
19. Brown M. S., Dana S. E., Goldstein J. L. (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **72**, 2925—2929.

20. Goldstein J. L., Dana S. E., Faust J. R., Beaudet A. L., Brown M. S. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 8487—8492.
21. Brown M. S., Goldstein J. L. (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 7306—7314.
22. Philippot J. R., Cooper A. G., Wallach D. F. H. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 161—166.
23. Mitropoulos K. A., Venkatesan S. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **489**, 126—142.
24. Beg Z. H., Stonik J. A., Brewer H. B. (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **75**, 3678—3682.
25. Brown M. S., Faust J. R., Goldstein J. L. (1975), *J. Clin. Invest.*, **55**, 783—793.
26. Goldstein J. L., Harrod M. J. E., Brown M. S. (1974), *Am. J. Hum. Genet.*, **26**, 199—206.
27. Chen H. W., Kandutsch A. A., Waymouth C. (1974), *Nature*, **251**, 419—421.
28. Kandutsch A. A., Chen H. W., Shown E. P. (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 2500—2503.
29. Goldstein J. L., Dana S. E., Brown M. S. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **71**, 4288—4292.
30. Brown M. S., Dana S. E., Goldstein J. L. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4025—4027.
31. Chait A., Bierman E. L., Albers J. J. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 292—299.
32. Brown M. S., Goldstein J. L. (1976), *Science*, **191**, 150—154.
33. Brown M. S., Sobhani M. K., Brunschede G. Y., Goldstein J. L. (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 3277—3286.
34. Brown M. S., Goldstein J. L. (1975), *Cell*, **6**, 307—316.
35. Weinstein D., Carew T. E., Steinberg D. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 404—421.
36. Clair R. (1975), *Circulation*, **50** (Suppl. 3), 272.
37. Chen R. M., Getz G. S., Fisher-Dzoga K., Wissler R., (1974), *Circulation*, **50**, (Suppl. 3), 274.
38. Bierman E. L., Albers J. J. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **388**, 198—202.
39. Bierman E. L., Stein O., Stein Y., (1974), *Circulation Res.*, **35**, 136—150.
40. Stein O., Stein Y. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 377—384.
41. Stein O., Vanderhoek J., Stein Y., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 347—358.
42. Albers J. J., Bierman E. L. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **424**, 422—429.
43. Bierman E. L., Albers J. J. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 152—160.
44. Reckless J. P. D., Weinstein D. B., Steinberg D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 475—487.
45. Vlodavsky I., Fielding P. E., Fielding C. J., Gospodarowicz D., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **75**, 356—360.
46. Stein Y., Glangeaud M. C., Fainaru M., Stein O. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 106—118.
47. Jackson R. L., Gotto A. M., Stein O., Stein Y. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 7204—7209.
48. Miller N. E., Nestel P. J., Clifton-Bligh P. (1976), *Atherosclerosis*, **23**, 535—547.

49. Rhoads C. G., Gulbrandsen C. L., Kagan A. (1976), *New Engl. J. Med.*, **294**, 293—298.
50. Stein O., Stein Y. (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 363—368.
51. Miller N. E., Weinstein D. B., Carew T. E., Koschinsky T., Steinberg D., (1977), *J. Clin. Invest.*, **60**, 78—88.
52. Miller N. E., Weinstein D. B., Steinberg D. (1977), *J. Lipid. Res.*, **18**, 438—450.
53. Koschinsky T., Carew T. E., Steinberg D. (1977), *J. Lipid. Res.*, **18**, 451—458.
54. Miller N. E. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 131—137.
55. Nervi F. O., Dietschy J. M. (1974), *Circulation*, **50**, (Suppl. 3), 176.
56. Nervi F. O., Weis H. J., Dietschy J. M. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4145—4151.
57. Andersen J. M., Nervi F. O., Dietschy J. M. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 298—307.
58. Bochenek W., Rodgers J. B. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 1—16.
59. Bachorik P. S., Livingston J. N., Cooke J., Kwiterovich P. O. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 927—935.
60. Breslow J. L., Lothrop D. A., Clowes A. W., Lux S. E. (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2726—2733.
61. Lakshmanan M. R., Muesing R. A., Cook C. A., Veech R. L., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6581—6584.
62. Edwards P. A. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **409**, 39—50.
63. Jakoi L., Quarfordt S. H. (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 6856—6860.
64. Sniderman A. D., Carew T. E., Chandler J. G., Steinberg D. (1974), *Science*, **183**, 526—528.
65. Stein Y., Ebin V., Bar-On H., Stein O. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 286—287.
66. Van Berkel T. J. C., Koster J. F., Hülsman W. C. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 586—589.
67. Van Berkel T. J. C., van Tol A., Koster J. F. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 138—146.
68. Gerhard R. L., Cooper A. D. (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2790—2796.
69. Gwynne J. T., Mahoffee D., Brewer H. B., Ney R. L. (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 4329—4333.
70. Andersen J. M., Dietschy J. M. (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 880—885.
71. Sparks C. E., Dehoff J. L., Capuzzi D. M., Pietra G., Marsh J. B. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 123—130.
72. Volpe J. J., Hennesy S. W. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **486**, 408—420.
73. Volpe J. J., Hennesy S. W. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 424—435.
74. Ho Y. K., Brown M. S., Kayden H. J., Goldstein J. L. (1976), *J. Exp. Med.*, **144**, 444—445.
75. Ho Y. K., Brown M. S., Bilheimer D. W., Goldstein J. L., (1976), *J. Clin. Invest.*, **58**, 1465—1474.
76. Fogelman A. M., Edmond J., Seager J., Popjak G. (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2045—2055.
77. Fogelman A. M., Seager J., Edwards P. A., Hokom M., Popjak G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 167—173.
78. Siperstein M. D., Fagan V. M. (1964), *Cancer Res.*, **24**, 1108—1115.
79. Sabine J. R., Abraham S., Chaikoff I. L. (1967), *Cancer Res.*, **27**, 793—799.

80. Kandutsch A. A., Hancock R. L. (1971), *Cancer Res.*, **31**, 1396—1401.
81. Chen H. W., Kandutsch A. A., Heiniger H. J., Meier H. (1973), *Cancer Res.*, **33**, 2774—2778.
82. Chen H. W., Heiniger H. J. (1974), *Cancer Res.*, **34**, 1304—1307.
83. Philippot J. R., Cooper A. G., Wallach D. F. H. (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **406**, 161—166.
84. Philippot J. R., Cooper A. G., Wallach D. F. H. (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 956—960.
85. Ho Y. K., Smith R. G., Brown M. S., Goldstein J. L. (1978), *Blood*, **52**, 1099—1114.
86. Bell F. P. (1973), *Exp. Mol. Pathol.*, **19**, 293—303.
87. Fredrickson D. S., Ferrans V. J. (1978). *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, red. Stanbury J. B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S., str. 670—687, McGraw-Hill Book Company, New York.
88. Fielding C. J., Shore V. G., Fielding P. E. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 1493—1498.
89. Glomset J. A., Norum K. R. (1973), *Adv. Lipid. Res.*, **11**, 1—65.
90. Hovig T., Gjone E. (1974), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **33**, (Suppl. 137), 135—146.
91. Steinberg D., Nestel P. J., Weinstein D. B., Remaut-Desmeth M., Chang C. M. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 199—212.
92. Shireman L., Kilgore L. I., Fisher W. R. (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 5150—5154.
93. Assmann G., Brown G., Mahley R. W. (1975) *Biochemistry*, **14**, 3996—4002.
94. Innerarity T. L., Mahley R. W. (1978), *Biochemistry*, **17**, 1440—1447.
95. Swaney J. B., Reese H., Eder H. A. (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 513—519.
96. Mahley R. W., Innerarity T. L., Pitas A. E., Weisgraber K. H., Brown J. H., Gross E. (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7279—7287.
97. Carew T. E., Chapman M. J., Goldstein J. L., Steinberg D. (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **529**, 171—175.
98. Basu S. K., Andersen R. G. W., Goldstein J. L., Brown M. S. (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 119—135.
99. Fung C. H., Khachadurian A. K., Wang C. H., Durr I. F. (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 445—457.
100. Stein O., Weinstein D. B., Stein Y., Steinberg D. (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 14—18.
101. Brown M. S., Goldstein J. L. (1976), *Cell* **9**, 663—674.
102. Goldstein J. L., Brown M. S., Stone N. J. (1977), *Cell*, **12**, 629—641.
103. Chatterjee S., Kwiterovich P. O. (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 1642.
104. Chatterjee S., Sekerke C. S., Kwiterovich P. O. (1976). *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 4338—4343.
105. Fogelman A. M., Seager J., Edwards P. A., Popjak G. (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 644—651.
106. Miller N. E., Weinstein D. B., Steinberg D. (1978), *J. Lip. Res.*, **19**, 644—653.

KRYSTYNA ŚLASKA *

Specyficzne wiązanie polimerazy RNA z DNA jako najwcześniejszy etap transkrypcji u *Prokaryota*

Specific Binding of RNA Polymerase to DNA as the Earliest Step of Transcription in *Prokaryota*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Struktura i funkcja promotorów
- III. Konformacja polimerazy RNA w specyficznych kompleksach z matrycą
- IV. Oddziaływanie polimerazy RNA z DNA prowadzące do inicjacji syntezy RNA w miejscach promotorowych
- V. Uwagi końcowe

Contents:

- I. Introduction
- II. Structure and function of promoters
- III. Conformation of RNA polymerase in specific complexes with a template
- IV. Interaction of RNA polymerase with DNA as a prerequisite of initiation of RNA synthesis in promoters
- V. Concluding remarks

I. Wstęp

Synteza RNA katalizowana przez zależną od DNA polimerazę RNA (E.C.2.7.7.6) jest procesem wieloetapowym. Rozpoczyna go wiązanie en-

* Dr, Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Fizjologii i Biochemii, Akademia Medyczna w Łodzi, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.

Wykaz stosowanych skrótów: endonukleaza restrykcyjna HincII — endonukleaza restrykcyjna izolowana z *Haemophilus influenzae*, serotyp c; pary AT — pary adenina-tymina; pary GC — pary guanina-cytozyna; tRNA^{Trp} — RNA transportujący tyrozynę; gen *araB* — gen jednego z enzymów katabolizujących arabinozę (rybulo-kinazy); operony *bio*, *trp* — operony syntezy biotyny i tryptofanu; operony *lac* i *gal* — operony fermentacji laktozy i galaktozy; ¹Pu — nieokreślona puryna; P₁ — nieokreślona pirymidyna; ²N — dowolny nukleotyd.

zemu z DNA w dwuczłonowy kompleks, który następnie przyłącza rybonukleozydotrójfosforan inicjujący łańcuch RNA.

W układzie homologicznym, w którym transkrypcja genów jest specyficzna, polimeraza wiąże się selektywnie z regionami promotorowymi tych genów.

Regulacja transkrypcji u organizmów prokariotycznych została znacznie lepiej poznana niż u *Eukaryota*. Wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że na ekspresję tylko niektórych genów u *Prokaryota* wpływają czynniki regulacyjne o charakterze aktywatorów lub represorów. Aktywność wielu genów zależy wyłącznie od oddziaływania między polimerazą RNA i specyficznymi sekwencjami na matrycy.

Proces wyboru promotora przez enzym i wiązanie się z nim jest kluczowym etapem regulacji transkrypcji u organizmów prokariotycznych.

Przedstawiony artykuł jest rozwinięciem jednego z rozdziałów pracy przeglądowej na temat charakterystyki procesu transkrypcji u *Prokaryota* i *Eukaryota* (1).

II. Struktura i funkcja promotorów

Pojęcie promotora wprowadzili Jacob i Monod (2) wraz z modelem regulacji aktywności genów u *Prokaryota*. Oznaczało ono miejsce inicjacji transkrypcji wielocistronowego przekazu informacji genetycznej — operonu. Operon, wg Jacoba i Monoda, obejmuje zespół genów kodujących białka, kontrolowany przez wspólny promotor i operator. Szzybalski (3) zastąpił pojęcie operonu rozszerzonym pojęciem skryptonu. Kryterium skryptonu jest obecność jednego promotora, a geny strukturalne wchodzące w jego skład nie muszą kodować białek.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy można scharakteryzować promotor jako genetycznie zdefiniowany odcinek DNA, z którym oddziałuje polimeraza RNA, kontrolujący transkrypcję skryptonu. Definicja promotora daleka jest od precyzji i sugeruje złożoność jego budowy. Postęp w poznaniu struktury promotorów i korelacji z ich funkcją umożliwiło spostrzeżenie, że polimeraza RNA wiążąc się z nimi chroni je przed trawieniem DNazą trzustkową (4—13). Wykorzystując tę obserwację wyizolowano fragmenty DNA z różnych źródeł obejmujące 37—44 nukleotydów. Powstało pytanie czy są one równoważne promotorom, a zatem czy spełniają wszystkie funkcje przypisywane tym strukturom. Sposób ich otrzymywania wskazuje, że polimeraza RNA związana jest z nimi w trwałe kompleksy. Kompleksy te są zdolne do syntezy RNA po dodaniu substratów dając krótkie, około 20-nukleotydowe łańcuchy. Sekwencje zsyntetyzowanych łańcuchów są takie same jak początkowe sekwencje RNA transkrybowanych z odpowiednich promotorów przed trawieniem nukleazami (5—7, 14). Wnioskowano zatem, że wyizolowane kompleksy

polimerazy RNA z fragmentami DNA odpowiadają kompleksom inicjacyjnym. Jednak enzym raz oddysocjowany nie może odtworzyć takich kompleksów (4—7, 14). Widocznie fragmenty DNA z nich pochodzące, choć obejmują miejsca inicjacji wiernej transkrypcji i początkowe odcinki genów strukturalnych, nie zawierają jednak bardzo istotnej dla funkcji promotora, sekwencji rozpoznawanej specyficjnie przez polimerazę RNA (miejsca rozpoznania) i tzw. miejsca „wejścia” enzymu do promotora.

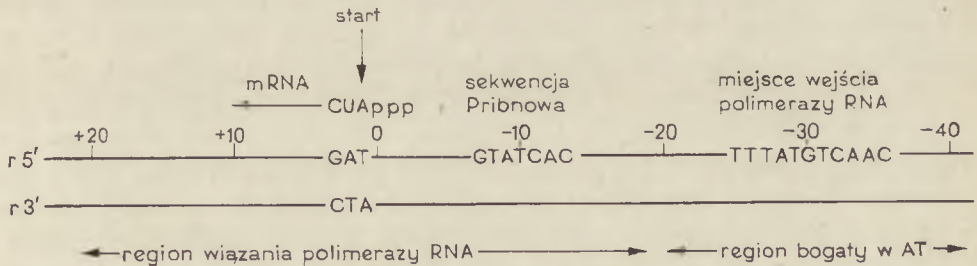
Na podstawie wyników przedstawionych badań nad specyficznym wiązaniem polimerazy RNA z DNA uważa się, że w skład promotora wchodzi następujące struktury:

a) miejsce rozpoznania przez polimerazę RNA i miejsce „wejścia”, z którym enzym ma najwcześniejszy kontakt. (Wzajemna relacja tych dwóch regionów nie jest dotychczas określona).

b) miejsce, z którym enzym jest związany do momentu rozpoczęcia syntezy RNA i w którym otrzymuje sygnał do inicjacji, tzw. miejsce przechowywania

c) miejsce startu transkrypcji kodujące 5' końcowy fragment RNA.

W kilku promotorach w genomie faga λ odległość między miejscem „wejścia” polimerazy RNA i sygnałem startu dla syntezy RNA wynosi około 30 par nukleotydów (13, 15). Na rycinie 1 przedstawiono schemat budowy promotora p_L faga λ z uwzględnieniem odległości między jego poszczególnymi funkcjonalnymi fragmentami. Przyjęto umownie numerację nukleotydów w promotorach poczynając od miejsca startu transkrypcji (punkt „0”). Nukleotydy poniżej tego miejsca, kodujące łańcuch RNA, mają znak „+”, a powyżej znak „-”.



Ryc. 1. Struktura promotora p_L bakteriofaga λ (promotora genu N, kodującego białko znoszące efekt działania niektórych terminatorów, w uproszczeniu (66))

Badanie najbardziej oddalonych od miejsca startu części promotora, a więc miejsc rozpoznania i „wejścia” polimerazy RNA jest trudniejsze gdyż, jak wspomniano, znajdują się one poza fragmentem chronionym przed trawieniem DNazą. Zastosowanie innych aniżeli DNaza I enzymów hydrolizujących DNA pozwoliło ujawnić efekt ochronny polimerazy RNA na dłuższym odcinku promotora, z którym oddziałuje. W promotorach faga λ : p_L i p_R miejsca trawienia przez endonukleazę restrykcyjną $Hin \leftrightarrow c \leftrightarrow II$ poprzedzające o ponad 30 nukleotydów miejsca startu trans-

krypcji były chronione (16, 17), a w p_L po trawieniu kompleksu inicjacyjnego egzonukleazą i nukleazą S_1 otrzymano niestrawiony fragment DNA obejmujący odcinek od -40 do $+20$ (18). Badano także efekt mutacji w regionie promotorowym na jego funkcje. Stwierdzono, że mutacje we fragmencie około 50-nukleotydowym powyżej miejsca startu upośledzają funkcje promotorów (19, 20) podczas gdy mutacje wykraczające poza ten region nie zmieniają ich właściwości (20). Także mutacje w odcinku DNA przylegającym do promotora a kodującym mRNA nie wpływają zasadniczo na funkcjonowanie promotorów, co wskazuje, że w tym regionie nie ma istotnych, zależnych od sekwencji oddziaływań między enzymem a DNA (21, 22).

Zastosowanie endonukleaz restrykcyjnych i map restrykcyjnych dla wielu genomów umożliwiło wyizolowanie promotorów lub ich fragmentów o określonej długości i badanie ich funkcji *in vitro* (4, 11, 23).

Za pomocą wymienionych powyżej metod ustalono, że za specyficzne oddziaływanie z polimerazą RNA odpowiedzialny jest odcinek DNA obejmujący nukleotydy od -50 do $+1$.

Rozszyfrowano także strukturę pierwszorzędową wielu promotorów poprzez oznaczanie sekwencji DNA (13, 18—21, 24—26, 28—31) (Ryc. 2). Stwierdzono, że są w nich fragmenty o większej zawartości par AT. Wiadomo, że łatwość, z jaką podwójna spirala DNA ulega rozpleceniu zależy od zawartości w niej par AT.

Polimeraza RNA tworząc stabilne kompleksy z promotorami wchodzi w ścisły kontakt z nimi na pewnych odcinkach, prawdopodobnie rozplatając podwójną spiralę. Preferencyjne powstawanie kompleksów polimerazy RNA z regionami bogatymi w pary AT notowano jeszcze nim wyizolowano fragmenty promotorów (32, 33). Choć w wielu genomach zaobserwowano lokalizację miejsca wiązania polimerazy RNA w regionach, ze zwiększoną zawartością par AT (34—36) to jednak stwierdzono, że pary AT nie są odpowiedzialne za wiązanie enzymu (36—38). Dane te można pogodzić przy założeniu, że fragmenty bogate w AT ułatwiają tworzenie kompleksów z polimerazą RNA przypuszczalnie przez obniżenie energii wymaganej do lokalnej denaturacji DNA towarzyszącej wiązaniu enzymu. Tak więc miejsca wiązania polimerazy RNA są specyficznymi sekwencjami DNA, których zdolność do tworzenia trwałych kompleksów z enzymem zależy częściowo od wpływu sąsiadujących sekwencji bogatych w pary AT (telestabilność) (39).

Poznanie sekwencji fragmentów wielu promotorów pozwoliło na wykrycie identycznego 7-nukleotydowego odcinka DNA o sekwencji 5' TAT Pu ATG¹ 3' ATA Pi TAC położonego powyżej miejsca inicjacji i oddzielnego od niego 6 parami nukleotydowymi (4—6). Od nazwiska autora, który pierwszy zaobserwował i opisał te sekwencje nazywa się je „sekwencjami Pribnowa” lub „pudełkami Pribnowa”. Charakterystyczna jest ich nie-

zmiennosc w wielu promotorach, a zwlaszcza wystepowanie nukleotydu adenylowego w pozycji 2 i tymidylowego w pozycji 6 od konca 5' fragmentu (40). W zwiazku z wysoka zawartoscia par AT w sekwencjach Pribnowa i polozeniem w bliskim sasiedztwie miejsca inicjacji transkrypcji postuluje sie ich bezposredni udzial w tworzeniu trwalych kompleksow z polimeraza RNA.

Znaczenie innego fragmentu promotora dla jego funkcji stwierdzono obserwujac efekty mutacji oraz trawienia endonukleazami restrykcyjnymi w odcinku DNA obejmujacym okolo 35 par zasad poprzedzajacych miejsce inicjacji syntezy RNA. Mutacje w tym odcinku znosily lub zaburzaly funkcje promotorow (16, 17, 20, 23, 41, 42). Jest to fragment okolo 12-nukleotyduowy polozony w odleglosci 24 nukleotyduow powyzej miejsca inicjacji, a o 11 nukleotyduow poprzedzajacy sekwencje Pribnowa. Region ten, okreslony jako region rozpoznania, wykazuje takze znaczna homologie w wielu promotorach (4, 8, 13, 43, 44). Zaobserwowano dwa typy sekwencji w miejscach rozpoznania, dzielac na tej podstawie promotory na dwie grupy. Promotory I typu zawieraja w miejscu rozpoznania sekwencje TGTTGACAATTT (4—6, 12, 13, 21, 43, 45—48) i znajduja sie czesto w genomach bakteriofagow. W obrębie tej sekwencji najbardziej konserwatywny jest odcinek pieciu pierwszych nukleotyduow TGTTG. Szczegolne znaczenie czwartej zasady w tym 5-nukleotyduowym fragmencie ujawnilo sie w badaniu promotora niezbyt wydajnie transkrybowanego genu konstytutywnego dla represora laktozowego (*lacI*) (Ryc. 3). Gen ten nie wymaga do ekspresji dodatkowych czynnikow regulacyjnych, a wiec mozna przypuszczac, ze za niska wydajnosć jego transkrypcji odpowiedzialna jest struktura promotora. W regionie rozpoznania promotor ten zawiera sekwencje pęcionukleotyduowa TGGCG zamiast TGTTG. Podstawienie czwartej zasady, cytozyny (w pozycji —35 od miejsca startu) przez tymine w promotorze mutanta *lacI^a* powoduje bardzo znaczne zwiekszenie wydajnosci ekspresji genu (31). Sugeruje to, ze oddziaływanie polimerazy RNA z nukleotydem w pozycji —35 promotora jest istotne dla tworzenia kompleksu promotorowego. Poza promotorem *lacI* innym przykladem promotora wykazujacego zmniejszone podobienstwo struktury w regionie rozpoznania w stosunku do innych promotorow jest promotor *ara* ↔ B (52).

W promotorach II typu wystepuje sekwencja NNNNNACACTTT² Ten typ promotorow spotykany jest czesto w operonach regulowanych przez bialko wiązace cAMP (CAP) (20, 40, 49—51). Wieksza zmienność sekwencji II typu w miejscu rozpoznania mozna tłumaczyc wieksza zlozonoscia kierowanych przez nie skryptonow i udzialem dodatkowych czynnikow regulujacych transkrypcje. Wystepowanie w wiekszosci promotorow dwuch fragmentow o znacznej homologii: 7-nukleotyduowej sekwencji Pribnowa i 12-nukleotyduowego odcinka w regionie rozpoznania sugeruje ich kluczowa role w funkcjonowaniu promotorow. Konserwatywnosc sek-

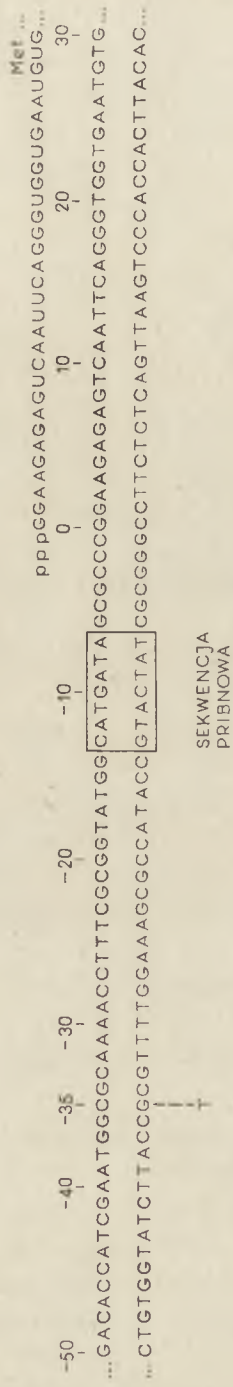
-35	-30	-20	-10	0+			
TGGCGG	TGTTGACATAAA	TA	CCACTGGCGG	TGATACT	GAGCACATC	λ P _L	
CGTGCG	TGTTGACTATTT	TA	CCCTGGCGG	TGATAAT	GGTTGCATG	λ P _R	
TGCCGA	AGTTGAGTATTT	TT	GCTGTATTG	TCAATAAT	GACTCCTGT	λ P _O	
GCACGG	TGTTAGATATTT	TA	TCCCTTGCCTG	ATAGATT	TAACGTATG	λ P _{pr}	
TCCTTT	TGATGCAATTC	GCT	TTGCTTCTG	ACTATAAT	AGACAGGGT	fdX	
CATTAAC	CGTTTACAATTT	AAA	AYATTTGCTT	ATACAAT	CATCCTGTT	fdII	
AATCTC	CGTTGTACTTT	GTT	TCGCGCTTG	GTATAAT	CGCTGGGGT	fdVII	
CGTCAG	GATGACACCC	TCC	CAATTGTA	TGTTTT	TCATGCC	TCCAAA	Φ XA
TTCTCT	TGTTGACATTT	TA	AAAGAGCG	TGGATTA	ACTATCT	GAGTCCG	Φ XD
TAAA	TAGCTTGCAAAA	TA	CGTGCCCT	TATGGT	TACAGT	ATGCCCATC	Φ XB
AATTGT	TGTTGTTAACT	TGTT	TATTGCA	GCTTATAAT	GGTTACAAA	SV40	
AGGCTT	TACACTTT	TATGC	TTCCGGCT	CGTATGTTG	TGTGGAATT	LacZ	
CCCCAG	GCCTTACACTTT	ATGCT	TTCCGGCT	CGTATGTTG	TGTGGAATT	lacUV5	
AGCTGT	TGTTGACAAATTA	ATC	ATCGAACT	AGTTAACTA	GTAACGCAAG	trpE	
AAACGT	GTTTTT	TGTTGT	TAATTC	GGTGTAG	ACTTGTAAACCTA	bioA	
TCGACT	TGTTAAACCAAT	AT	TGAAAAGAT	TTAGGTTT	ACAAAGTCTA	bioB	

Ryc. 2. Sekwencja nukleotydów w promotorach:

bakteriofaga λ — PL (por. opis ryc. 1) (19), PR (promotor genu *cro* kodującego białko represorowe dla genów wczesnej transkrypcji) (7, 25), P_O (promotor genu kodującego 4S RNA pełniącego rolę terminatora przy braku ϕ), (45), pr_m (promotor genów: cI, kodującego białko represorowe i *rex*, kodującego białko hamujące wzrost mutantów T4 rII i stymulujące wzrost gospodarza przy niedobrze źródle węgla) (18); fdII, fdVIII, fdX — promotory w odpowiednich odcinkach genomu bakteriofaga fd (4, 12, 43, 44); Φ XA, Φ XB, Φ XD — promotory w genomie faga Φ X (28); SV40 — silny promotor w pozycji 0,17 na mapie genetycznej faga SV40 (48);

E. coli — trpE — promotor operonu syntezy tryptofanu, przylegający do genu strukturalnego E (21), lacUV5 — promotor operonu fermentacji galaktozy z mutacją powodującą jego niezależność od czynnika regulacyjnego CAP i zwiększającą siłę wiązania poli-merazy (62); lacZ — promotor operonu fermentacji laktozy, kierujący syntezą genów z, y i a, z których gen z jest połączony najbliższej

Sekwencje zakreślone — podobne sekwencje w regionie — 10 (sekwencja Pribnowa i w regionie — 35



Ryc. 3. Sekwencja nukleotydów w promotorze genu represora laktozowego *lacI*; I^q — mutacja w promotorze tego genu (31)

wencji Pribnowa w wielu promotorach, znaczna zawartość AT, ich położenie w sąsiedztwie miejsc inicjacji, występowanie w trwałym kompleksie z polimerazą RNA przemawia za uczestnictwem tych sekwencji w tworzeniu funkcjonalnego kompleksu inicjacyjnego. 12-nukleotydowy fragment promotora w regionie wokół nukleotydu -35 , choć istotny dla specyficznego oddziaływania z polimerazą, jest z nią w mniej ścisłym kontakcie, co przejawia się m.in. we wrażliwości tego odcinka na trawienie DNazą, gdy enzym jest związany w kompleksie promotorowym (53).

W jednym z pierwszych modeli powstawania kompleksu inicjacyjnego zakładano oddziaływanie polimerazy RNA z miejscem rozpoznania a następnie przesunięcie enzymu do sekwencji Pribnowa, z którą tworzy trwały kompleks. Nowsze dane wskazują, że przesunięcie enzymu w obrębie promotora w trakcie tworzenia stabilnych kompleksów nie jest konieczne gdyż konformacja enzymu pozwala na oddziaływanie z obydwoma regionami bez odrywania się od matrycy. Polimeraza RNA po rozpoznaniu określonej sekwencji w promotorze, dającej sygnał do wiązania, tworzy stabilny kompleks z promotorem. Jego trwałość wynika z tego, że enzym powoduje rozwijanie podwójnej nici DNA w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji (44, 54, 55). To lokalne otwarcie podwójnej spirali DNA przez polimerazę RNA następuje na odcinku od 5 do 15 nukleotydu powyżej miejsca inicjacji (56—58).

Dość znaczna, choć zmienna zawartość par AT w regionie rozpoznania pozwoliła Seeburgowi i wsp. (44) zaproponować model kontroli wiązania enzymu i stabilności kompleksów w oparciu o możliwość „topnienia” DNA nie tylko w obrębie sekwencji Pribnowa. Warunkowałyby to dwupoziomową aktywację kompleksów promotorowych.

Autorzy postulują następujące możliwości udziału miejsca rozpoznania i sekwencji Pribnowa w wiązaniu polimerazy:

- a) enzym „topi” krótką sekwencję Pribnowa a kompleks jest stabilizowany przez drugą sekwencję wiążącą (miejsce rozpoznania) lub
- b) sekwencja Pribnowa może być rozpoznawana przez polimerazę już w otwartej częściowo formie bez konieczności udziału określonej sekwencji w drugim miejscu wiązania.

Z modelu opracowanego przez Seeburga i wsp. (44) wynika znacznie większa rola sekwencji Pribnowa niż sekwencji rozpoznania w tworzeniu kompleksów promotorowych.

Porównywano zawartość par AT w obydwu fragmentach wiążących różnych promotorów z wydajnością transkrypcji kontrolowanych przez nie genów i stabilnością kompleksów z polimerazą RNA i znaleziono między nimi korelację. Okazało się, że promotory genów wydajnie transkrybowanych, tzw. „silne” promotory charakteryzują się większą zawartością par AT w obydwu sekwencjach aniżeli promotory genów

o niskim poziomie transkrypcji, tzw. „słabe” promotory. Stwierdzono to m.in. na przykładzie wspomnianego już bardzo słabego promotora genu represora laktozowego (*lacI*) (31), w którym skład sekwencji Pribnowa odbiega od typowego, gdyż zawiera dwie odmienne zasady (por. ryc. 3). Przypuszczalne znaczenie dla funkcjonowania tego promotora ma także fakt, że odcinek promotora między sekwencją Pribnowa a miejscem inicjacji transkrypcji złożony jest wyłącznie z par GC znacznie trudniej ulegających rozdzieleniu niż pary AT. Podobną sekwencję znaleziono w promotorze dla genu *tRNA^{Tr}* *E. coli* (27). Może być ona przyczyną słabego wiązania polimerazy RNA z tym promotorem *in vitro* (59). Efekt obecności cytozyny zamiast tyminy w pozycji -35 w regionie rozpoznania promotora *lac*→I został już wcześniej opisany. Ogólnie w promotorze tym pary GC stanowią 28 spośród 50 par nukleotydowych (31), podczas gdy większość promotorów zawiera pary AT w przewodzie. Mutacje punktowe w promotorze operonu laktozowego polegające na zastąpieniu par GC parami AT powodują wielokrotne zwiększenie aktywności tego promotora zarówno wtedy gdy występują one w obrębie sekwencji Pribnowa jak i w bliskim ich sąsiedztwie (20, 60, 61).

Choć oddziaływanie polimerazy ze specyficznymi sekwencjami promotora ma większe znaczenie dla jego funkcji niż jego podatność na rozplatanie (62) to właściwości termodynamiczne także wpływają na funkcjonowanie promotorów.

Wyniki ostatnich badań nad wiązaniem polimerazy RNA z miejscami promotorowymi potwierdziły dotychczasowy model oddziaływania uzupełniając go o nowe informacje. Określono fragment DNA będący w bezpośrednim kontakcie z enzymem przez wykazanie ochronnego działania białka enzymatycznego przed metylacją określonych zasad w DNA za pomocą dwumetylosiarczanu. Znając sekwencje promotorów można precyzyjnie ustalić sposób interakcji DNA z enzymem. Następuje ona w dużym rowku spirali DNA. Polimeraza RNA oddziałuje równolegle z regionem rozpoznania (wokół -35 nukleotydu), regionem Pribnowa (wokół -10 nukleotydu) i regionem inicjacji (wokół -1 nukleotydu), osłaniając co najmniej 38 par zasad powyżej miejsca startu transkrypcji (63). Pomiar z zastosowaniem promieni X sugerują, że monomer holoenzymu ma długość 150 Å (64) wystarczający jedynie do osłonięcia 30—40 par zasad. Ponieważ polimeraza RNA chroni przed trawieniem nukleazami odcinek DNA obejmujący około 60 nukleotydów (por. początek rozdziału), zatem DNA musi częściowo skręcać się wokół polimerazy.

Informacje o działaniu ochronnym polimerazy RNA przed metylacją DNA gdy związany jest on w kompleksie promotorowym (63) potwierdzają dane o odwijaniu spirali DNA o 1—1,5 obrotu w pobliżu miejsca inicjacji transkrypcji przez polimerazę RNA (56, 65).

III. Konformacja polimerazy RNA w specyficznych kompleksach z matrycą

O selektywności transkrypcji decyduje zarówno struktura DNA w miejscach promotorowych jak i szczególna konformacja polimerazy RNA w kompleksach zdolnych do szybkiej inicjacji syntezy RNA. Większość informacji zgromadzonych dotychczas dotyczy struktury DNA wyznaczającej specyficzność kompleksów, dysponowano bowiem większym arsenalem dostępnych metod a interpretacja wyników była bardziej jednoznaczna (por. rozdz. I).

Polimerazy bakteryjne mają złożoną budowę podjednostkową (α , α , β , β' , σ). Najlepiej została poznana budowa i funkcja enzymu *Escherichia coli* i z nim prowadzona jest większość badań. Już we wczesnym etapie prac nad strukturą polimerazy (holoenzymu) stwierdzono, że jedna z jej podjednostek, czynnik σ , daje się łatwo oddysocjować od pozostałej części cząsteczki enzymu podstawowego („rdzenia”; α , α , β , β') w trakcie chromatografii na fosfocelulozie (68). Dzięki takiemu zachowaniu czynnika σ można było zbadać jego rolę w procesie transkrypcji. Okazało się, że czynnik σ odpowiedzialny jest za specyficzność wiązania polimerazy RNA z matrycą i specyficzność inicjacji (69—74). Rola czynnika σ polega na:

a) zmniejszaniu niespecyficznego wiązania polimerazy RNA z DNA i zwiększaniu szybkości dysocjacji przypadkowych kompleksów (75, 76);

b) zapewnianiu wysokiej stabilności kompleksów enzymu z DNA w miejscach specyficznych (75) i zmniejszaniu wrażliwości tych kompleksów na inhibitory o charakterze polianionów (77). (Czynnik ten jest prawdopodobnie odpowiedzialny za tworzenie aktywnych kompleksów promotorowych);

c) zmniejszaniu zdolności rdzenia enzymu do inicjowania syntezy RNA w jednoniciowych odcinkach DNA nie będących promotorami (78).

Podsumowując, obecność σ decyduje o wierności transkrypcji przez polimerazę RNA (79—82). Po spełnieniu swej roli stabilizującej kompleks promotorowy i ułatwiającej inicjację podjednostka σ uwalniana jest z kompleksu polimeraza RNA-DNA-tworzący się RNA o długości kilku nukleotydów (73, 79, 80, 83).

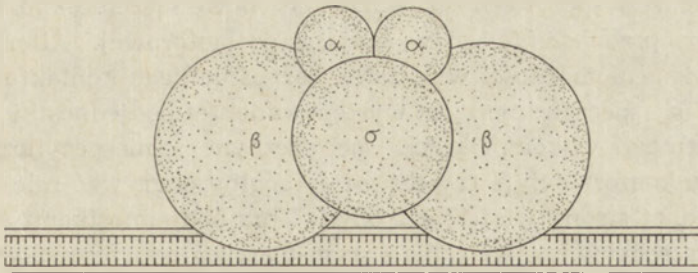
W miarę wnikania w istotę kompleksów promotorowych stwierdzono udział czynnika σ w zależnym od temperatury rozplataniu podwójnej spirali DNA i tworzeniu kompleksów preinicjacyjnych zdolnych do szybkiego rozpoczęcia syntezy RNA (84). Możliwe jest wyjaśnienie działania σ bądź poprzez wpływ na strukturę DNA, ułatwianie jego rozwinięcia na krótkim odcinku bądź też poprzez odpowiednią zmianę konformacji polimerazy RNA w kompleksach promotorowych.

Pierwszy sposób wyjaśnienia roli σ trafia łatwiej do przekonania bowiem reakcja zależna jest od temperatury (77, 80, 85, 86). Niemniej pewne wyniki wskazują na to, że zależność taka mogłaby być także wywołana

przekształceniami enzymu. I tak na przykład Wu i wsp. (87) badając wiązanie σ z rdzeniem enzymu zarejestrowali zmianę konformacji utworzonego holoenzymu. Sugerują oni, że σ wiążąc się z rdzeniem zmienia konformację enzymu tak, że rozpoznaje on właściwe promotory i specyficznie inicjuje syntezę RNA. Istota tego przekształcenia jest dotychczas niejasna.

Badanie polimerazy RNA w kompleksach z promotorami przez długi czas było utrudnione ze względu na niedostatek metod „utrwalenia” tych kompleksów. Ostatnio wykorzystano, stosowaną już wcześniej do badania specyficznego interakcji białko-DNA, metodę tworzenia wiązań krzyżowych (*cross-links*) pod wpływem promieniowania UV (88—91). Metoda ta prowadzi do powstania wiązań kowalencyjnych między białkiem i DNA wtedy gdy są one bardzo blisko siebie. Powstałe kompleksy są trwałe, odporne na dysocjację pod wpływem soli o wysokim stężeniu i ogrzewanie. Dla zwiększenia trwałości wiązania białko-DNA można podstawić tymidynę w DNA bromodezoksyurydyną (BrdUrd) (89, 92). Za pomocą tej metody wyizolowano kompleksy polimerazy RNA-DNA a następnie odysocjowano podjednostki enzymu nie oddziaływujące z matrycą. W kompleksach kowalencyjnych pozostawały części enzymu będące w bezpośrednim kontakcie z DNA.

Wyniki badań nad interakcją polimerazy RNA z DNA w kompleksach ze specyficznymi promotorami prowadzone w dwóch zespołach różniły się sugerując odmienną konformację enzymu związanego z DNA (67, 93). Z obydwu prac wynika zaangażowanie podjednostek β i σ w kompleksach specyficznych z DNA, brak bezpośredniego kontaktu podjednostek α z matrycą w tych kompleksach, natomiast sporne jest zagadnienie występowania w nich podjednostek β' . Z pracy Hillel i Wu (67) wynika, że β' oddziałuje z matrycą w niespecyficznych kompleksach enzym-DNA, natomiast brak takiego oddziaływania w kompleksach specyficznych. Czyniąc to różnicowanie autorzy zachowali warunki tworzenia specyficznych kompleksów. Z badań Okady i wsp. (93) wynika, że zarówno β jak i β' a także σ , choć z nieco mniejszym stopniem, pozostają w



Ryc. 4. Model przestrzennego rozmieszczenia podjednostek polimerazy RNA w kompleksie enzymu z DNA opracowany na podstawie wyników wiązań krzyżowych (*crosslinking*) (93)

kontakcie z matrycą zarówno w kompleksach specyficznych jak i niespecyficznych. Należy jednak zaznaczyć, że autorzy ci posługiwali się gorzej scharakteryzowaną matrycą zapewniając specyficzność wiązania jedynie za pomocą niskiego stosunku enzymu do DNA. Model oddziaływania polimerazy RNA z DNA proponowany przez tych autorów przedstawiony jest na ryc. 4. Zgadza się on lepiej z poprzednimi danymi dotyczącymi udziału poszczególnych podjednostek polimerazy RNA w procesie transkrypcji. Bezpośredni kontakt podjednostki β z DNA przed i w czasie inicjacji transkrypcji jest uzasadniony wobec faktu, że podjednostka ta zawiera miejsca wiązania substratów (94—96) i dlatego może także zawierać centrum katalityczne enzymu. β' jest jedyną podjednostką, która izolowana z enzymu wydajnie wiąże się z DNA (97, 98). Mutacje w genie kodującym podjednostkę β' powodowały zmniejszone powinowactwo polimerazy RNA do DNA (99) lub niezdolność do wiązania z miejscami promotorowymi (100) zatem należy się spodziewać jej bezpośredniego kontaktu z matrycą w kompleksach promotorowych. Za pośrednim udziałem podjednostki σ w kompleksach promotorowych, (por. Ryc. 2), przemawia niezdolność wyizolowanej tej podjednostki do wiązania się z DNA (77). Jak już wspomniano sugeruje się jej wpływ na zmiany konformacji enzymu w kompleksie.

Sposób oddziaływania polimerazy RNA z matrycą w kompleksach specyficznych, sugerowany przez Hillel i Wu (67), wydaje się być bardziej wiarygodny niż przedstawiony powyżej ze względu na zachowanie warunków zapewniających specyficzność wiązania. Badacze ci nie przedstawiają jednakże modelu konformacji enzymu w tych kompleksach a podane wyniki nie pozwalają na opracowanie precyzyjnego modelu. Interpretują oni brak oddziaływania podjednostki β' z DNA w kompleksach specyficznych a jej oddziaływanie w kompleksach niespecyficznych odmienną konformacją polimerazy RNA w tych dwóch typach kompleksów. β' , według autorów (67), mogłaby zwiększać ogólne powinowactwo enzymu do DNA ułatwiając poszukiwanie promotorów na matrycy. (Istnieje hipoteza udziału niespecyficznych miejsc wiązania polimerazy RNA w tworzeniu kompleksów specyficznych poprzez chwilowe łączenie z nimi enzymu, a następnie przenoszenie go w miejsca promotorowe). Alternatywnym wyjaśnieniem niemożności wykazania bezpośredniego kontaktu β' z DNA w kompleksie specyficznym jest występowanie tej podjednostki w odmiennej konformacji w kompleksach specyficznym i niespecyficznym (67). W zmianie konformacji β' czy też β i β' mógłby odgrywać rolę czynnik σ , który z jednej strony wiąże się z obydwoma podjednostkami a z drugiej wpływa na specyficzne wiązanie enzym-matryca poprzez wpływ na konformację enzymu (por. początek rozdziału).

IV. Oddziaływanie polimerazy RNA z DNA prowadzące do inicjacji syntezy RNA w miejscach promotorowych

Gdy polimeraza RNA znajduje się w dużym nadmiarze w stosunku do ilości miejsc promotorowych na DNA, może wiązać się z matrycą w sposób niespecyficzny, na zasadzie powinowactwa do polinukleotydów (75, 102). Ilość niespecyficznych miejsc wiązania bliska jest „granicznej pojemności” danego DNA dla ściśle upakowanych cząsteczek polimerazy (54, 75, 103). W genomie faga T7 ilość niespecyficznych miejsc wiązania przewyższa 1×10^4 razy ilość miejsc promotorowych (54, 75, 104, 105). Prawdopodobieństwo trafienia polimerazy RNA na promotor na DNA T7 na drodze przypadkowego wiązania wynosi $1/10^4$. W świetle stwierdzonego bardzo szybkiego łączenia się enzymu z miejscami promotorowymi (czas, w którym połowa cząsteczek jest związana wynosi $t_{1/2} = 15-20$ sek) (75) wątpliwe jest aby enzym wiązał się z nimi jedynie na drodze dysocjacji z kompleksów niespecyficznych i ponownej asocjacji z matrycą (wymagałoby to około 600—1000 sek) (102). Sugerowana jest możliwość osiągnięcia równowagi wiązania polimerazy RNA z miejscami specyficznymi i niespecyficznymi poprzez bezpośrednie przenoszenie jej między tymi miejscami bez etapu uwalniania z matrycy (102, 106).

Możliwość taka zgadza się z obserwacjami, że *in vivo* białka regulatorowe (m.in. polimeraza RNA) są stale związane z DNA (107). Gdy ilość cząsteczek polimerazy RNA bliska jest ilości potrzebnej do nasycenia miejsc promotorowych na danej matrycy (co najprawdopodobniej odpowiada warunkom fizjologicznym występującym w komórce) enzym wiąże się preferencyjnie z tymi miejscami ze względu na znacznie większe do nich powinowactwo: stała asocjacji dla kompleksów specyficznych $K_a = 10^{12} - 10^{14} M^{-1}$ (75, 102, 106, 108), dla niespecyficznych $K_a = 10^6 - 10^8 M^{-1}$ (75, 102) lub $3 \times 10^4 M^{-1}$ (109).

Polimeraza RNA po rozpoznaniu odpowiednich sekwencji promotorowych tworzy z nimi najpierw luźny ale specyficzny kompleks tzw. zamknięty (102, 110). Enzym związany jest na zewnątrz podwójnej spirali DNA. Określenie kompleksu jako „zamknięty” wskazuje na niezmienioną strukturę drugorzędową matrycy w tym kompleksie. W badaniach *in vitro* losy „zamkniętego” kompleksu zależą od warunków w jakich się znajduje, przede wszystkim od temperatury i siły jonowej (54). W temperaturze poniżej $15^\circ C$ i w wysokiej sile jonowej roztworu (powyżej 0,2 M KCl) kompleksy te nie ulegają dalszym przekształceniom, niewiele z nich (około 1%) może inicjować syntezę RNA bardzo szybko (111, 112). Większość tych kompleksów pozostaje więc nieaktywna. Natomiast gdy siła jonowa roztworu zostanie obniżona a temperatura podwyższona zamknięte kompleksy przekształcają się w „otwarte” kompleksy promotorowe. Przejście to, jak omówiono powyżej, obejmuje rozplatanie DNA na krótkim odcinku. Polimeraza związana jest w kompleksach

z fragmentami DNA, w których podwójna spirala jest częściowo rozwinięta stąd określenie tego typu kompleksów jako „otwarte” (54, 55, 75, 77, 84, 86, 113). Jakkolwiek kompleksy „otwarte” obejmują te same fragmenty DNA co kompleksy „zamknięte”, to ich właściwości znacznie się różnią. „Otwarte” kompleksy promotorowe, nazywane także „szybko startującymi” lub „preinicjacyjnymi”, co wskazuje na ich zdolność do natychmiastowego rozpoczęcia syntezy RNA po dodaniu substratów (110), charakteryzuje:

- 1) wysoka stabilność (półokres dysocjacji rzędu od kilku minut do kilkudziesięciu godzin (75, 84, 104, 114—116),
- 2) zależność od siły jonowej i temperatury (75, 84, 104, 114),
- 3) zwiększona oporność na działanie inhibitorów takich jak rifampicyna (104), i heparyna (75, 77).
- 4) zdolność do szybkiej inicjacji syntezy RNA po dostarczeniu rybonukleozydotrójfosforanów (75, 110, 123).

Dzięki takim właściwościom „otwarte” kompleksy promotorowe można wyizolować i scharakteryzować. Szczególnie użytecznymi metodami, toteż i najczęściej stosowanymi, są: mikroskopia elektronowa (57, 82, 117—120), zatrzymywanie kompleksów na sączkach nitrocełulozowych (36, 44, 75, 114—116, 121, 122, 124, 125), analiza kompleksów opornych na działanie DNazy (por. rozdz. I).

Z modelu oddziaływania polimerazy RNA z DNA w miejscach specyficznych przedstawionego powyżej a zaproponowanego po raz pierwszy przez Chamberlina (54, 102) wynika istnienie dwóch rodzajów kompleksów promotorowych, pozostających w równowadze, „zamkniętych” i „otwartych”. O ile właściwości tych drugich pozwalają na ich wyodrębnienie i badanie (patrz wyżej) o tyle analiza pierwszej grupy promotorów przedstawia znaczne trudności. Kompleksy „zamknięte” łatwo ulegają dysocjacji podobnie jak kompleksy niespecyficzne. Niektórzy badacze podają w wątpliwość ich istnienie (44, 119). Autor modelu (54, 102) broni jednak, wydaje się skutecznie, swej koncepcji przedstawiając pośrednie (123) jak i bezpośrednie (109) dowody na powstawanie specyficznych kompleksów promotorowych także wtedy, gdy temperatura nie pozwala na ich „otwarcie”.

W przedstawionych badaniach inkubowano polimerazę RNA *E. coli* z DNA bakteriofaga T7 (123) lub z jego fragmentami otrzymanymi w wyniku działania endonukleaz restrykcyjnych (109). Ilość i rozmieszczenie promotorów na DNA T7 zostały dobrze poznane i wcześniej opisane (55, 82, 118, 126—129, 130, 131). Prowadząc reakcję wiązania polimerazy RNA z matrycą przy niskim stosunku molowym i w niskiej temperaturze Stahl i Chamberlin (123) zapewnili z jednej strony specyficzność wiązania a z drugiej uniemożliwili powstanie otwartych kompleksów promotorowych. Po dodaniu nukleozydotrójfosforanów i po podwyższeniu temperatury kompleksy te przekształciły się w kompleksy inicjacyjne,

choć z pewnym opóźnieniem ($t_{1/2} = 30$ sek). Niezdolność do szybkiej inicjacji jest charakterystyczna dla zamkniętych kompleksów promotorowych. Analiza uzyskanych transkryptów potwierdziła ich identyczność z transkryptami zainicjowanymi w poszczególnych promotorach, gdy kompleksy enzym-DNA tworzone były w podwyższonej temperaturze jak i z transkryptami otrzymanymi *in vivo*. Jest to dowód, że zamknięte kompleksy były rzeczywiście kompleksami promotorowymi. Bezpośredni dowód na istnienie zamkniętych kompleksów promotorowych uzyskano z mikroskopii elektronowej. W wyniku inkubacji w temp. 0°C rozmieszczenie polimerazy RNA na fragmencie DNA T7 zawierającym 4 promotory było identyczne z rozmieszczeniem enzymu gdy wiązanie prowadzono w temp. 37°C i odpowiadało lokalizacji promotorów (109). Dodatkowo zapewniono specyficzną wiązania zachowując niski stosunek molowy enzym/fragment DNA = 1—2.

Ze względu na wydajność transkrypcji kontrolowanych przez nie genów, na częstość wydarzeń inicjacyjnych, można zróżnicować promotory na „silne” i „słabe”. W oparciu o kolejność wiązania się polimerazy RNA z różnymi promotorami wyróżniono wśród nich promotory główne i dodatkowe.

Jaką jest relacja między „siłą” promotorów a wiązaniem z nimi polimerazy RNA? Odpowiedź na to pytanie stała się możliwa w ostatnich latach gdy wprowadzono endonukleazy restrykcyjne jako narzędzie w badaniach biochemicznych. Zastosowanie tych enzymów pozwoliło na oddzielenie od siebie poszczególnych promotorów w tym samym genomie i porównanie ich właściwości. Stahl i Chamberlin (123) badali różnice w oddziaływaniu polimerazy RNA *E. coli* z głównymi i dodatkowymi promotorami w DNA T7. Rola promotorów dodatkowych w tym genomie nie jest jasna chociaż o ich występowaniu doniosło wielu autorów (123, 126—129). Polimeraza RNA wiąże się z dodatkowymi promotorami dopiero wtedy gdy promotory główne zostały „nasycone” enzymem (123). Różnice w efektywności działania promotorów nie ujawniły się na poziomie zamkniętych kompleksów, lecz w kinetyce tworzenia kompleksów preinicjacyjnych. Autorzy sugerują jednakową szybkość powstawania zamkniętych kompleksów polimerazy RNA z wszystkimi promotorami, zróżnicowanie następowałoby na etapie „otwarcia” kompleksów. Przemawiają za tym także wyniki uzyskane inną metodą i na innej matrycy (125). Poza tym kompleksy z promotorami dodatkowymi nie różnią się stabilnością i opornością na heparynę i rifampicynę od kompleksów z promotorami głównymi.

Jakkolwiek teoretycznie możliwe jest by kontrola oddziaływania polimerazy RNA-DNA decydująca o wyborze miejsc promotorowych i ich funkcjonowaniu odbywała się poprzez:

1) zróżnicowaną kinetykę wiązania enzymu z promotorami (a) na poziomie tworzenia zamkniętego kompleksu, (b) na poziomie „otwarcia” tego

kompleksu, rozwijania w nim DNA,

2) różną stabilność kompleksów: (a) zamkniętych, (b) otwartych to dotychczas uzyskane dane doświadczałne przemawiają wyłącznie za kinetycznym mechanizmem kontroli (44, 115, 116, 123).

Stahl i Chamberlin (123) opowiadają się za tym, że kinetyka tworzenia „otwartych” kompleksów promotorowych wyznacza wydajność użycia promotorów, decyduje o ich „sile” (mechanizm 1 b). Taką samą koncepcję wysuwają inni autorzy, badający wiązanie polimerazy RNA z innymi DNA niż DNA faga T7 (44, 115, 116, 123) mimo iż nie uwzględniają oni powstawania „zamkniętych” kompleksów jako etapu poprzedzającego tworzenie „otwartych” kompleksów promotorowych. Znalezione wprost proporcjonalną zależność między „siłą” promotorów, szybkością wiązania się nimi polimerazy RNA *in vitro* i wydajnością transkrypcji kontrolowanych przez nie genów *in vitro* i *in vivo* (44, 115, 116).

Von Gabain i Bujard (116) porównywali kinetykę tworzenia kompleksów polimerazy RNA nie tylko z różnymi promotorami w tym samym genomie ale także w różnych genomach fagowych i bakteryjnych. Znaleźli oni znaczne różnice, co najmniej dwóch rzędów wielkości, w szybkości wiązania enzymu z promotorami na matrycach różnego pochodzenia a nawet 6-7-krotne między promotorami w tym samym DNA (stałe szybkości wiązania dle reakcji II rzędu $k_a = 10^6 - 10^8 M^{-1} \text{sek}^{-1}$) (115). Interpretując te wyniki należy jednak brać pod uwagę, że autorzy porównywali oddziaływanie enzymu z fragmentami DNA różnej wielkości, w niektórych wypadkach z całymi genomami. Być może wielkość cząsteczki (fragmentu), jego struktura trzeciorzędowa także wpływa na „dostępność” do niej polimerazy, co ostatecznie może ograniczać porównywalność uzyskanych wyników.

V. Uwagi końcowe

Przedstawione wyniki badań jednoznacznie sugerują, że transkrypcja genów prokariotycznych poprzedzona jest specyficznym wiązaniem polimerazy RNA z promotorami, które charakteryzują się zwiększoną zawartością par AT w pewnych odcinkach. Fragmenty ↔ z przewagą par AT zarówno ułatwiają początkową interakcję enzymu w regionie rozpoznania jak i umożliwiają tworzenie stabilnych „otwartych” kompleksów promotorowych w regionie obejmującym sekwencję Pribnowa. Trwałość „otwartych” kompleksów wynika ze ścisłego kontaktu polimerazy RNA z promotorem, w którym na krótkim odcinku (5—15 par zasad) podwójna spirala jest rozwinięta. Polimeraza pełni tu rolę białka „topiącego” DNA.

Polimeraza RNA nie jest jedynym białkiem, którego zdolność do tworzenia trwałych kompleksów z DNA wynika z oddziaływania z uprzed-

nio rozplecioną spiralą DNA. Podobny jest mechanizm wiązania czynników regulujących transkrypcję takich jak represory i, wg jednej z koncepcji, białko wiążące cAMP (CAP). Wpływ wymienionych białek regulatorowych na transkrypcję został świadomie pominięty w niniejszym artykule ponieważ regulacja ekspresji tylko niektórych genów u organizmów prokariotycznych wymaga czynników dodatkowych natomiast regulacja transkrypcji poprzez oddziaływanie polimerazy z matrycą ma charakter uniwersalny. Poza tym szczupłość miejsca nie pozwala na wyczerpujące omówienie wpływu czynników regulacyjnych na transkrypcję, co może być przedmiotem odrębnego artykułu.

Wydaje się jednak celowe porównanie oddziaływania polimerazy RNA i czynników regulatorowych z matrycą pod kątem wzajemnej korelacji tych oddziaływań, znajdującej swój wyraz w zdolności polimerazy RNA do transkrypcji.

Znane represory genów *E. coli*: *bio*, *gal*, *trp*, *lac* i represory genów faga λ uniemożliwiają wiązanie polimerazy RNA z promotorami, wiążąc się bezpośrednio z DNA w regionach operatorowych (133). Lokalizacja operatorów pokrywa się częściowo z lokalizacją promotorów a więc represory izosterycznie hamują wiązanie polimerazy (7, 21, 23, 30, 46, 51, 134, 135). Wiązanie represorów z operatorami jest trwałe na tej samej zasadzie na jakiej trwałe są „otwarte” kompleksy polimerazy RNA z promotorami, ponieważ obejmuje te same regiony DNA ze zwiększoną zawartością par AT. Ostatnio stwierdzono jednakże w doświadczeniach kompetycyjnych, że represor genu *lac* związany z operatorem nie uniemożliwia całkowicie wiązania polimerazy lecz tylko zapobiega tworzeniu kompleksu inicjacyjnego (53). Enzym może wiązać się z nie zajętej przez represor sekwencją rozpoznania by po odłączeniu represora od operatora przekształcić się w „otwarty” kompleks promotorowy gotowy do inicjacji syntezy RNA.

Regulacja transkrypcji sprawowana przez CAP — białko wiążące cAMP nakłada się na kontrolę za pośrednictwem represorów. CAP skompleksowany z cAMP oddziałuje z regionem kontrolnym *lac* zwiększając zdolność polimerazy RNA do inicjacji transkrypcji (53, 136, 137).

Wpływ CAP na regulację transkrypcji może odbywać się poprzez wpływ na DNA. Białko to oddziałuje z regionem 30—50 par zasad poprzedzającym miejsce inicjacji transkrypcji (20, 138). Proponowany udział CAP w destabilizacji spirali DNA, stymulacji jego rozwijania lub innej jego zmiany strukturalnej prowadzącej do ułatwienia wiązania polimerazy w miejscu oddalonym od miejsca działania CAP o kilkadziesiąt nukleotydów.

Rozważa się także możliwość roli CAP jako czynnika oddziałującego z polimerazą RNA będącą w kompleksie z matrycą w ten sposób, że utrwala on ten kompleks, ułatwiając jego przekształcenie w kompleks inicjacyjny (62, 136).

Wpływ CAP na regulację transkrypcji zgodnie z pierwszym z podanych mechanizmów jest przykładem oddziaływania poprzez tełestabilność. Innym, omówionym już przykładem takiego oddziaływania (por. rozdz. II) jest wpływ sekwencji o zwiększonej zawartości par AT w regionie rozpoznania na trwałe wiązanie polimerazy RNA w miejscu oddalonym o około 20-nukleotydów (sekwencja Pribnowa).

Mimo zdobywania coraz większej ilości informacji na temat oddziaływania między polimerazą RNA i miejscami promotorowymi na DNA sekwencje wyznaczające specyficzność interakcji pozostają w dalszym ciągu nieznane. O specyficznym, charakterystycznym dla poszczególnych promotorów oddziaływaniu z nimi polimerazy decyduje odmienność sekwencji w tych regionach, sekwencji odczytywanych w zróżnicowany sposób przez enzym. Ich wynikająca z pełnionej funkcji niepowtarzalność utrudnia charakterystykę ich oddziaływania z polimerazą RNA.

Istnieją także dane o odmiennej konformacji polimerazy RNA w kompleksach z różnymi promotorami, wpływającej na różną, nie skorelowaną z „siłą” promotorów, stabilność tych kompleksów (44, 115, 116, 123) i ich oporność na inhibitory: heparynę (124, 130) i rifampicynę (123).

Zaakceptowano do druku 10.12.1979

Składam serdeczne podziękowania Panu Doc. Dr hab. Markowi Gniazdowskiemu za cenne uwagi w trakcie przygotowywania artykułu.

Praca została wykonana w ramach problemu węzłowego 09.7.1

PIŚMIENNICTWO

1. Mazuś B., (1979), *Post. Biochem.*, 25, 501—531.
2. Jacob F., Monod J., (1961), *J. Mol. Biol.*, 3, 318—356.
3. Szybalski M., Bøvre K., Hayes S., Hradecna Z., Kumar S., Lozeron H. Z., Nijkamp H. J. J., Stevens W. F., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 35, 341—353.
4. Schaller H., Gray C., Herrmann K., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 737—741.
5. Pribnow D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 784—788.
6. Pribnow D., (1975), *J. Mol. Biol.*, 99, 419—443.
7. Walz A., Pirrotta V., (1975), *Nature*, 254, 118—121.
8. Heyden B., Nüsslein C., Schaller H., (1972), *Nature New Biol.*, 240, 9—12.
9. Le Talaer J. Y., Jeanteur P., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 2911—2915
10. Niyogi S. K., Underwood B. H., (1975), *J. Mol. Biol.*, 94, 527—535.
11. Brown K. D., Bennett G. N., Lee F., Schweingruber M. E., Yanofsky C., (1978), *J. Mol. Biol.*, 121, 153—177.
12. Sugimoto K., Okamoto T., Sugisaki H., Takanami M., (1975), *Nature*, 253, 410—414.

13. Maniatis T., Ptashne M., Backman K., Kleid D., Flashman F., Jeffrey A., Maurer R., (1975), *Cell*, **5**, 109—113.
14. Heyden B., Nüsslein C., Schaller H., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **55**, 147—155.
15. Blattner F. R., Fiandt M., Hass K. K., Twose A., Szybalski W., (1974), *Virology*, **62**, 458—471.
16. Allet B., Roberts R. J., Gesteland R., Solem R., (1974), *Nature*, **249**, 217—221.
17. Maurer R., Maniatis T., Ptashne M., (1974), *Nature*, **249**, 221—223.
18. Ptashne M., Backman K., Humayun M. Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. T., (1976), *Science*, **194**, 156—161.
19. Maniatis T., Ptashne M., Barrell B. G., Donelson J. H. (1974), *Nature*, **250**, 394—397.
20. Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., Reznikoff W., (1975), *Science*, **187**, 27—35.
21. Bennett G. N., Schweigruber M. E., Brown K. D., Squires C., Yanofsky C., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2351—2355.
22. Bennett G. N., Yanofsky C., (1978), *J. Mol. Biol.*, **121**, 179—192.
23. Meyer B. J., Kleid D. G., Ptashne M., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4785—4789.
24. Sugimoto K., Sugisaki H., Okamoto T., Takanami M., (1975), *Nucleic Acids Res.*, **2**, 2091—2100.
25. Maniatis T., Jeffrey A., Kleid D., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1184—1188.
26. Pirrotta V., (1975), *Nature*, **254**, 114—117.
27. Sekiya T., Khorana H. G., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2978—2982.
28. Pirrotta V., (1976) w *Current Topics in Microbiology and Immunology*, t. 74, str. 21—54, Springer Verlag, Berlin.
29. Bennett G. N., Schweingruber M. E., Brown K. D., Squires G., Yanofsky C., (1978), *J. Mol. Biol.*, **121**, 113—137.
30. Otsuka A., Abelson J., (1978), *Nature*, **276**, 689—694.
31. Calos M. P., (1978), *Nature*, **274**, 762—765.
32. Le Talaer J. Y., Jeanteur Ph., (1971), *FEBS Letters*, **12**, 253—256.
33. Shishido K., Ikeda Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1420—1428.
34. Botchan R., (1976), *J. Mol. Biol.*, **105**, 161—176.
35. Dasgupta S., Allison D. P., Snyder C. E., Mitra S., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5916—5923.
36. Jones B. B., Chan H., Rothstein S., Wells R. D., Reznikoff W., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4914—4918.
37. Koller T., Kübler O., Portmann R., Sogo J. M., (1978), *J. Mol. Biol.*, **120**, 121—132.
38. Gómez B., Lang D., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 239—251.
39. Burd J., Wartell R., Dogson J. B., Wells R. D., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 5109—5113.
40. Musso R. E., Di Lauro R., Adhya S., de Crombrughe B., (1977), *Cell*, **12**, 847—854.
41. Hopkins J., (1974), *J. Mol. Biol.*, **87**, 715—724.
42. Kleid D., Humayun Z., Jeffrey A., Ptashne M., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 293—297.
43. Takanami M., Sugimoto K., Sugisaki H., Okamoto T., (1976), *Nature*, **260**, 297—302.

44. Seeburg P. H., Nüsslein C., Schaller H., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **74**, 107—113.
45. Scherer G., Hobom G., Kossel H., (1977), *Nature*, **265**, 117—121.
46. Walz A., Pirootta V., Imeichen K., (1976), *Nature*, **265**, 687—695.
47. 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.
48. Dhar R., Weissman S. M., Zain B. S., Pon J., (1974), *Nucleic Acids Res.*, **1**, 595—604.
49. Dickson R. C., Abelson J., Johnson P., Reznikoff W. S., Barnes W. M., (1977), *J. Mol. Biol.*, **111**, 65—75.
50. Sklar J., Weissman S., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3538—3547.
51. Musso R., Di Lauro R., Rosenberg M., de Crombrugge B., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 106—110.
52. Smith B., Schleif R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6931—6933.
53. Schmitz A., Galas D. J., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 111—137.
54. Chamberlin M. J., (1974), *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 721—775.
55. Dausse J. P., Sentenac A., Fromageot P., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **57**, 569—578.
56. Melinkova A., Beabealashvilli R., Mirzabekov A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 301—309.
57. Vollenweider H. J., Szybalski W., (1978), *J. Mol. Biol.*, **123**, 485—498.
58. Pribnow D., (1973), *J. Mol. Biol.*, **99**, 419—443.
59. Küpper H., Contreras R., Landy A., Khorana H. G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4754—4758.
60. de Crombrugge B., Chen B., Gottesman M., Varmus H., Emmer M., Perlman R., (1971), *Nature New Biol.*, **230**, 37—41.
61. Arditti R. R., Scaife J., Beckwith J., (1968), *J. Mol. Biol.*, **38**, 421—426.
62. Gilbert W., (1976) w RNA Polymerase red. Losick R., Chamberlin M. J., str. 193—205, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
63. Johnsrud L., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5314—5318.
64. Pilz J., Kratky O., Rabussay D., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **28**, 205—220.
65. Wang J. C., Jacobsen J. H., Saucier J. M., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1225—1241.
66. Szybalski W., (1977) w Regulatory Biology, red. Copeland J. C., Marzluff G. A., str. 3—45; Ohio State University Press, Columbus, Ohio.
67. Hillel Z., Wu C.-W., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2954—2961.
68. Burgess R. R., Travers A. A., (1971), w Methods in Enzymology, wyd. Grossman L., Moldave K., t. 21D, str. 500—506, Academic Press, New York.
69. Burgess R. R., Travers A. A., Dunn J. J., Bautz E. K. f., (1969), *Nature*, **221**, 43—46.
70. Travers A. A., Burgess R. R., (1969), *Nature*, **222**, 537—540.
71. Berg D., Barrett K., Chamberlin M., (1971) w Methods in Enzymology, wyd. Grossman L., Moldave K., t. 21, str. 506—519, Academic Press, New York.
72. Darlix J. L., Sentenac A., Ruet A., Fromageot P., (1969), *Eur. J. Biochem.*, **11**, 43—48.
73. Krakow J. S., von der Helm K., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 73—83.
74. Wu C.-W., Yarbrough L. R., Hillel Z., Wu F. Y.-H., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3019—3023.
75. Hinkle D., Chamberlin M. J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 157—185.

76. Mueller K. M., (1971), *Mol. Gen. Genet.*, **111**, 273—296.
77. Zillig W., Zechel K., Rabussay D. Schachner M., Sethi V. S., Palm P., Heil A., Seifert W., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 47—58.
78. Hinkle D., Ring J., Chamberlin M. J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 197—207.
79. Goff C. G., Minkley E. G., (1970) w *RNA Polymerase and Transcription*, red. Silvestri L., str. 124—147, North Holland Publ. Comp., Amsterdam.
80. Bautz E. K. F., Dunn J. J., Bautz F. A., Schmidt D. A., Mazaitis A. J., (1970) w *RNA Polymerase and Transcription*, red. Silvestri L., str. 90—109, North Holland Publ. Comp., Amsterdam.
81. Davis R. W., Hyman R. W., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 269—281.
82. Bordier C., Dubochet J., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **44**, 617—624.
83. Bordier C., Rossetti G. P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **65**, 147—153.
84. Hinkle D., Chamberlin M. J., (1970), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **35**, 65—72.
85. Florentiev V. L., Ivanov V. I., (1970), *Nature*, **228**, 519—522.
86. Saucier J. M., Wang J. C., (1972), *Nature New Biol.*, **239**, 167—170.
87. Wu F. Y.-H., Yarbrough L. R., Wu C.-W., (1976), *Biochemistry*, **15**, 3254—3258.
88. Smith K. C., (1976), w *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, red. Wang S. Y., tom II, str. 187—215, Academic Press, New York.
89. Lin S. Y., Riggs A. D., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 947—951.
90. Ogata R., Gilbert W., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4973—4976.
91. Martinson H. G., Shetlar M. D., Mc Carthy B. J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 2002—2007.
92. Gilbert W., Majors J., Maxam A., (1976) w *Organization and Expression of Chromosomes*, str. 167—176, Dahlem Konferenzen.
93. Okada M., Vergne J., Brahms J., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1845—1862.
94. Nixon J., Spoor T., Evans J., Kimball A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4570—4573.
95. Frischauf A. M., Scheit K. H., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1227—1233.
96. Wu F. Y.-H., Wu C.-W., (1974), *Biochemistry*, **13**, 2562—2566.
97. Sethi V. S., Zillig W., (1970), *FEBS Letters*, **6**, 339—342.
98. Yarbrough L. R., Hurwitz J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5400—5404.
99. Panny S. R., Heil A., Mazuś B., Palm P., Zillig W., Mindlin S. Z., Ilyina T. S., Khesin R. B., (1974), *FEBS Letters*, **48**, 241—245.
100. Gross G., Fields D. A., Bautz E. K. F., (1976), *Mol. Gen Genet.*, **147**, 337—341.
101. Lill H. R., Hartmann G. R., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **54**, 45—53.
102. Chamberlin M. J., (1976) w *RNA Polymerase*, red. Losick R., Chamberlin M. J., str. 159—192, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
103. Pettijohn D., Kamiya T., (1967), *J. Mol. Biol.*, **29**, 275—295.
104. Hinkle D., Chamberlin M. J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 187—196.
105. Mc Ghee J., von Hippel P., (1974), *J. Mol. Biol.*, **86**, 469—489.
106. Giacomoni P. U., Delain E., Le Pecq J. B., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 215—220.
107. Von Hippel P. H., Revzin A., Gross C. A., Wang A. C., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4808—4812.
108. Riggs A. D., Bourgeois S., Cohn M., (1970), *J. Mol. Biol.*, **53**, 401—417.

109. Williams R. C., Chamberlin M. J., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3740—3744.
110. Mangel W. F., Chamberlin M. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 2995—3001.
111. Mangel W. F., Chamberlin M. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3002—3006.
112. Mangel W. F., Chamberlin M. J., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3007—3013.
113. Dausse J. P., Sentenac A., Fromageot P., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **65**, 387—393.
114. Seeburg P., Schaller H., (1975), *J. Mol. Biol.*, **92**, 261—277.
115. von Gabain A., Bujard H., (1977), *Mol. Gen. Genet.*, **157**, 301—311.
116. von Gabain A., Bujard H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 189—193.
117. Koller Th., Sogo J., Bujard H., (1974), *Biopolymers*, **13**, 995—1009.
118. Portmann K., Sogo J. M., Koller Th., Zillig W., (1974), *FEBS Letters*, **45**, 64—67.
119. Hirsh J., Schleif R., (1976), *J. Mol. Biol.*, **108**, 471—490.
120. Giacomoni P. U., Delain E., Le Pecq J. B., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **78**, 205—213.
121. Hutchison C., Edgell M., (1973), *Nature New Biol.*, **243**, 233—236.
122. Pedone F., Ballario P., di Mauro E., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **87**, 445—454.
123. Stahl S. J., Chamberlin M. J., (1977), *J. Mol. Biol.*, **112**, 577—601.
124. Kiss I., Ślaska K., Sümegi J., Udvardy A., Venetianer P., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **518**, 257—266.
125. Ślaska K., Sain B., Udvardy A., Venetianer P., (1978), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **13**, 127—131.
126. Minkley E. G., Pribnow D., (1973), *J. Mol. Biol.*, **77**, 255—277.
127. Delius J., Westphal H., Axelrod N., (1973), *J. Mol. Biol.*, **74**, 677—687.
128. Ludwig R., Summers W. C., (1976), *Virology*, **71**, 278—290.
129. Hsieh T.-S., Wang J., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5776—5783.
130. Pfeffer S. R., Stahl S. J., Chamberlin M. J., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 5403—5407.
131. Dunn J. J., Studier F. W., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1559—1563.
132. Chamberlin M. J., Ring J., (1972), *J. Mol. Biol.*, **70**, 221—237.
133. Bourgeois S., Pfahl M., (1976), *Adv. Protein Chem.*, **30**, 1—99.
134. Maniatis T., (1975), *Cell*, **5**, 109—113.
135. Gilbert W., Maxam A., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3581—3584.
136. Majors J., (1975), *Nature*, **256**, 672—674.
137. Maquat L. E., Reznikoff W. S. (1978), *J. Mol. Biol.*, **125**, 467—490.
138. Reznikoff W. (1976) w RNA Polymerase, red. Losick R., Chamberlin M. J., str. 441—454, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

JADWIGA PULIKOWSKA *, TOMASZ TWARDOWSKI **

Poglądy na strukturę i funkcję czynnika elongacyjnego 1 (EF1) u *Eucaryota*

Views on Structure and Function of Elongation Factor 1 (EF1) from *Eucaryotes*

Spis treści:

- I. Wstęp
- II. Ogólny zarys procesu biosyntezy białka
- III. Prokariotyczne czynniki elongacyjne wiążące
- IV. Eukariotyczny czynnik elongacyjny 1
- IV-1. Różnorodność form molekularnych EF1
- IV-2. Ciężka i lekka forma czynnika EF1
- IV-3. Metody oczyszczania, kryteria czystości, ciężary cząsteczkowe i skład aminokwasowy czynników elongacyjnych wiążących
- IV-4. Pomiar aktywności czynnika EF1
- V. Mechanizmy reakcji wiązania
- V-1. Mechanizm I
- V-2. Mechanizm II
- V-3. Mechanizm III
- VI. Inne funkcje biologiczne czynników elongacyjnych wiążących
- VII. Transferaza peptydylowa oraz czynniki elongacyjne EF2 i EFG
- VIII. Zakończenie.

Contents:

I. Introduction

* Mgr, ** Dr, Zakład Stereochemii Produktów Naturalnych, Instytut Chemii Organicznej, PAN, ul. Noskowskiego 12, 61—704, Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: tRNA — transferowy (przenoszący) kwas rybonukleinowy; mRNA — matrycowy kwas rybonukleinowy; AA — aminokwas; AA-tRNA — aminoacylo-tRNA; Phe — fenyloalanina; Met — metionina; IF — czynniki (faktory) inicjatorowe; EF — czynniki (faktory) elongacyjne; RF — czynniki (faktory) terminujące; S — Svedberg, jednostka stałej sedimentacji; D — dalton, jednostka ciężaru cząsteczkowego; c.cz. — ciężar cząsteczkowy; GTP, GDP — trójfosforan, dwufosforan guanozyny; Pi — ortofosforan nieorganiczny; cGMP — cykliczny monofosforan guanozyny.

- II. Protein biosynthesis, general aspects
- III. Prokaryotic binding elongation factors
- IV. Eucaryotic elongation factor 1
 - IV-1. Different molecular forms of EF1
 - IV-2. Heavy and light form of elongation factor 1
 - IV-3. Purification methods, purity determination, molecular weight, and amino acid composition of binding elongation factors
 - IV-4. Measuring of EF1 activity
- V. Mechanism of binding reaction
 - V-1. Mechanism I
 - V-2. Mechanism II
 - V-3. Mechanism III
- VI. Other biological functions of binding elongation factors
- VII. Peptidyl transferase and elongation factors EF2 and EFG
- VIII. Conclusions

I. Wstęp

Biosynteza białka jest niewątpliwie jednym z najbardziej skomplikowanych procesów przebiegających w układzie biologicznym. Syntezę pojedynczego wiązania peptydowego katalizuje około 10 białek enzymatycznych, a energia do tego procesu pochodzi z hydrolizy 4 wiązań wysokoenergetycznych.

Kompleksowość mechanizmu oraz różnorodność i znaczna labilność makromolekuł biorących w nim udział jest przyczyną, iż pomimo dużego nakładu sił i środków wiedza nasza dotycząca tego zagadnienia jest nadal niepełna. Należy jednakże odnotować istotny postęp w rozumieniu i interpretacji syntezy białka w ostatnich latach, do czego przyczyniło się przede wszystkim:

- 1) poznanie struktury rybosomów,
- 2) oznaczenie sekwencji całego szeregu kwasów nukleinowych,
- 3) wydzielenie w stanie homogenym i zidentyfikowanie funkcji biologicznej wielu białek enzymatycznych uczestniczących w procesie transkrypcji i translacji.

Tematem niniejszego artykułu są poglądy na przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomu ze szczególnym uwzględnieniem własności strukturalnych i funkcjonalnych czynników (faktorów) elongacyjnych wiążących.

II. Ogólny zarys procesu biosyntezy białka

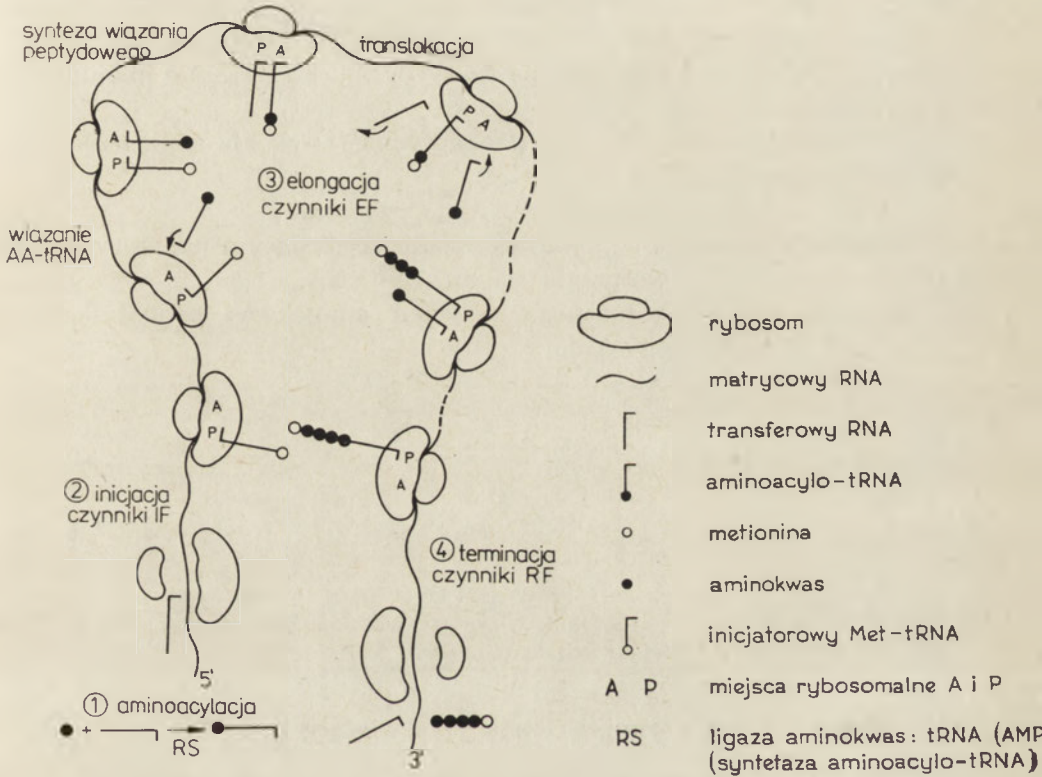
W procesie biosyntezy białka możemy wyróżnić cztery zasadnicze etapy, przedstawione schematycznie na rycinie 1:

- 1) aminoacylację transferowego RNA, czyli syntezę właściwego substratu: AA-tRNA;

2) inicjację biosyntezy białka, co następuje poprzez skompleksowanie podjednostek rybosomalnych z matrycowym RNA i inicjatorowym Met-tRNA;

3) wydłużanie (elongację) łańcucha polipeptydowego; zasadniczy proces tworzenia łańcucha aminokwasów łączonych wiązaniem peptydowym;

4) zakończenie (terminację) biosyntezy; zatrzymanie translacji na terminującym kodonie mRNA i uwolnienie zsyntetyzowanego polipeptydu z kompleksu polisomalnego.



Ryc. 1. Ogólny schemat procesu biosyntezy białka.

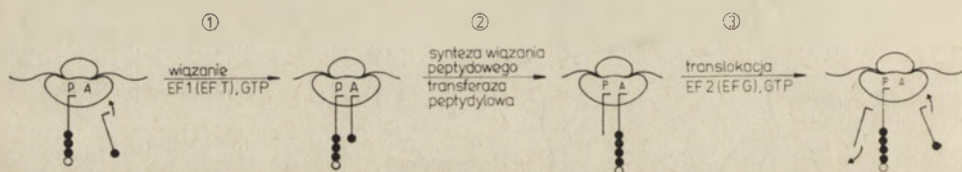
Całokształt biosyntezy białka został omówiony szczegółowo w kilku pracach przeglądowych (1—5). Pewne zagadnienia poruszano w ostatnich latach również w artykułach przeglądowych drukowanych w *Postęпах Biochemii* (6—8).

Ogólny schemat procesu translacji, przedstawiony na ryc. 1, dotyczy zarówno organizmów pro- jak i eukariotycznych. Wzajemna zamiana makrocząsteczek pochodzących z tych dwóch grup organizmów jest niemożliwa. Oznacza to, np., że nie można wymieniać podjednostek rybosomalnych, czyli tworzyć hybrydu 30S—60S funkcjonalnego biologicznie

(9). Również wymiana białek enzymatycznych nie wydaje się możliwa (10—13), choć jedno doniesienie dopuszcza taką możliwość (14). W pełni wymienne są natomiast elementy pochodzące z różnych organizmów należących do tej samej grupy (15—17). Jednakże w przyrodzie nie można wyznaczać ścisłych granic, bo chociaż translacja hemoglobinowego mRNA z retikulocytów królika nie zachodzi w układzie bakteryjnym (18), to bakteriofagowy mRNA może służyć jako matryca w układzie z komórek nowotworowych Krebsa, czy też retikulocytów królika (19, 20). Szczególnie interesująca sytuacja ma miejsce wśród inicjatorowych tRNA: egzogenicznie uformowany Met-tRNA eukariotyczny działa jako inicjator biosyntezy białka w układzie bakterii *Escherichia coli*; natomiast fMet-tRNA^{Met} bakteryjny przyłącza się do rybosomu 80S, ale nie inicjuje procesu biosyntezy białka (21, 22).

Proces wydłużania łańcucha polipeptydowego składa się z trzech etapów przedstawionych na rycinie 2:

- 1) przyłączanie aminoacylo-tRNA do rybosomu,
- 2) synteza wiązania peptydowego pomiędzy będącym już na rybosomie peptydylo-tRNA a nowo przyłączonym AA-tRNA,
- 3) transllokacja wydłużonego o jeden aminokwas peptydylo-tRNA z miejsca rybosomalnego A do P.



Ryc. 2. Ogólny schemat procesu wydłużania łańcucha polipeptydowego
 1. wiązanie AA-tRNA do rybosomu, 2. synteza wiązania peptydowego, 3. transllokacja peptydylo-tRNA z miejsca rybosomalnego A do P.

III. Prokariotyczne czynniki elongacyjne wiążące

Pierwsze doniesienia na temat dwóch czynników enzymatycznych katalizujących wydłużanie łańcucha polipeptydowego dotyczy wprowadzie *Eucaryota* (23), jednakże to układ prokariotyczny był głównie przedmiotem badań. Z tego też względu najpierw przedstawimy pokrótce mechanizm działania i własności czynników bakteryjnych.

Obecność dwóch prokariotycznych czynników elongacyjnych po raz pierwszy stwierdzono w *Escherichia coli* w pracowni Lipmanna (24). W roku 1966 rozdzielono oba faktory i wówczas też otrzymały one nazwy* obowiązujące do dziś: EFT — czynnik wiążący AA-tRNA do rybosomu,

* W artykule niniejszym stosowane są zasady nomenklaturowe czynników elongacyjnych zgodnie z propozycją zawartą w (25), poza wypadkami oddzielnie oznaczonymi.

oraz czynnik EFG wykazujący własności GTP-azowe w obecności rybosomów (26). W tymże samym roku i w tym samym laboratorium powiodło się rozdzielenie czynnika EFT na dwie podjednostki o odmiennych własnościach i funkcjach (27). Podjednostki fatora EFT określono terminami EFTu (z j. ang. *unstable* — nietrwały) i EFTs (z j. ang. *stable* — trwały). Badania nad oczyszczaniem i charakterystyką czynników bakteryjnych w laboratorium F. Lipmanna były początkowo prowadzone na bakteriach *E. coli* (24, 26), a następnie *Pseudomonas fluorescence* (27). W chwili obecnej czynniki elongacyjne są dobrze poznane i opisane dla szeregu bakterii: *E. coli* (5, 17, 28—30), umiarkowanie termofilnych *Bacillus stearothermophilus* (31—33), jak i *Thermus thermophilus* rozwijających się w temperaturze 85°C. Te ostatnie zostały szczegółowo scharakteryzowane w cyklu artykułów pochodzących z pracowni Y. Kaziro (34—36).

Podobnie jak u *Procaryota* proces biosyntezy białka przebiega w organelach komórkowych: chloroplastach i mitochondriach. Organelowe czynniki elongacyjne są znacznie gorzej poznane niż bakteryjne, wykazano jednakże w sposób jednoznaczny, iż ich charakterystyka jest bardzo zbliżona (37—40).

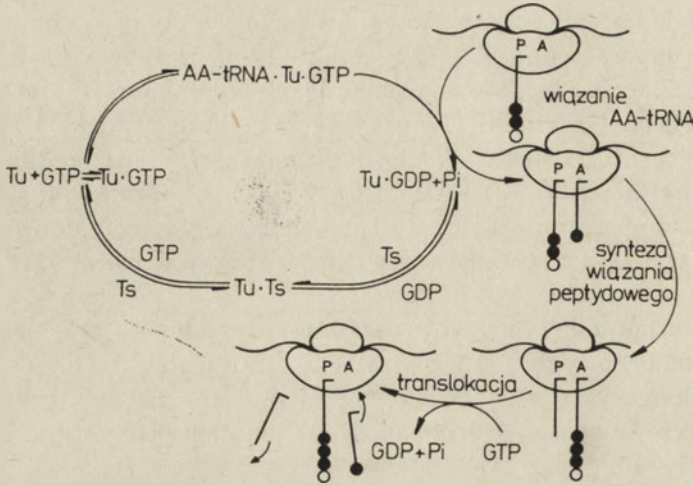
Jak już powiedziano uprzednio, funkcją czynnika EFT będącego kompleksem EF(Tu-Ts), jest katalizowanie wiązania AA-tRNA do rybosomu. Czynnik EFTu tworzy najpierw z GTP kompleks dwuskładnikowy EFT-GTP, który następnie reaguje z aminoacylo-tRNA celem utworzenia kompleksu trójskładnikowego AA-tRNA-EFTu-GTP (41, 42). W efekcie oddziaływania kompleksu trójskładnikowego z polisomem następuje przyłączenie AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A (aminokwasowego). Hydroliza GTP umożliwi uwalnianie kompleksu EFTu-GDP z polisomu (15, 43). Wymianę GDP na GTP w tym kompleksie katalizuje EFTs, przy czym przejściowo tworzy się kompleks Tu-Ts, który może być wykrywany np. metodą sączenia żelowego (44) czy też wirowania w gardiencie gęstości sacharozy (45). Kompleks Tu-Ts wykazując wysokie powinowactwo do GTP umożliwi odtworzenie kompleksu dwuskładnikowego EFTu-GTP, a w efekcie przyłączenie kolejnego AA-tRNA do rybosomu (41—43).

W procesie translacji szczególną rolę pełnią nukleotydy guaninowe, na co zwrócono uwagę już w połowie lat pięćdziesiątych (51). W przypadku czynników prokariotycznych pewne obserwacje jednoznacznie sugerują ich funkcje regulatorowe. Faktor EFTu wykazuje najwyższe powinowactwo do GDP ($K_d = 3 \times 10^{-6}$ M), podczas gdy w stosunku do GTP ok. stukrotnie niższe (52, 53). Ponieważ aktywność EFTu w elongacji wymaga powstania kompleksu z trójfosforanem guanozyny (41, 42) wysunięto tezę, że właśnie GTP umożliwia faktorowi przyjęcie konformacji odpowiedzialnej za:

1) rozpoznanie aminoacylo-tRNA celem utworzenia kompleksu trójskładnikowego,

- 2) przyłączenie tego kompleksu do rybosomalnego miejsca A,
- 3) uwolnienie EFTu z rybosomu na skutek hydrolizy GTP (54).

Tezę o różnicach w konformacji kompleksów EFTu-GDP i EFTu-GTP potwierdzają doświadczenia ze znacznikami spinowymi (55) oraz hydro-



Ryc. 3. Mechanizm reakcji wydłużania łańcucha polipeptydowego u *Prokaryota*.

fobowymi (56, 57), a także badanie wymiany trytu (58). Eksperymenty te pośrednio dowodzą funkcji regulatorowej GTP i GDP. Rolę nukleotydów guaninowych w procesie translacji podsumował Kaziro (5, 54). Sugeruje on, że reakcjami wymagającymi udziału GTP, a przebiegającymi na różnych etapach translacji rządzi ten sam mechanizm. Tak więc odwracalne zmiany konformacji i aktywności poszczególnych białek enzymatycznych (IF2, EFTu, EFG oraz RF) zależą od obecności określonego fosforanu nukleotydu. Ta sama teoria znajduje zastosowanie dla układu eukariotycznego. Autor tłumaczy nawet katalizowany przez EFTu proces przyłączania AA-tRNA do rybosomu ideą aktywnego transportu. Jednakże, wobec badań reakcji, której stanu pośredniego nie można, w chwili obecnej, zanalizować, (a tak wygląda sytuacja w przypadku GTP) takie wnioski wydają się zbyt daleko posunięte. W szczególności wadą powyższych spekulacji jest nie uwzględnienie występujących *in vivo* stężeń analizowanych związków: nukleotydów oraz białek.

Rycina 3 przedstawia ogólnie przyjęty schemat przyłączania aminoacylo-tRNA do rybosomu w układzie prokariotycznym.

IV. Eukariotyczny czynnik elongacyjny 1

Mimo wspólnego dla wszystkich organizmów ogólnego schematu reakcji (Ryc. 2), panują bardzo rozbieżne opinie na temat szczegółów tego mechanizmu w przypadku Eucaryota. Przyczynia się do tego labilność

aktywności biologicznej eukariotycznych czynników wiążących, trudności z otrzymaniem homogenego preparatu, jak również różnorodność form molekularnych (heterogenność) tego czynnika.

Eukariotyczny czynnik elongacyjny EFl badano dotychczas szczególnie intensywnie w następującym materiale: zarodki pszenicy (59—70), komórki nowotworowe Krebsa (71—75), skorupiak *Artemia salina* (76—83), wątroba szczura (84—90), wątroba świni (91—96), mózg cielaka (97—102), retikulocyty królika (103—110), jedwabnik (111—114), ryby (115—116). Już od 1965 roku w pracach nad czynnikami elongacyjnymi uczestniczyło wielu polskich naukowców (59, 64, 69, 70, 81, 84, 86, 87, 101, 102, 107—110, 118, 128, 161).

Tabela 1

Struktura podjednostkowa i ciężary cząsteczkowe czynników elongacyjnych wiążących.

Materiał	Struktura	Nomenklatura autorów	Ciężar cząstkowy	
			polimer	monomer
Zarodki pszenicy (44)	$(\alpha)_3, (\alpha)_4$	EF1H, EF1L	180 000 250 000	62 000
Zarodki pszenicy (46—48)	$(\alpha\beta\gamma)_n$	EF1H EF1 A, B, C	240 000— —540 000	A — 52 000 B — 47 000 C — 27 000
Mózg cielaka (85)	$(\alpha)_n$	EF1H EF1L	250 000— —1 000 000	50 000— —60 000
Retikulocyty królika (89, 92, 93)	$(\alpha)_n$	EF1H EF1L	450 000	50 000
Wątroba świni (78, 79)	$\alpha\beta\gamma$ $\beta\gamma$	EF1 α EF1 β EF1 γ EF1 $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ — 90 000	α — 53 000 β — 55 000 γ — 30 000
Komórki nowotworowe Krebsa (56, 57)	$(\alpha)_n$	EF1H EF1L	260 000 230 000 135 000	47 000
Komórki nowotworowe Krebsa (60)	$(\alpha\beta)_n$	eEFTH(EF1H) eEFTu(EF1 α) eEFTs(EF1 β)	β_2 — 52 000	α — 47 000 β — 26 000
<i>Artemia salina</i> (61, 65)	$(\alpha\beta)_n$	EF1H EF1L	200 000	— 52 000 — 47 000
<i>Artemia salina</i> (62, 63)	$(\alpha\beta\gamma)_n$	EF1H EF1 A, B, C	240 000	A — 53 000 B — 51 000 C — 26 000
Jedwabnik (97, 98)	$(\alpha\beta\gamma)_n$	EF1H, EF1M EF1a, b, c	H > 300 000 M \approx 150 000	a — 51 000 b — 26 000 c — 46 000
<i>Thermus thermophilus</i>	T = (TuTs) ₂	T, Tu, Ts	T — 220 000 (Ts) ₂ — 64000	Tu — 51 000 Ts — 27 000
<i>Escherichia coli</i> (127)	T = (TuTs)	T, Tu, Ts	67 000	Tu — 42 000 Ts — 28 000

IV-1. Różnorodność form molekularnych czynnika EF1

Po raz pierwszy występowanie EF1 w formach wielokrotnych zaobserwowali w roku 1968 Schneir i Moldave w materiale z wątroby (85). Obserwację tę potwierdzono dla wszystkich badanych EF1 i to niezależnie od materiału wyjściowego. Ciężary cząsteczkowe izolowanych czynników elongacyjnych i wahają się w bardzo szerokim przedziale, tj. od ok. 50 000 D do ponad 1 miliona D.

W Tabeli 1 zawarto informacje dotyczące czynnika EF1 wyizolowanego z różnorodnego materiału eukariotycznego. Celem porównania przedstawiono również analogiczne dane dotyczące wybranych, reprezentatywnych czynników prokariotycznych: EFT, Tu, Ts. Podane masy cząsteczkowe były oznaczane metodą elektroforezy na żelu poliakryloamidowym, techniką sączenia żelowego czy też ultrawierowania.

Czynnik eukariotyczny EF1 występuje w formie lekkiej oraz ciężkiej. Forma ciężka (oznaczana zwykle terminem EF1H) może być homopolimerem lub też heteropolimerem. W przypadku homopolimeru mamy do czynienia ze strukturą molekularną faktora typu $(\alpha)_n$, a podstawową jednostkę (EF1L — monomer) stanowi polipeptyd o ciężarze cząsteczkowym rzędu 50 000 D. Gdy jednak faktor występuje jako heteropolimer należy mu przypisać strukturę $(\alpha\beta)_n$ lub też $(\sigma\beta\gamma)_n$ (patrz Tabela 1). Problem aktywności biologicznej oraz mechanizm działania czynnika EF1 zostanie przeanalizowany w rozdziale V. Jednakże najpierw należy rozpaźrzeć rolę form ciężkiej i lekkiej.

IV-2. Ciężka i lekka forma czynnika EF1

Wykazano, iż aktywną biologicznie formą czynnika elongacyjnego I jest monomer (66, 80, 98, 99, 101). Pierwszym zatem etapem w cyklu interakcji czynnika jest przekształcenie formy ciężkiej do lekkiej. Etap ten wydaje się szczególnie istotny również dlatego, iż może on determinować poziom aktywności czynnika EF1, a więc szybkość biosyntezy w ogóle.

W pracach prowadzonych nad deagregacją faktora (czyli przekształceniem formy ciężkiej do lekkiej) wykryto dwie grupy czynników powodujących tę przemianę, które niewątpliwie działają wg zasadniczo odmiennego mechanizmu:

- 1) fosforany guanozyny; trójfosforan (66, 80, 101), dwufosforan (80, 101) oraz fosforan cykliczny (80, 117);
- 2) enzymy proteolityczne (106—109).

Forma ciężka czynnika elongacyjnego reagując z GTP (lub też z nieco mniejszą wydajnością z GDP) tworzy kompleks dwuskładnikowy EF1-GTP (lub EF1-GDP). W obu tych kompleksach faktor występuje w formie lekkiej — EF1L, monomerycznej, o ciężarze cząsteczkowym ok. 50 000 D (62, 98). Należy zaznaczyć, że czynnik eukariotyczny, w przeciwieństwie do

bakteryjnego, wykazuje wyższe powinowactwo do trójfosforanu niż dwufosforanu guanozyny. Również fosforan cykliczny, który w warunkach *in vitro* nie jest konieczny w procesie elongacji, także przekształca formę ciężką do lekkiej (80, 117). Trzeba jednak odnotować również doniesienie na temat braku wpływu cGMP na konwersję EF1H do EF1L (76).

Drugą grupę czynników powodujących deagregację formy ciężkiej do lekkiej stanowią enzymy proteolityczne. Spośród szeregu przebadanych proteaz (dane niepublikowane autorów) najwyraźniejszą przemianę na drodze limitowanej proteolizy bez utraty aktywności biologicznej obserwowano pod wpływem:

1) elastazy (80, 106, 107); proteazy wykazującej specyficzność w stosunku do aminokwasu seryny;

2) karboksypeptydazy A (109); enzymu proteolitycznego odcinającego kolejne aminokwasy od końca karboksylowego łańcucha polipeptydowego;

3) enzymu(ów) proteolitycznego(ych) zawartego w ekstrakcie białkowym z *Artemia salina* (110).

Wcześniej doniesienia opisywały również aktywność przekształcającą fosfolipazy C (80, 102). Fakt ten sugerował istotne znaczenie fosfolipidów, których obecność wykryto w niektórych preparatach wysoce oczyszczonych czynników EF1 zwierzęcych (99, 102, 118). W wyniku szczegółowej analizy stwierdzono, że handlowa fosfolipaza C powoduje przekształcenie formy ciężkiej czynnika EF1 nie zawierającego nawet śladowych ilości fosfolipidów; natomiast homogenny preparat fosfolipazy C nie powodował oczekiwanej konwersji (106). Ostatecznie wykazano, iż handlowa fosfolipaza C bywa zanieczyszczona karboksypeptydazą A (109).

Obserwacja, że enzymy proteolityczne odpowiedzialne są za przekształcenie formy ciężkiej do lekkiej, prowadzi do tezy o funkcji regulatorowej proteaz w stosunku do czynników elongacyjnych. Hipoteza ta rodzi jednak pewne wątpliwości. Nasuwają się pytania:

1) w jaki sposób może powstawać powtórnie forma ciężka z nisko-cząsteczkowych form czynnika?, oraz

2) czy otrzymane w wyniku proteolizy mniejsze fragmenty zachowują pełną aktywność biologiczną?

Oczywiście funkcja regulatora proteaz może być limitowana tylko do przekształcenia formy ciężkiej do lekkiej. Odwracalność procesu, czyli odtworzenie formy ciężkiej (H) po zakończeniu reakcji wiązania, nie wydaje się konieczna; aczkolwiek nie wiadomo, jakie są dalsze losy molekuly EF1L po zakończeniu translacji. Może np. występuje niekowalentne łączenie się łańcuchów polipeptydowych połączone z zachowaniem pełnej aktywności biologicznej (katalitycznej). Zjawisko takie opisano w przypadku rybonukleazy S oraz innych nukleaz (119). Podobna obserwacja dotyczy również czynnika elongacyjnego EF1 z retikulocytów królika (107). Stwierdzono mianowicie, iż w wyniku dodania do mieszaniny poreakcyj-

nej po trawieniu elastazą inhibitora proteaz serynowych — fluorku benzylosulfonylu (z j. ang. *phenylmethylsulfonylfluoride* — PMSF) nie obserwuje się na żelu poliakrylamidowym dwóch lżejszych prążków (produktów proteolizy), a ponownie jeden — w pozycji w przybliżeniu równej położeniu faktora EF1H. Ostatnio, na materiale z jedwabnika (99), a także z wątroby świńskiej (120) zaobserwowano odtwarzanie aktywnego biologicznie kompleksu ciężkiego z form lekkich. Istnieją jednak wątpliwości, wysuwane przez autorów, czy taka przemiana jest w pełni fizjologiczna.

Z kolei badania nad wpływem karboksypeptydazy A i enzymatycznego ekstraktu z *A. salina* (108, 109) sugerują, że istotną rolę w formowaniu struktury wysokocząsteczkowej czynnika EF1 u *Eucaryota* odgrywa krótki polipeptyd znajdujący się prawdopodobnie przy C — końcu łańcucha aminokwasowego EF1. Ten niskocząsteczkowy fragment mógłby być odpowiedzialny za agregację.

Aktywność biologiczną produktów proteolizy można próbować wytłumaczyć przyjmując, że w łańcuchu polipeptydowym EF1 występują dwa odrębne centra aktywne: pierwsze — wiązania AA-tRNA i rybosomów oraz drugie — tworzenia kompleksów dwuskładnikowych z nukleotydami guaninowymi. Hipotezę taką opierając się na analogii z czynnikami prokariotycznymi wysunęli Kaziro i współpracownicy (121, 122). Autorzy ci stwierdzili, że fragment o c.c.z. 39 000 D otrzymany w wyniku trawienia trypsyną faktora EFTu (c.c.z. 47 000 D) traci wprawdzie aktywność w reakcji wiązania, ale jest nadal aktywny w tworzeniu kompleksu dwuskładnikowego i trójskładnikowego. Powyższe rozważania podważają wyniki Rosenbuscha i Jacobsona, którzy w wyniku łagodnej hydrolizy trypsyną otrzymali polipeptyd o c.c.z. 37 000 D zachowujący całą aktywność biologiczną charakterystyczną dla czynnika wiążącego (123). Ci sami autorzy donoszą również o stwierdzeniu występowania u *E. coli* proteaz podobnych w charakterze do trypsyny, co pośrednio potwierdza potencjalną rolę enzymów proteolitycznych w regulacji aktywności biologicznej.

Badania prowadzone na skorupiaku *Artemia salina* sugerują funkcję regulatorową enzymu proteolitycznego (lub enzymów) obecnego w ekstrakcie białkowym z tego organizmu. Czynniki proteolityczne przekształcające EF1H do EF1L wykryto tylko w ekstrakcie otrzymywanym po 40 godz. rozwoju skorupiaka, co odpowiada pływającym larwom — nauplii (108). Nie obserwowano takiej aktywności w przypadku izolacji ekstraktu z wcześniejszego etapu rozwoju. Obserwacja ta jest ściśle zbieżna z doniesieniami, że w cystach występuje czynnik EF1 wyłącznie w formie ciężkiej, natomiast u pływających nauplii tylko w formie lekkiej (76). A zatem stwierdzona została korelacja występowania aktywności proteolitycznej przekształcającej i formy lekkiej czynnika EF1. Zmianę formy molekularnej z ciężkiej na lekką jako funkcję rozwoju obserwowali również Bolla i Brot u nicieni *Turbatrix aceti* (124).

IV-3. Metody oczyszczania, kryteria czystości, oznaczanie ciężaru cząsteczkowego i skład aminokwasowy czynników elongacyjnych wiążących

Pierwszym etapem prac nad czynnikami elongacyjnymi jest ich otrzymanie w stanie homogenym. Schemat oczyszczania tych białek zależy głównie od rodzaju używanego materiału wyjściowego. Stosowano typowe i wspólne dla większości publikowanych procedur metody, a mianowicie: ultrawierowanie wyekstrahowanego materiału celem oddzielenia rybosomów, precypitacja siarczanem amonu, sączenie molekularne, chromatografia jonowymienna (59, 61, 77, 94, 96, 112). Wszystkie etapy oczyszczania przeprowadzano w temperaturze 0—4°C, używając buforów zawierających zwykle 10—25% glicerolu oraz β -merkaptoetanol względnie dwutiotreitol w stężeniu 1—5 mM celem stabilizacji aktywności biologicznej preparatu.

Preparaty przechowywano zazwyczaj w temperaturze -25°C lub też w ciekłym azocie, w buforze zawierającym co najmniej 25% glicerolu, przy stężeniu białka powyżej 1 mg/ml. Jako podstawowe kryterium czystości stosowano elektroforezę na żelu poliakryloamidowym. Analiza w warunkach denaturujących i niedenaturujących umożliwia jednocześnie ocenę ciężaru cząsteczkowego oraz pozwala podać charakterystykę struktury podjednostkowej białka. Otrzymanie jednego prążka elektroforetycznego w obecności czynnika denaturującego (np. mocznika lub soli sodowej siarczanu dodecyłu) sugeruje strukturę homopolimeryczną, typu $(\alpha)_n$, natomiast kilka prążków, np. trzy, pozwala uznać otrzymane białko za heteropolimer, przykładowo typu $(\alpha\beta\gamma)_n$. Ciężary cząsteczkowe oraz struktury podjednostkowe przedstawione w tabeli 1 zostały oznaczone tą techniką. Natomiast ocenę ciężaru cząsteczkowego molekuł w stanie natywnym, czyli w tym konkretnym przypadku EF1H, umożliwia sączenie molekularne (np. na żelach typu Sephadex lub Sepharose). Porównanie oznaczenia ciężaru cząsteczkowego różnymi technikami (elektroforeza na żelu poliakryloamidowym, ultrawierowanie w gradiencie gęstości sacharozy, sączenie molekularne) jest zawarte w pracach grupy Kaziro w odniesieniu do czynników elongacyjnych prokariotycznych (34—36). Wyniki otrzymane różnymi technikami wykazują dosyć znaczne rozbieżności, rzędu 20%, pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami.

Wyciągnięcie wniosków o strukturze czynnika EF1 umożliwia również analiza składu aminokwasowego oczyszczonych form tego białka. Porównując wyniki analizy składu formy lekkiej i ciężkiej z wątroby cielęcej (118) można uznać (uwzględniając błąd metody), iż obie formy czynnika EF1 zawierają identyczną kompozycję aminokwasów. Wynik ten sugeruje strukturę typu homopolimeru $(\alpha)_n$.

IV-4. Pomiar aktywności czynnika EF1

Zagadnieniem istotnym zarówno w trakcie oczyszczania EF1, jak i dla porównania homogennych preparatów jest pomiar jego aktywności biologicznej.

W przypadku czynnika EF1 stosowane są następujące testy aktywności biologicznej:

1. Przyłączanie AA-tRNA do rybosomu w obecności poli-U i GTP. Reakcja ta jest zależna od czynnika EF1 przy niskim stężeniu jonów magnezu (5—7 mM). Test ten określa się potocznie terminem „reakcja wiązania” (14, 59, 64, 125).

2. Synteza polifenyloalaniny w układzie poli-U (tzw. reakcja polimeryzacji (126—128). Trzy enzymy determinują przebieg tej reakcji: EF1, EF2 i transferaza peptydylowa. Ten wysoce specyficzny test charakteryzuje się około pięciokrotnie wyższą czułością detekcji czynnika EF1 aniżeli reakcja wiązania (71, 80, 88, 104, 106). Procedura tej reakcji jest bardziej pracochłonna i wymaga stosowania czynnika EF2 nie zanieczyszczonego aktywnością fatora EF1 oraz rybosomów zawierających aktywność transferazy peptydylowej. Po uwzględnieniu tych warunków syntezę polifenyloalaniny można uznać za najbardziej wiarygodny test aktywności czynnika EF1.

3. Wiązanie GTP (lub GDP) do czynnika EF1, czyli tworzenie kompleksu dwuskładnikowego EF1-GTP (lub EF1-GDP) (93, 103, 129, 130). Wadą tej reakcji jest stosunkowo niska specyficzność, gdyż wiele białek zawartych w cytoplazmie może tworzyć kompleksy z fosforanami guanozyny. Z drugiej strony jest to reakcja najłatwiejsza technicznie.

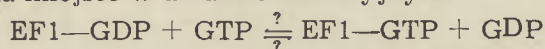
4. Tworzenie kompleksu trójskładnikowego AA-tRNA-EF1-GTP. Test ten jest w praktyce mało używany z powodu trudnej identyfikacji kompleksu i jego izolacji. W przypadku trzech poprzednich reakcji produkt wydzielano na sączku nitrocelulozowym (typu Millipore) (131); kompleks trójskładnikowy przenika przez taki sączek. Można go wykryć np. techniką sączenia molekularnego, co wymaga stosunkowo dużego nakładu pracy (65, 83, 93, 98).

Reasumując przedstawione powyżej cztery metody detekcji i analizy aktywności czynnika EF1 należy przede wszystkim stwierdzić, że każda z powyższych metod może dostarczyć innych informacji i z tego powodu nie należy żadnej pominąć. Najdogodniejszą i najprecyzyjniejszą metodą oceny ilości czynnika wiążącego jest utworzenie kompleksu dwuskładnikowego (metoda 3); kompleks ten powstaje ilościowo i stechiometrycznie (93). Oceniając aktywność czynnika EF1 na podstawie testów wiązania i polimeryzacji należy uwzględnić, że poziom tych reakcji zależy od aktywności innych, komplementarnych składników układu, jak np.: czyn-

nika EF2 czy też rybosomów. Natomiast tworzenie kompleksu trójskładnikowego można również wykorzystać do izolacji specyficznych AA-tRNA (133).

V. Mechanizm reakcji wiązania

Rozpatrując przebieg reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomu, uzależniony od obecności czynnika elongacyjnego EF1 i GTP, szczególnie uwagę zwracamy na charakter (rodzaj) aktywności tego czynnika oraz mechanizm jego działania. Sygnalizujemy w tym miejscu następujący problem: czy czynnik eukariotyczny EF1 charakteryzuje aktywność stechiometryczna (jedna molekula czynnika powoduje przyłączenie jednej cząsteczki AA-tRNA), czy też aktywność katalityczna (EF1 jest zdolny przyłączać wielokrotnie różne AA-tRNA do rybosomu). Zagadnienie to wiąże się ściśle z kwestią struktury czynnika: czy EF1 jest homopolimerem, czy też heteropolimerem? Odpowiedź na te pytania przybliży niezwykle istotna obserwacja dokonana w laboratoriach Kaziro (91, 92, 94) oraz Möllera (82, 132). Stwierdzono, że czynnik EF1 α (zwany również eEFTu), w obecności EF1 β (określonego terminem eEFTs), wykazuje wyraźnie aktywność katalityczną. Pozwala to zakładać podobieństwo mechanizmu reakcji wiązania w układzie eukariotycznym i prokariotycznym. Kluczowym etapem w wyjaśnieniu charakteru aktywności czynnika EF1 jest reakcja wymiany GDP na GTP w kompleksie dwuskładnikowym, podobnie jak to ma miejsce w układzie bakteryjnym:



Czynnik, lub też czynniki, katalizujące tę wymianę, a więc podobne w swej funkcji do EFTs, zostały wyizolowane z jedwabnika (112), wątroby świni (94, 95), skorupiaka *Artemia salina* (132), retikulocytów królika (105) oraz komórek nowotworowych Krebsa (75).

Ponieważ celem niniejszego artykułu jest omówienie aktualnych poglądów na strukturę i funkcję czynnika elongacyjnego 1, zatem nie zostanie tutaj rozpatrzone zagadnienie translacji nieenzymatycznej, tzn. zachodzącej bez udziału faktorów i GTP (133—136). Warunki procesu translacji nieenzymatycznej (wysokie stężenie jonów magnezu, czas, temperatura) pozwalają zresztą wątpić, czy proces takowy może zachodzić *in vivo*.

Na podstawie dostępnych w literaturze danych możemy obecnie wyróżnić trzy koncepcje mechanizmów reakcji wiązania AA-tRNA do rybosomów w układzie eukariotycznym. Każda z nich opiera się na zasadniczo różnych założeniach i prowadzi do merytorycznie odmiennych konkluzji:

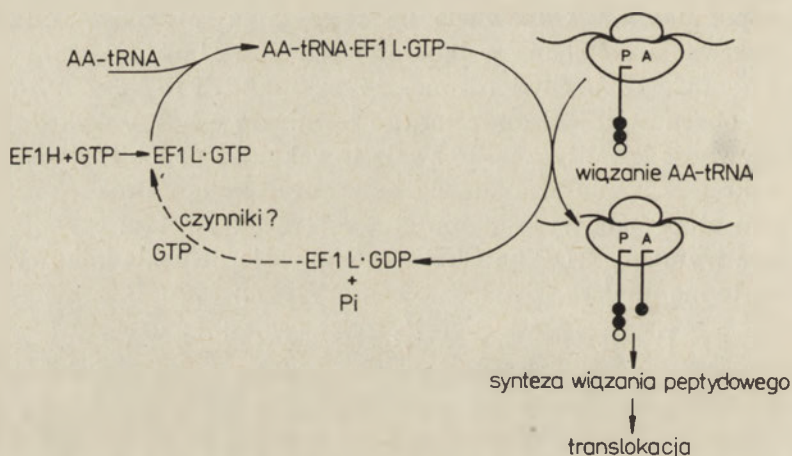
I. Czynnik elongacyjny EF1 jest homopolimerem i występuje w dwóch zasadniczych formach: ciężkiej (EF1H) i lekkiej (EF1L); reakcja przyłączenia AA-tRNA do rybosomu następuje w wyniku utworzenia kolejno

kompleksu dwuskładnikowego z GTP, a następnie trójskładnikowego z AA-tRNA (2, 59, 70).

II. W myśl drugiej koncepcji czynnik EF1 będący homopolimerem jest zdolny do bezpośredniej interakcji z kompleksem polisomalnym trwale wiążąc się z rybosomem. Tak więc EF1 może być traktowany jako endogenne białko rybosomalne (co najmniej w trakcie procesu translacji). W konsekwencji interakcje czynnika EF1 z GTP i AA-tRNA przed ich przyłączeniem do rybosomu nie mają miejsca (73).

III. Czynnik EF1 jest heteropolimerem składającym się z trzech różnych funkcjonalnie podjednostek o odmiennym ciężarze cząsteczkowym. Zgodnie z tą teorią mechanizm aktywności biologicznej czynnika eukariotycznego byłby identyczny z mechanizmem czynnika bakteryjnego EFT (78, 82, 91, 94—96, 112).

V-1. Mechanizm I



Ryc. 4a. Mechanizm I reakcji wydłużania łańcucha polipeptydowego u *Eucaryota*.

Schemat mechanizmu I jest przedstawiony na Rycinie 4a. Podstawowe założenie tej koncepcji stanowi występowanie agregatu formy lekkiej (EF1H) jako polimeru zasadniczej podjednostki (EF1L). W przypadku, gdy oczyszczony produkt wykazywał obecność dwóch łańcuchów polipeptydowych o nieznacznej różnicy ciężarów cząsteczkowych, to preparat uważano za homopolimer, wiążąc występowanie lżejszego białka z aktywnością degradującą enzymów proteolitycznych (103, 106, 107).

Czynnik EF1H tworząc z GTP kompleks dwuskładnikowy ulega jednocześnie przekształceniu do formy lekkiej:



Wykazano, że tylko kompleks formy lekkiej z GTP (1) jest zdolny do interakcji z AA-tRNA celem utworzenia kompleksu trójskładnikowego (2)

(62, 66, 97, 98). Ten kompleks przyłącza się do układu polisomalnego wiążąc AA-tRNA do rybosomalnego miejsca A. Po reakcji wiązania następuje uwolnienie EF1L z rybosomu w formie kompleksu dwuskładnikowego EF1L-GDP oraz wydzielenie nieorganicznego fosforanu. Następne etapy procesu, a mianowicie powtórne przekształcenie EF1L-GDP do EF1L-GTP nie są znane. Nie wiadomo czy następuje dysocjacja kompleksu do wolnych składników (EF1L + GDP), czy też w obecności innych białek enzymatycznych ma miejsce bezpośrednia wymiana GDP na GTP.

Problem można również sformułować inaczej: czy istnieje konieczność powtórnego włączania cząsteczki do cyklu w sposób bardzo szybki, wręcz natychmiastowy? Być może zachodzą inne, nieznanne procesy z udziałem kompleksu EF1L-GDP, których produktem końcowym jest EF1H, a więc forma ciężka. Być może ilość EF1 w komórce wystarcza do jednoczesnego związania wszystkich molekuł AA-tRNA. Taka możliwość istnieje przy założeniu odpowiednio wysokiego stężenia EF1 w cytoplazmie. Brak jest jednakże precyzyjnych danych o zawartości czynnika EF1 w organizmach eukariotycznych. Jedyne doniesienie dotyczy zawartości EF1 w jądrze i jąderku wątroby szczura (90). Panuje natomiast zgodna opinia o wysokim stężeniu faktora EFTu w cytoplazmie komórek bakteryjnych (52, 137). Niektórzy autorzy wyceniają EFTu na 6⁰% całkowitej ilości białek cytoplazmatycznych (138). Być może wiąże się to ze znalezieniem w *E. coli* dwóch genów dla EFTu (139). Znaleziono również ścisłą korelację między stosunkiem ilościowym molekuł EFTu i rybosomów, a szybkością namnażania bakterii (138). Podobną korelację wykryto pomiędzy tRNA a rybosomami (140). Obliczony z tych danych stosunek ilościowy tRNA do EFTu wynosi 1:1. A zatem w przypadku bakterii *E. coli*, gdyby każda cząsteczka tRNA była zaminoacylowana, to w danym momencie komórka potencjalnie dysponowałaby wystarczającą ilością molekuł czynnika dla jednoczesnego utworzenia kompleksów trójskładnikowych.

Reasumując należy stwierdzić, iż omawiany schemat opierający się na założeniu struktury homopolimerycznej EF1 jest prosty i jasny, jednakże nie wyjaśnia następujących kwestii:

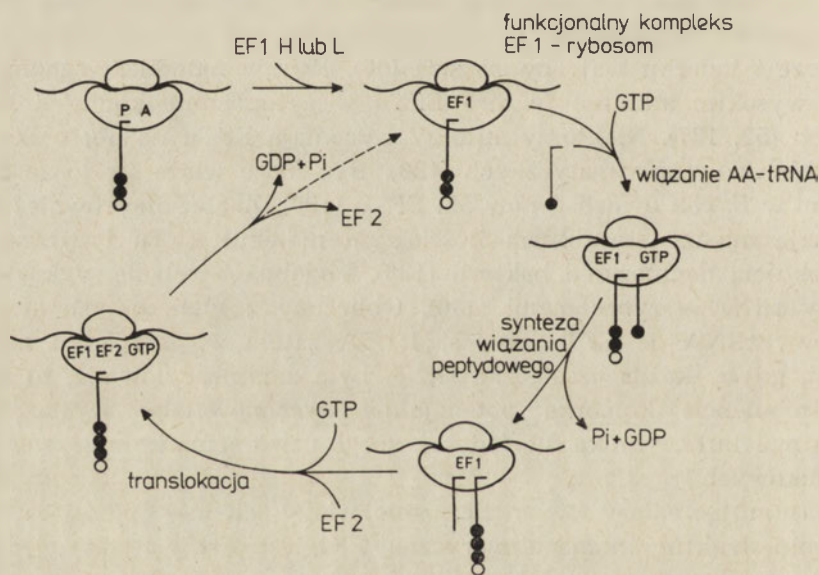
- 1) co się dzieje z kompleksem EF1L-GDP?,
- 2) czy czynnik EF1 działa stechiometrycznie, czy też katalitycznie w reakcji wiązania?,
- 3) jaka jest rola agregatu EF1H?.

V-2. Mechanizm II

Mechanizm reakcji wiązania zasadniczo odmienny od przedstawionego powyżej sformułowali Grasmuk, Nolan i Drews (73). Pracując z komórkami nowotworowymi Krebsa otrzymali oni w pełni aktywny bio-

logicznie czynnik EF1 znaczone izotopem radioaktywnym. Poprzednio w innych pracowniach otrzymywano wprawdzie radioaktywne czynniki EF1 (w wyniku reduktywnej metylacji), jednakże przy praktycznie całkowitej utracie aktywności biologicznej (108). Zgodnie z pierwotnymi ustaleniami tej grupy przyjęto założenie, że EF1 występuje w komórkach nowotworu w formie homopolimeru (71, 72). Dysponując radioaktywnym, aktywnym biologicznie czynnikiem EF1 autorzy stwierdzili następujące fakty:

- 1) EF1 wiąże się bezpośrednio do rybosomu,
- 2) przyłączanie EF1 do rybosomu jest niezależne od GTP oraz od AA-tRNA,
- 3) kompleks EF1-rybosom jest bardzo trwały i zdolny do przyłączania zarówno GTP jak i AA-tRNA,
- 4) czynnik elongacyjny wiążący przyłączony do rybosomu nie jest z niego uwalniany przez GTP czy też EF2 (lub inny czynnik) w trakcie wydłużania łańcucha polipeptydowego.



Ryc. 4b. Mechanizm II reakcji wydłużania łańcucha polipeptydowego u *Eucaryota*.

W myśl założeń koncepcji przedstawionej na Rycinie 4b czynnik EF1 przyłącza się sam do rybosomu stając się w ten sposób integralnym elementem jednej z podjednostek. Następnie ma miejsce przyłączenie AA-tRNA i GTP, przy czym po związaniu AA-tRNA do rybosomu zachodzi wydzielenie fosforanu nieorganicznego (P_i). W dalszym ciągu, w obecności czynnika EF2, cząsteczki GTP oraz transferazy peptydydowej, następuje synteza wiązania peptydowego, translokacja i uwolnienie z rybosomu wszystkich makromolekuł poza EF1. Czynnik EF1 pozostaje związany z rybosomem i w tej formie przechodzi do kolejnego cyklu.

Mechanizm powyższy wyjaśnia pytania postawione uprzednio z wyjątkiem kwestii: jaka jest rola EF1H oraz ewentualnie funkcja innych czynników wiążących. Taki mechanizm reakcji wiązania staje pod znakiem zapytania wobec faktu, iż w wyniku krytycznej analizy swych uprzednio opublikowanych wyników, ci sami autorzy stwierdzili, że preparat ich jest hetero- a nie homopolimerem (75). W myśl nowych ustaleń czynnik elongacyjny wiążący występuje w formie ciężkiej, oznaczonej eEFTH, będącej kompleksem eEFTu i eEFTs. Autorzy zastosowali nomenklaturę zgodną z sugestią Slobina i Möllera (132). Czynnik EF1L, w myśl tej zasady nomenklaturowej, poprzez analogię do układu prokariotycznego określono jako eEFTu, a EF1 β jako eEFTs; w oznaczeniach tych e — oznacza eukariotyczny. Przyjęcie takich oznaczeń nomenklaturowych wyniknęło z przekonania autorów o daleko posuniętym podobieństwie czynników eukariotycznych i prokariotycznych.

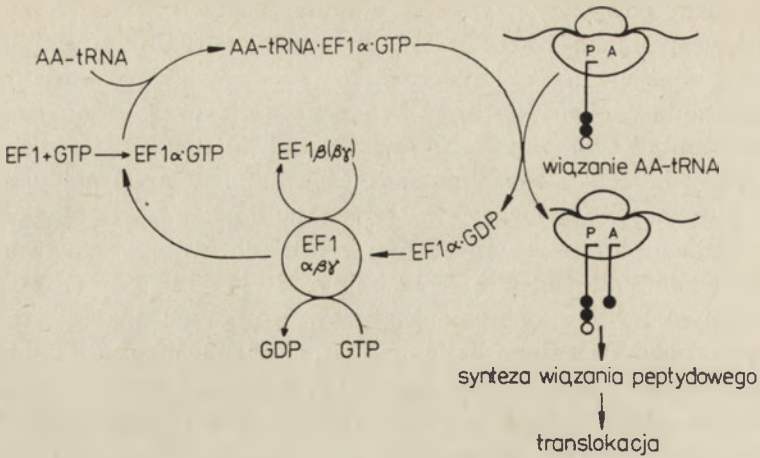
Przypisanie czynnikowi EF1 struktury heteropolimeru nie wyklucza zasadniczo możliwości asocjacji czynnika z rybosomem. W takiej sytuacji konieczne jest jednakże wyjaśnienie czy oba czynniki eEFTu i eEFTs są związane z rybosomem, czy tylko jeden z nich. Poza tym trwałe przyłączenie czynnika elongacyjnego do rybosomu stanowiłoby zasadniczą różnicę w stosunku do układu bakteryjnego, a więc byłoby sprzeczne z tezą o podobieństwie obu układów.

V-3. Mechanizm III

W szeregu laboratoriów ustalono, iż czynnik EF1 ma strukturę heteropolimeru typu $(\alpha\beta\gamma)_n$ (62, 63, 77, 78, 82, 91—96, 105, 111, 112). Stwierdzono, że jeden z tych czynników — EF1 α , jest odpowiedzialny za przyłączenie AA-tRNA do rybosomu, natomiast kompleks dwóch pozostałych lub jeden z nich (EF1 $\beta\gamma$ lub tylko EF1 β) nadaje charakter katalityczny czynnikowi EF1 α , poprzez wymianę GDP na GTP w kompleksie dwuskładnikowym. Tak więc zaobserwowano zależności podobnie jak w dobrze poznanym układzie prokariotycznym. Z tego też powodu Slobin i Möller zaproponowali przyjęcie uprzednio przedstawionej terminologii (132) (patrz rozdział V-2).

Mechanizm sugerowany przez Kaziro i Möllera jest przedstawiony na rycinie 4c.

Stwierdzono, że czynnik EF1 α tworzy kompleks trójskładnikowy z GTP i AA-tRNA (78, 93), jakkolwiek istnieje również doniesienie o powstawaniu kompleksu dwuskładnikowego EF1 α -AA-tRNA (83). Czynnik EF1 α specyficznie rozróżnia i odrzuca deacylowany tRNA. Jednocześnie wykazano, iż czynnik EF1 α w obecności GTP przyłącza AA-tRNA do rybosomu w sposób stechiometryczny. Czynnik EF1 α jest zdolny do przyłączenia więcej niż jednej molekuly AA-tRNA, dopiero po wprowadzeniu



Ryc. 4c. Mechanizm III reakcji wydłużania łańcucha polipeptydowego u *Eucaryota*.

do układu drugiego czynnika elongacyjnego wiążącego — EF1β (75, 94, 112). Czynniki EF1β lub też kompleks EF1βγ (rola czynnika EF1γ nie jest jeszcze poznana) w myśl tej koncepcji pełni funkcję identyczną jak EFTs. Po wymianie GDP na GTP w kompleksie dwuskładnikowym katalizowanej przez EF1β (czyli eEFTs) cząsteczka EF1α (czyli eEFTu) może powrócić do cyklu i powtórnie katalizować przyłączanie kolejnych AA-tRNA do rybosomu.

Zrozumiałe, że ta nowa teoria powoduje powstanie kolejnych pytań i wątpliwości. Pierwszym pytaniem jest niewątpliwie rola czynnika EF1γ występującego w kompleksie EF1βγ. Jeżeli czynniki EF1γ posiada istotne znaczenie dla procesu wiązania AA-tRNA do rybosomu eukariotycznego, to występuje tu rozbieżność w porównaniu z układem prokariotycznym. Kwestia druga: jeżeli mechanizmy elongacji łańcucha polipeptydowego u *Eucaryota* i *Procaryota* są niemal identyczne (patrz ryc. 3 i 4c), a struktura molekularna i skład aminokwasowy nader podobne (patrz tabela 1 i ref. 36, 122, 141) to dlaczego nie dają pozytywnego wyniku eksperymenty krzyżowe, czyli wymiana czynników elongacyjnych pomiędzy układami 70S i 80S? Poza tym brak jest wyjaśnienia roli i funkcji formy ciężkiej EF1, obserwowanej również przez autorów cytowanych w niniejszym rozdziale.

Niezależnie od dwóch powyższych problemów, nadal niewyjaśnione jest przyłączanie się czynników elongacyjnych do rybosomów — czy następuje ono w jednym miejscu wspólnym, czy też w kilku różnych oraz gdzie są one zlokalizowane.

Ogólne podsumowanie przedstawionych powyżej trzech mechanizmów jest kwestią bardzo trudną. Zdaniem autorów niniejszego przeglądu żadna z powyższych koncepcji nie stanowi pełnego wyjaśnienia mechanizmu reakcji wiązania. Kwestie niejasne, wątpliwości wypunktowane po każdej

teorii uniemożliwiają przyjęcie którejkolwiek z nich. Wydaje nam się, że kluczem do rozwiązania problemu może być funkcja enzymów proteolitycznych. Dla udowodnienia tezy o zasadniczym znaczeniu proteaz należałoby otrzymać w wyniku proteolizy formy ciężkiej pozostałe formy czynnika elongacyjnego 1 pełniące podstawowe funkcje czynnika wiążącego, a więc: wiązanie AA-tRNA do rybosomu a także wymianę GDP na GTP w kompleksie dwuskładnikowym.

VI. Inne funkcje biologiczne czynników elongacyjnych wiążących.

Wysokie stężenie czynników elongacyjnych wiążących w cytoplazmie komórki eukariotycznej (patrz rozdział V-1) nasuwa pytanie, czy uczestnictwo w procesie biosyntezy białka to jedyna funkcja biologiczna tych enzymów. Jedną z hipotez zakłada, że wielorakość form molekularnych jest czynnikiem regulującym szybkość całego procesu biosyntezy białka (118). Domniemanie ewentualnych funkcji regulatorowych formy ciężkiej i lekkiej czynnika EF1 wynika również z omówionych w rozdziale IV-2 zmian zachodzących w trakcie cyklu rozwojowego *A. salina* i nicieni (76, 124). Istnieje kilka doniesień o funkcjach czynników bakteryjnych innych niż biosynteza białka. Stwierdzono, że faktory EFTu i EFTs stanowią dwie z czterech podjednostek RNA-polimerazy replikującej bakteriofag Q β amB86 (142—144). Travers wykrył, że EFT stymuluje biosyntezę rybosomalnego RNA u *E. coli* (145). Czynniki prokariotyczne uczestniczą również w inicjacji syntezy fagowego RNA (146).

VII. Transferaza peptydylowa oraz czynniki elongacyjne EF2 i EFG.

Utworzenie wiązania peptydowego pomiędzy nowo przyłączonym AA-tRNA, znajdującym się w miejscu rybosomalnym A oraz peptydylo-tRNA (względnie też inicjatorowym Met-tRNA), będącym w miejscu P rybosomu, katalizowane jest przez transferazę peptydylową (podetap 2 na Ryc. 2) (147—150). Enzym ten, lub też kompleks enzymatyczny, jest dotychczas słabo poznany. Wiadomo jednak, że stanowi integralny element większej podjednostki rybosomalnej. W retikulocytach królika wykazano, że dwa białka większej podjednostki rybosomalnej oznaczane jako L-27 i L-29 tworzą centrum transferazy peptydylowej (148). Do syntezy wiązania peptydowego, zwanej też niekiedy transpeptydacją, obecność żadnych innych egzogennych (np. cytoplazmatycznych) enzymów nie jest konieczna.

Po syntezie wiązania peptydowego w miejscu A rybosomu znajduje się peptydylo-tRNA, a w miejscu P — deacylowany tRNA. Teraz następuje proces translokacji (podetap 3 na Ryc. 2) polegający na przesunięciu rybosomu wzdłuż matrycowego RNA, o jeden kodon w kierunku od 5' do 3'. W trakcie translokacji deacylowany tRNA jest uwalniany z rybosomu (z rybosomalnego miejsca P), natomiast peptydylo-tRNA jest przesuwany z miejsca A do P. W konsekwencji zwalnia się znów miejsce A na

rybosomie, gotowe do przyjęcia kolejnej cząsteczki AA-tRNA. Reakcję przeniesienia katalizuje czynnik elongacyjny EFG lub EF2 (odpowiednio w układzie prokariotycznym lub eukariotycznym) (127, 151). Wiele prac omawia oczyszczanie i własności zarówno czynnika elongacyjnego przenoszącego EFG (26, 28, 30, 34, 152—154) jak i EF2 (13, 86, 128, 155—158).

Aktywność czynnika elongacyjnego 2 (zwanego dawniej translokazą lub aminoacylotransferazą T2) można badać za pomocą następujących testów:

1. Syntezy polifenyloalaniny na polisomie w obecności poli-U, GTP i EF1; reakcja ta była opisana w rozdziale IV-4.

2. Pomiaru aktywności GTP-azowej; w obecności rybosomów czynnik EF2 katalizuje hydrolizę GTP do GDP. Ilość wydzielonego ortofosforanu nieorganicznego jest miarą aktywności enzymu (159—161).

3. Rybozylacji EF2 w obecności toksyny dyfteryjnej; ADP-ryboza przyłącza się w stosunku stechiometrycznym do EF2. Reakcja ta jest wysoce specyficzna i nader czuła (128, 162).

4. Tworzenia peptydylopuromycyny; reakcja polega na utworzeniu wiązania peptydowego pomiędzy polipeptydem a puromycyną znajdującą się w miejscu P na rybosomie. Puromycyna, jako strukturalny analog końca 3'-aminoacyloadenozylowego cząsteczki AA-tRNA, może przyłączać się do rybosomu zamiast AA-tRNA. Test reakcji puromycynowej jest również stosowany przy badaniach nad transferazą peptydylową (150, 163).

Czynnik EF2 (podobnie jak EFG) jest pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o ciężarze cząsteczkowym w przedziale 60 000 D — 100 000 D. Przykładowe ciężary cząsteczkowe czynników EF2 wynoszą: z zarodków pszenicy i drożdży 70 000 D (128, 164), z wątroby szczura 96 000 D lub 65 000 D (86, 165), z retikulocytów królika 100 000 D (157).

Dla kilku czynników EF2, pochodzących z różnych źródeł, znany jest całkowity skład aminokwasowy (36, 157, 160, 166). Podobnie jak w przypadku czynników wiążących występuje duże podobieństwo ogólnego składu aminokwasowego czynników elongacyjnych prokariotycznych i eukariotycznych. Z drugiej strony obserwujemy stosunkowo duże różnice w zawartości cysteiny — aminokwasu szczególnie często występującego w centrum aktywnym enzymu.

VIII. Zakończenie

Intensywne badania prowadzone nad mechanizmem procesu translacji w zasadniczy sposób zwiększyły nasz zasób wiadomości. Jednakże, jak widać na przykładzie reakcji wiązania aminoacylo-tRNA do rybosomu, duża ilość zebranych w literaturze faktów eksperymentalnych nie daje jasnego i jednoznacznego obrazu; ich interpretacja jest poważnym problemem. Spróbujmy zebrać sygnalizowane już uprzednio pytania, doty-

czące mechanizmu reakcji wiązania oraz własności czynników elongacyjnych wiążących, na które brak w chwili obecnej odpowiedzi:

- 1) jaką rolę pełni forma ciężka czynnika elongacyjnego, EF1H?,
- 2) jaki mechanizm rządzi przekształceniem formy ciężkiej do lekkiej oraz czy *in vivo* występuje proces odwrotny?,
- 3) jaka jest funkcja biologiczna podjednostek czynnika EF1, a w szczególności czynnika EF γ ?,
- 4) do którego miejsca lub miejsc rybosomu wiążą się czynniki elongacyjne?,
- 5) czy mechanizm reakcji wiązania i czynniki wiążące są identyczne u *Eucaryota* i *Procaryota*?, (a jeżeli tak, to dlaczego nie ulegają wymianie pomiędzy układami?),
- 6) jakie są „losy” molekuly EF1L po procesie translacji?, czy następuje degradacja, czy też odtworzenie EF1H?

Z całą pewnością nie wszystkie istotne, a nie rozwiązane dotychczas, problemy związane z czynnikami elongacyjnymi wiążącymi zostały wymienione powyżej. Ten otwarty i niezwykle atrakcyjny temat wymaga dalszych badań.

Zaakceptowano do druku 20.11.1979

PIŚMIENICTWO

1. Haselkorn R., Rothman-Denes L. B., (1973), *Ann. Rev. Biochem.*, **42**, 397—438.
2. Weissbuch H., Ochoa S., (1976), *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 191—216.
3. *Methods in Enzymology*, t. XXX, red. Moldave K., Grossman L., Acad. Press, (1974), New York, London.
4. *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis* (1977), red. Weissbach H., Pestka S., Acad. Press, New York.
5. Kaziro Y., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 95—127.
6. Jachymczyk W., (1975), *Post. Biochem.*, **21**, 119—147.
7. Grankowski N., (1976), *Post. Biochem.*, **22**, 173—195.
8. Filipowicz W., (1977), *Post. Biochem.*, **23**, 21—59.
9. Klein H. A., Ochoa S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 8122—8128.
10. Miller R. L., Schweet R., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 632—646.
11. Ciferri O., Tiboni O., Munoz-Calvo M. L., Camerino G. w *Nucleic Acids and Protein Synthesis in Plants*, red. Bogorad L., Weil J. H., (1977), str. 155—166, Plenum Press, New York.
12. Zasloff M., Ochoa S., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1796—1799.
13. Taira H., Ejiri S., Shimura K., (1972), *J. Biol. Chem.*, **72**, 1527—1535.
14. Krisko I., Gordon J., Lipmann F., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 6117—6123.
15. Ono Y., Skoultchi A., Waterson J., Lengyel P., (1969), *Nature*, **222**, 645—648.
16. Ono-Iwashita Y., Oshima T., Imakori K., (1975), *Z. Allg. Mikrobiol.*, **15**, 131—134.
17. Miller D. L., Weissbach H., w *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, red. Weissbach H., Pestka S., (1977), str. 323—373, Acad. Press, New York.

18. Gielkens A. L. J., Salden M. H. L., Bloemendal H., Konings R. N. H., (1972), *FEBS Letters*, **28**, 348—352.
19. Schreier M. H., Staehelin T., (1973), w Regulation of Transcription and Translation in Eucaryotes, red. Bautz E., 24th Mosbacher Colloq., str. 335—349, Springer Verlag, Berlin, N. York.
20. Aviv H., Boime I., Leder P., (1972), *Science*, **178**, 1293—1295.
21. Berthelot F., Bogdanovsky D., Schapira G., Gros F., (1973), *Mol. Cell Biochem.*, **1**, 63—72.
22. Elson N. A., Adam S. L., Merrick W. C., Safer B., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **25**, 3074—3079.
23. Bishop J. O., Schweet R. S., (1961), *Biochim. Biophys. Acta*, **49**, 235—236.
24. Allende J., Monro R., Lipmann F., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**, 1211—1216.
25. Caskey T., Leder P., Moldave K., Schlessinger D., (1972), *Science*, **176**, 195—197.
26. Nishizuka Y., Lipmann F., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 212—219.
27. Lucas-Lenard J., Lipmann F., (1966), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1562—1566.
28. Parmeggiani A., (1968), *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **30**, 613—619.
29. Leder P., Skogerson L. E., Nau M. M., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **62**, 454—460.
30. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7029—7037.
31. Waterson J., Beaud G., Lengyel P., (1970), *Nature*, **227**, 34—38.
32. Beaud G., Lengyel P., (1971), *Biochemistry*, **10**, 4899—4905.
33. Wittinghoffer A., Leberman R., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **62**, 373—382.
34. Arai K., Ota Y., Arai N., Nakamura S., Henneke C., Oshima T., Kaziro Y., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 509—519.
35. Arai K., Arai N., Nakamura S., Oshima T., Kaziro Y., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 521—531.
36. Nakamura S., Ohta S., Arai K., Arai N., Oshima T., Kaziro Y., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 533—543.
37. Tiboni O., Di Pasquale G., Ciferri O., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 471—477.
38. Ciferri O., Tiboni O., (1973), *Nature New Biology*, **245**, 208—211.
39. Tiboni O., Di Pasquale G., Ciferri O., (1976), *Plant Sci. Lett.* **6**, 419—429.
40. Ciferri O., Tiboni O., (1976), *Plant Sci. Lett.*, **7**, 455—466.
41. Gordon J., (1968), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 179—183.
42. Gordon J., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 5680—5686.
43. Yokosawa H., Inoue-Yokosawa N., Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 375—377.
44. Miller D. L., Weissbach H., (1969), *Arch. Biochem. Biophys.*, **132**, 146—150.
45. Lucas-Lenard J., Tao P., Haenni A., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 455—462.
46. Weissbach H., Miller D. L., Hachmann J., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 262—269.
47. Miller D. L., Weissbach H., (1970), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 1016—1022.

48. Weissbach H., Redfield B., Hachmann J., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **141**, 384—386.
49. Miller D. L., Cashel M., Weissbach H., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 675—682.
50. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 293—306.
51. Keller E. B., Zamecnik P. C., (1956), *J. Biol. Chem.*, **221**, 45—59.
52. Miller D. L., Weissbach H., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **141**, 26—37.
53. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 293—306.
54. Kaziro Y., w *Reflections on Biochemistry*, red. Kornberg A., Horecker B. L., Cornudella L., Oro J., (1976) str. 85—94, Pergamon Press. Oxford.
55. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., Maeda T., Ohnishi S., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 3311—3313.
56. Arai K., Arai T., Kawakita M., Kaziro Y., (1975), *J. Biochem.*, **77**, 1095—1106.
57. Crane L. J., Miller D. L., (1974), *Biochemistry*, **13**, 933—939.
58. Prantz M. P., Miller D. L., (1973), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 149—156.
59. Golińska B., Legocki A. B., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **324**, 156—170.
60. Quintard B., Julien R., (1975), *FEBS Letters*, **57**, 285—289.
61. Lanzani G. A., Bollini R., Soffientini A. R., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **335**, 275—283.
62. Bollini R., Soffientini A. N., Bertani A., Lanzani G. A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 5421—5425.
63. Lanzani G. A., Caldiroli E., Manzocchi L. A., Bollini R., De Alberti L., (1976), *FEBS Letters*, **64**, 102—106.
64. Legocki A. B., Marcus A., (1970), *J. Biol. Chem.*, **245**, 2814—2818.
65. Jerez C., Sandoval A., Allende J. E., Henes C., Ofengand J., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3006—3014.
66. Tarrago A., Allende J. E., Redfield B., Weissbach H., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 353—361.
67. Dell'Aquila A., De Leo P., Caldiroli E., Zocchi G., (1978), *Plant Sci. Lett.*, **12**, 217—226.
68. Dell'Aquila A., Zocchi G., Lanzani G. A., De Leo P., (1976), *Phytochemistry*, **15**, 1607—1610.
69. Legocki A. B., (1972), *Symp. Biol. Hung.*, **13**, 169—173.
70. Legocki A. B., Golińska B., Twardowski T., Redfield B., Weissbach H., (1975), *INSERM*, **47**, 217—224.
71. Drews J., Bednarik K., Grasmuk H., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **41**, 217—227.
72. Grasmuk H., Nolan R. D., Drews J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **67**, 421—431.
73. Grasmuk H., Nolan R. D., Drews J., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **71**, 271—279.
74. Grasmuk H., Nolan R. D., Drews J., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 93—102.
75. Grasmuk H., Nolan R. D., Drews J., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 479—490.
76. Slobin L. J., Möller W., (1975), *Nature*, **258**, 452—454.
77. Slobin L. J., Möller W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 351—366.
78. Slobin L. J., Möller W., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **69**, 367—375.
79. Nagata S., Iwasaki K., Kaziro Y., (1976), *J. Biochem.*, **80**, 73—77.

80. Nombela C., Redfield B., Ochoa S., Weissbach H., (1976), *Eur. J. Biochem.*, **65**, 395—402.
81. Twardowski T., Hill J., Weissbach H., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 826—833.
82. Slobin L. J., Möller W., (1977), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 356—365.
83. Roobol K., Möller W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **90**, 471—478.
84. Gąsior E., Moldave K., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 3346—3352.
85. Schneir M., Moldave K., (1968), *Biochim. Biophys. Acta*, **166**, 58—67.
86. Gałasiński W., Moldave K., (1969), *J. Biol. Chem.*, **224**, 6527—6532.
87. Gąsior E., Rao P., Moldave K., (1971), *Biochim. Biophys. Acta*, **254**, 331—340.
88. Collins J. F., Moon H. M., Maxwell E. S., (1972), *Biochemistry*, **11**, 4187—4194.
89. Kotsiopoulos P. S., Mohr S. C., (1975), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 979—987.
90. Rao M. S., Rothblum L. I., Busch H., (1978), *Cell Biol. Inter. Rep.*, **2**, 25—32.
91. Iwasaki K., Mizumoto K., Tanaka M., Kaziro Y., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 849—852.
92. Iwasaki K., Nagata S., Mizumoto K., Kaziro Y., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5008—5010.
93. Nagata S., Iwasaki K., Kaziro Y., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 168—177.
94. Iwasaki K., Motoyoshi K., Nagata S., Kaziro Y., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 1843—1845.
95. Nagata S., Motoyoshi K., Iwasaki K., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 933—938.
96. Nagata S., Iwasaki K., Kaziro Y., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 1633—1646.
97. Moon H. M., Weissbach H., (1972), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 254—262.
98. Moon H. M., Redfield B., Weissbach H., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1249—1252.
99. Moon H. M., Redfield B., Millard S., Vane F., Weissbach H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3282—3286.
100. Weissbach H., Redfield B., Moon H. M., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **156**, 267—275.
101. Legocki A. B., Redfield B., Weissbach H., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 709—712.
102. Legocki A. B., Redfield B., Liu C. K., Weissbach H., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 2179—2182.
103. Mc Keehan W. L., Hardesty B., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4330—4339.
104. Lin S. Y., Mc Keehan W. L., Culp W., Hardesty B., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 4340—4350.
105. Prather N., Ravel J. M., Hardesty B., Shive W., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 578—583.
106. Kemper W. M., Merrick W. C., Redfield B., Liu C. K., Weissbach H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 603—612.
107. Twardowski T., Redfield B., Kemper W. M., Merrick W. C., Weissbach H., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 272—279.
108. Twardowski T., Hill J. M., Weissbach H., (1976), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 826—833.

109. Twardowski T., Hill J. M., Weissbach H., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 444—451.
110. Kolb A. J., Redfield B., Twardowski T., Weissbach H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **519**, 398—405.
111. Ejiri S., Taira H., Shimura K., (1973), *J. Biochem.*, **74**, 195—197.
112. Ejiri S., Murakami K., Katsumata T., (1977), *FEBS Letters*, **82**, 111—114.
113. Ejiri S., Murakami K., Katsumata T., (1978), *FEBS Letters*, **92**, 251—254.
114. Murakami K., Ejiri S., Katsumata T., (1978), *FEBS Letters*, **92**, 255—257.
115. Plant P. W., Nielsen J. B. K., Haschemeyer A. E. V., (1977), *Phys. Zool.*, **50**, 11—21.
116. Nielsen J. B. K., Plant P. W., Haschemeyer A. E. V., (1977), *Phys. Zool.*, **50**, 22—29.
117. Lanzani G. A., Giannattasio M., Manzocchi L. A., Bollini R., Soffientini A. N., Macchia V., (1974), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 172—174.
118. Liu C. K., Legocki A. B., Weissbach H., (1974), w Lipmann Symposium: Energy, Regulation, and Biosynthesis in Molecular Biology, red. Richter D., str. 384—398, de Gruyter, Berlin.
119. Anfinsen C. B., Sheraga H. A., (1975), w *Advances in Protein Chemistry*, red. Anfinsen C. B., Edsall J. T., Richards F. M., **29**, 205—300.
120. Nagata S., Motoyoshi K., Iwasaki K., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 423—429.
121. Arai K., Nakamura S., Arai T., Kawakita M., Kaziro Y., (1976), *J. Biochem.*, **79**, 69—83.
122. Nakamura S., Arai K., Takahashi K., Kaziro Y., (1977), *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1418—1424.
123. Jacobson G. R., Rosenbusch J. P., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5105—5110.
124. Bolla R., Brot N., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 227—236.
125. Ravel J. M., Shorey R. L., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. XX, str. 306—316, Acad. Press, N. York.
126. Nishizuka Y., Lipmann F., Lucas-Lenard J., (1968), w *Methods in Enzymology*, red. Grossman L., Moldave K., t. XII, str. 708—721, Acad. Press, N. York.
127. Brot N., (1977), w *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, red. Weissbach H., Pestka S., str. 375—411, Acad. Press, N. York.
128. Twardowski T., Legocki A. B., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **324**, 171—183.
129. Allende J. E., Ofengand J., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. XX, str. 360—363, Acad. Press, New York, London.
130. Lanzani G. A., Caldiroli E., Zocchi G., Manzocchi L. A., Bollini R., de Alberti L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **407**, 449—458.
131. Nirenberg M. W., Leder P., (1964), *Science*, **145**, 1399—1407.
132. Slobin L. I., Möller W., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **84**, 69—77.
133. Klyde B. J., Bernfield M. R., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3752—3757.
134. Pestka S., (1969), *J. Biol. Chem.*, **244**, 1533—1539.
135. Pestka S., (1974), w *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. XXX, str. 462—470, Acad. Press, N. York.

136. Gavrilova L. P., Kostiaszhkina O. E., Koteliansky V. E., Rutkiewitch N. M., Spirin A. S., (1976), *J. Mol. Biol.*, **101**, 537—552.
137. Jacobson G. R., Rosenbusch J. P., (1976), *Nature*, **261**, 23—26.
138. Furano A. V., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4780—4784.
139. Jaskunas S. R., Lindahl L., Nomura M., Burgess R. R., (1975), *Nature*, **257**, 458—462.
140. Rosset R., Julien J., Monier R., (1966), *J. Mol. Biol.*, **28**, 308—320.
141. Arai K., Kawakita M., Kaziro Y., Kondo T., Ui N., (1973), *J. Biochem.*, **73**, 1095—1105.
142. Blumenthal T., Landers T. A., Weber K., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 1313—1317.
143. Blumenthal T., Young R. A., Brown S., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2740—2743.
144. Blumenthal T., Landers T. A., (1976), *Biochemistry*, **15**, 422—425.
145. Travers A. A., (1973), *Nature*, **244**, 15—18.
146. Landers T. A., Blumenthal T., Weber K., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5801—5808.
147. Vazquez D., Battaner E., Neth R., Heller G., Monro R. E., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 369—375.
148. Stahl J., Dressler K., Bielka H., (1974), *FEBS Letters*, **47**, 167—172.
149. Harris R. J., Pestka S., (1977), w *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, str. 413—442, red. Weissbach H., Pestka S., Acad. Press, New York.
150. Sikorski M. M., (1978), praca doktorska, Międzyuczelniany Instytut Biochemii, Poznań.
151. Lucas-Lenard J., Beres L., (1974), w *The Enzymes*, red. Boyer P. D., wyd. III, t. X, str. 53—86, Acad. Press, N. York.
152. Felicetti L., Lipmann F., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 548—557.
153. Kaziro Y., Inoue-Yokosawa N., Kawakita M., (1972), *J. Biochem.*, **72**, 853—863.
154. Rohrbach M. S., Dempsey M. E., Bodley J. W., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 5094—5101.
155. Raeburn S., Collins J. F., Moon H. M., Maxwell E. S., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1041—1048.
156. Mizumoto K., Iwasaki K., Tanaka M., Kaziro Y., (1974), *J. Biochem.*, **75**, 1047—1056.
157. Merrick W. C., Kemper W. M., Kantor J. A., Anderson W. F., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2620—2625.
158. Comsock, J. F. Van N. T., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **477**, 199—220.
159. Conway T. W., Lipmann F., (1964), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **52**, 1462—1466.
160. Taira H., Ejiri S., Shimura K., (1974), *J. Biochem.*, **76**, 949—957.
161. Twardowski T., Legocki A. B., (1977), *Acta Biochim. Pol.*, **24**, 21—33.
162. Robinson E. A., Maxwell E. S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 7023—7028.
163. Pestka S., (1974), w *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. XXX, str. 470—488, Acad. Press, New York.
164. Richter D., Klink F., (1971), w *Methods in Enzymology*, red. Moldave K., Grossman L., t. XX, str. 349—359, Acad. Press, New York.
165. Collins I. F., Raeburn S., Maxwell E. S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **246**, 1049—1054.
166. Kaziro Y., Inoue N., Kuriki Y., Mizumoto K., Tanaka M., Kawakita M., (1969), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 385—393.

ZENON GRABAREK *, JACEK KUŹNICKI **

Homologiczne białka wiążące wapń.

Homologous Calcium Binding Proteins.

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wiązanie wapnia przez białka
 - II-1. Mechanizm wiązania wapnia
 - II-2. Specyficzność wiązania wapnia
- III. Homologiczne białka wiążące wapń
 - III-1. Właściwości i struktura parwalbumin
 - III-2. Ewolucja homologicznych białek wiążących wapń
 - III-3. Właściwości troponiny C
 - III-4. Struktura troponiny C
 - III-5. Właściwości fragmentów troponiny C
 - III-6. Lokalizacja zmian konformacyjnych
 - III-7. Aktywność biologiczna troponiny C
 - III-8. Inne modele struktury troponiny C
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. General aspects of calcium binding by proteins
 - II-1. Mechanism of calcium binding
 - II-2. Specificity of calcium binding
- III. Homologous calcium binding proteins
 - III-1. Properties and structure of parvalbumins
 - III-2. Evolution of homologous calcium binding proteins
 - III-3. Properties of troponin C
 - III-4. Structure of troponin C
 - III-5. Properties of troponin C fragments
 - III-6. Localization of conformational changes

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

Wykaz stosowanych skrótów: cAMP — cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan; cGMP — cykliczny 3',5'-guanozynomonofosforan; NMR — magnetyczny rezonans jądrowy.

III-7. Biological activity of troponin C

III-8. Other models of troponin C structure

VI. Concluding remarks

I. Wstęp

Badania ostatnich lat potwierdziły pogląd o podstawowej roli wapnia w wielu procesach zachodzących w organizmach żywych. Od stężenia jonów wapnia zależy między innymi regulacja skurczu mięśnia, mechanizm przewodzenia nerwowego, kontrola metabolizmu cyklicznych nukleotydów, aktywacja wielu enzymów mitochondrialnych, metabolizm witaminy D, zjawiska krzepnięcia krwi i wiele innych. Ze względu na nadrzędną (regulującą) rolę wapnia nazwano go przekaźnikiem drugiego rodzaju (ang. second messenger) obok cAMP i cGMP. We wszystkich przypadkach efektem działania wapnia jest aktywność specyficznych białek wiążących wapń (1). Wcześniejsze prace dotyczące niektórych z tych białek omówiono w artykule B a r y ł k o (2).

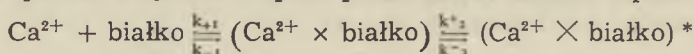
Ostatnie lata dostarczyły szeregu nowych danych na ten temat i obecnie znanych jest około 60 białek wykazujących zdolność wiązania wapnia. Wśród nich parwalbuminy, troponina C, kalmodulina oraz lekkie łańcuchy miozyny tworzą grupę o wspólnym ewolucyjnym pochodzeniu i podobnej strukturze. Podobną budowę mają: białko wiążące wapń zależne od witaminy D (*vitamin D CaBP*) oraz izolowane z mózgu — białko S-100. Choć ich struktura pierwszorzędowa nie została wyznaczona szereg danych wskazuje, że są to białka homologiczne z troponiną C i innymi białkami z tej grupy. Charakteryzuje je zdolność wysoce specyficznego wiązania wapnia, ze stałą wiązania około 10^5 — 10^7 M^{-1} oraz charakterystyczne zmiany konformacyjne pod wpływem jonów wapnia. Dzięki takim własnościom białka te mogą indukować w obecności jonów Ca^{2+} aktywność odpowiednich systemów enzymatycznych.

W niniejszym artykule omówiono podstawowe mechanizmy wiązania jonów wapnia. Scharakteryzowano właściwości strukturalne homologicznych białek wiążących wapń i omówiono właściwości najlepiej dotychczas poznanego przedstawiciela tej grupy — troponiny C.

II. Wiązanie wapnia przez białka

II-1. Mechanizm wiązania wapnia

Ogólnie proces wiązania wapnia przez białko można zapisać jako:



gdzie: k_{+1} — stała szybkości wiązania przez białko,

k_{+2} — stała szybkości zmiany konformacyjnej w cząsteczce białka po związaniu wapnia,

k_{-1} , k_{-2} — odpowiednie stałe szybkości reakcji odwrotnych.

Po związaniu wapnia cząsteczka białka może wykazywać szereg zmian konformacyjnych zachodzących z różnymi szybkościami. Ważna z punktu widzenia roli biologicznej białka jest stała równowagi wiązania kationu $K_a = k_{+1}/k_{-1}$. Wysoka stała wiązania jest konsekwencją wielokleszczowego (6—9 ligandów)¹ kompleksowania przez atomy tlenu grup karboksylowych i karbonylowych (3). Atomy azotu nie biorą na ogół udziału w wiązaniu wapnia, mogą natomiast brać udział w wiązaniu magnezu (4). Atomy tlenu działające koordynacyjnie pochodzą z anionowych grup takich jak fosforany lub reszty karboksylowe, albo z obojętnych elektrycznie grup karbonylowych wiązań peptydowych łańcucha głównego nie zablockowanych wiązaniem wodorowym. W białkach nie spotyka się sztywnych struktur gotowych do wiązania wapnia, jak to ma miejsce np. w przypadku wiązania żelaza lub magnezu przez szkielet porfirynewy. Grupy tworzące kompleks mają stosunkowo dużą swobodę rotacji, a odpowiednia struktura przestrzenna tworzy się w momencie wiązania kationu. Utworzenie takiej struktury wymaga unieruchomienia kationu na bardzo krótki okres czasu. Niezależnie od tworzącego się następnie chelatu w miejscu wiązania musi znajdować się grupa mogąca zadziałać jako jednowartościowe centrum wiązania o stosunkowo wysokiej energii. Energia wiązania tego centrum musi zrównoważyć energię hydratacji uwodnionego jonu wapniowego i utratę entropii konfiguracyjnej przez białko. Taką rolę mogą pełnić grupy karboksylowe kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz reszty fosforanowe.

II-2. Specyficzność wiązania wapnia

Miejsca wiązania wapnia w białku mogą być kompetycyjnie zajmowane również przez inne kationy. Najpoważniejszym konkurentem jest tu magnez, którego stężenie w komórce jest na ogół znacznie wyższe niż stężenie wapnia. Kompetycyjne blokowanie miejsc wiązania wapnia przez Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} w systemach biologicznych odgrywa znikomą rolę, ponieważ kationy te występują na ogół w ilościach śladowych.

Specyficzność wiązania wapnia w porównaniu z magnezem utrzymuje się dzięki charakterystycznym własnościom białka, jak również kationu Mg^{2+} . Układ najbardziej typowy dla wiązania magnezu, to atom azotu pierścienia imidazolowego histydyny w sąsiedztwie dwóch grup karboksylowych, w którym trzy cząsteczki wody są uzupełnieniem struktury kompleksu (4). Brak atomów azotu w miejscu wiązania kationów

¹ Ligandy to skoordynowane przez atom centralny jony lub grupy atomów ułożone w ściśle określonym porządku geometrycznym wokół znajdującego się w środku atomu centralnego. W opisywanych białkach ligandami są grupy karboksylowe i karbonylowe, które koordynują jon wapnia (lub magnezu). Encyklopedia Techniki, „Chemia”, WNT, 1965.

dwuwartościowych daje w rezultacie układ preferujący jony wapnia. Ponadto znacznie mniejszy promień jonowy kationu magnezu utrudnia kompleksowanie go przez ligandy białka. Większość organicznych odczynników kompleksujących wykazuje również znacznie niższą stałą wiązania magnezu niż wapnia.

Niskocząsteczkowe ligandy mogą dowolnie zmieniać położenie w celu ułatwienia interakcji z kationem. Natomiast w białku struktura przestrzenna decyduje o wzajemnym ułożeniu grup działających jako ligandy. Może się więc zdarzyć, że potrzebne do kompleksowania kationu odległości osiąmane są kosztem całkowitej energii fałdowania. Dlatego ligandy białka mogą reagować tylko z kationami o ściśle określonym promieniu jonowym. W tym leży możliwość wytwarzania przez białka skrajnie specyficznych interakcji z kationem.

III. Homologiczne białka wiążące wapń

III-1. Właściwości i struktura parwalbumin

Decydujące znaczenie dla rozwoju poglądów na budowę homologicznych białek specyficznie wiążących wapń miały badania własności i struktury parwalbumin. Są to niskocząsteczkowe (c.c.z. 12 000) białka mięśniowe rozpuszczalne w wodzie, o zdecydowanie kwaśnym charakterze. Przez wiele lat uważano, że parwalbuminy występują jedynie w mięśniach niższych kręgowców. Ostatnio zostały one znalezione również w mięśniach wyższych kręgowców, w tym ssaków (5). Rola biologiczna parwalbumin nie jest znana, a postulowane przez niektórych autorów pośrednictwo parwalbumin w transporcie jonów wapnia z sarkoplazmatycznego retikulum do miofibryli (6, 7) nie zostało jeszcze powszechnie zaakceptowane. Obecnie znamy wiele parwalbumin, wszystkie wykazują charakterystyczny skład aminokwasowy: wysoką zawartość kwasu glutaminowego i asparaginowego oraz niską zawartość tyrozyny, tryptofanu i proliny. Znamy już także sekwencję aminokwasową większości parwalbumin. Część cząsteczka parwalbuminy wiąże specyficznie dwa jony wapnia z wysoką stałą około 10^7 M^{-1} .

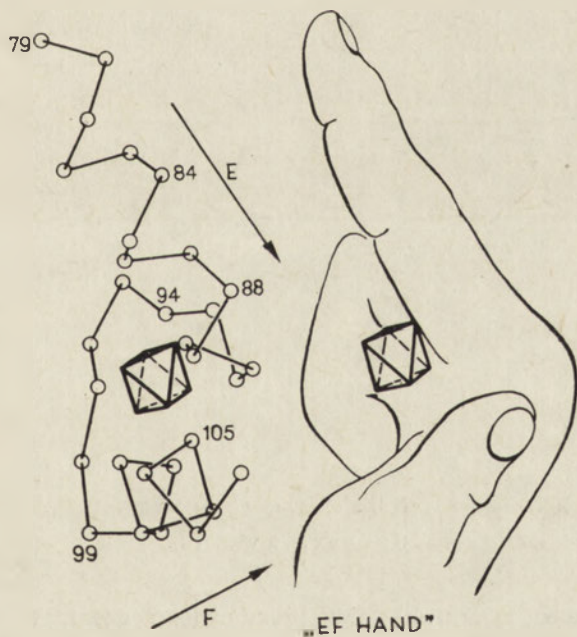
Na podstawie analizy rentgenograficznej wyznaczono strukturę przestrzenną jednej z parwalbumin karpia (8, 9). Białko to zawiera 6 odcinków α -spiralii oznaczonych przez autorów literami A-F. Jony wapnia są wiązane w pętlach usytuowanych pomiędzy odcinkami spiralnymi C i D oraz E i F. Pierwsza pętla pomiędzy odcinkami A i B jest niekompletna i nie wiąże wapnia. W każdej z pozostałych pętli sześć ligandów tworzy z jonami wapnia kompleks o strukturze oktaedrycznej, przy czym porządek ligandów jest jednakowy w obu pętlach. Pętla CD i EF są usytuowane symetrycznie względem przybliżonej osi dwukrotnej cząsteczki. We wszyst-

kich przypadkach z wyjątkiem karbonylowego atomu tlenu wiązania peptydowego w pętli CD oraz cząsteczki wody w pętli EF ligandami są atomy tlenu łańcuchów bocznych aminokwasów, głównie kwasu glutaminowego i asparaginowego.

W cząsteczce parwalbuminy występuje dobrze zaznaczony rdzeń hydrofobowy, a niezaangażowane w wiązanie wapnia hydrofilowe reszty kwasu asparaginowego, glutaminowego, treoniny i seryny znajdują się na powierzchni cząsteczki (8). Tak zbudowana cząsteczka powinna wykazywać wysoką trwałość w roztworach wodnych, jak również dość dużą swobodę zmian konformacyjnych. Istotnie, zarówno odporność na denaturację termiczną (temp. topn. 100°C) i denaturację mocznikiem, jak również charakterystyczne zmiany konformacyjne pod wpływem jonów wapnia obserwowało wielu autorów (10, 11).

III-2. Ewolucja homologicznych białek wiążących wapń

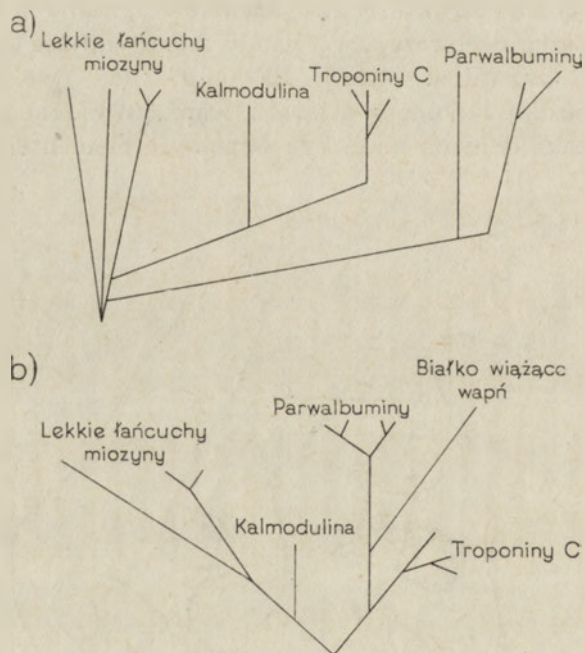
Charakterystyczną strukturą dwu odcinków spiralnych z zawartą pomiędzy nimi pętlą dostarczającą ligandy koordynujące jon wapniowy Kretsinger nazwał strukturą „EF-hand” (por. Ryc. 1) i uznał za integralną jednostkę — domenę wiążącą wapń. Wysunął również przypuszczenie, że taka domena może być wspólnym elementem wielu białek



Ryc. 1. Struktura przestrzenna EF domeny parwalbuminy karpia wg (9).

Numerami oznaczono kolejne reszty aminokwasowe. Usytuowanie odcinków α -spiral i pętli wiążącej wapń w domenie EF przypomina ułożenie palców prawej ręki.

wiązących wapń. Zaobserwowana wcześniej wewnętrzna homologia sekwencji wszystkich znanych parwalbumin, troponin C, kalmodulin, jak również lekkich łańcuchów miozyny pozwalała przypuszczać, że są one zbudowane w czterech (w przypadku troponin C, kalmodulin i lekkich łańcuchów miozyny) lub trzech (w przypadku parwalbumin) homologicznych domen wiążących wapń (12—14) (Tabela 1). Goodman i Pechere wysunęli hipotezę, że wszystkie homologiczne białka wiążące wapń powstały w czasie ewolucji z jednego wspólnego prekursora zawierającego około 40 aminokwasów, na drodze wielokrotnego powtórzenia genu, oraz określili przypuszczalną drogę na jakiej się to odbyło (15). „EF-hand” Kretsingera jest więc odpowiednikiem hipotetycznego prekursora. Według Pechere (16) stosunkowo wcześnie nastąpiło podwojenie, a następnie potrojenie pierwotnego genu, w wyniku czego powstały parwalbuminy. Przyłączenie kolejnej jednostki dało najwyżej zorganizowane białko, a więc lekki łańcuch miozyny, troponin C lub kalmodulinę (Ryc. 2A). Baker i wsp. (17) uważają, że ewolucyjnie bardzo wcześnie



Ryc. 2. Ewolucja homologicznych białek wiążących wapń.

A — wg Pechere (16), B — wg Barkera i wsp. (17).

nastąpiła dwukrotna duplikacja pierwotnego genu, w wyniku której powstały białka składające się z czterech domen wiążących wapń (Ryc. 2B). Parwalbuminy są więc raczej wynikiem regresji polegającej na utracie jednej domeny wiążącej wapń. Za takim mechanizmem prze-

mawia znaczne rozpowszechnienie kalmoduliny, którą wykryto nawet w bardzo prymitywnych organizmach (18).

III-3. Właściwości troponiny C

Najlepiej dotychczas poznanym przedstawicielem homologicznych białek wiążących wapń, jest wiążący wapń składnik troponiny (troponina C). Białko to wraz z pozostałymi składnikami troponiny, tj. troponiną I i troponiną T oraz tropomiozyną tworzy związany z cienkim filamentem system odpowiedzialny za regulację skurczu mięśni szkieletowych (19, 20). Troponina C jest białkiem globularnym, rozpuszczalnym w wodzie, o masie cząsteczkowej 18 000 i charakterystycznym składzie aminokwasowym z wysoką zawartością kwasu glutaminowego, fenyloalaniny i kwasu asparaginowego. Troponina C jest białkiem stosunkowo odpornym na działanie enzymów proteolitycznych i podwyższonej temperatury. Kilkuminutowa inkubacja w temp. 100°C nie wpływa na jego właściwości. Cząsteczka troponiny C mięśni szkieletowych królika zawiera 159 aminokwasów (12). Troponina C izolowana z różnych źródeł wykazuje nieznaczne różnice w sekwencji (21—23).

Troponina C wykazuje wysoką specyficzność w stosunku do jonów wapnia. Inne kationy, z wyjątkiem manganu, kadmu i strontu, są wiązane znacznie słabiej. Decydującym czynnikiem okazuje się promień jonowy kationu. Stosując metodę dializy równowagowej i analizując wyniki przy użyciu maszyny cyfrowej Potter i Gergely (24) wykazali, że cząsteczka troponiny C wiąże w nieobecności magnezu dwa jony wapnia z wysoką stałą $K_a = 2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ oraz dwa jony wapnia z niższą stałą $K_a = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Miejsca o wysokiej stałej mogą być kompetycyjnie zajmowane przez jony Mg^{2+} (tzw. miejsca wapniowo-magnezowe). Stała wiązania jonów Mg^{2+} jest jednak znacznie niższa i wynosi około 10^3 M^{-1} . Miejsca o niskim powinowactwie są specyficzne tylko wobec wapnia. Znalezione ponadto w cząsteczce troponiny C dwa miejsca specyficznie wiążące magnez. W obecności milimolowych stężeń magnezu (podobnych do stężeń magnezu występujących w żywym mięśniu) obniża się stała wiązania wapnia miejsc wapniowo-magnezowych, natomiast pozostaje bez zmian stała wiązania miejsc specyficznych wobec wapnia. W konsekwencji, w obecności magnezu i troponiny I wszystkie miejsca wiązania wapnia są równocenne. Zmiany pH w zakresie 5—8 nie powodują zmian stałej wiązania wapnia, co świadczy o zaangażowaniu grup karboksylowych w wiązaniach wapnia z wykluczeniem ewentualnego udziału grup imidazolowych histydyny.

Stosunkowo wcześniej zaobserwowano, że troponina C ulega znacznym zmianom konformacyjnym po związaniu wapnia. Przejawem takich zmian jest np. wzrost ruchliwości w obecności Ca^{2+} w elektroforezie w żelu po-

liakrylamidowym w obecności mocznika. Zachowanie to jest nietypowe, gdyż częściowe zobojętnienie ładunku ujemnego spowodowane przyłączeniem dodatniego kationu wapniowego powinno zmniejszyć szybkość migracji do dodatniej anody. Perry (25) tłumaczy to zjawisko zmianą kształtu cząsteczki na bardziej sferyczny i zmniejszeniem jej promienia. Wzrasta także współczynnik sedymentacji z 1,40S w nieobecności wapnia do 1,87S w obecności wapnia, co wskazuje również na zmniejszenie efektywnego promienia cząsteczki (26). Różny przebieg zmian polaryzacji fluorescencji tyrozynowej od temperatury w obecności i nieobecności Ca^{2+} wskazuje na usztywnienie cząsteczki po związaniu jonów Ca^{2+} (27). Z badań polaryzacji fluorescencji dansylowej pochodnej troponiny C określono kształt cząsteczki troponiny C jako sferyczny lub elipsoidalny o średnicy około 1,6 nm. Van Eerd i Kawasaka (28) po znakowaniu grup aminowych troponiny C przy pomocy chlorku dansylu obserwowali wzrost fluorescencji reszty dansylowej w zależności od stężenia wapnia w zakresie pCa 8—6. Kompleksy troponiny C z troponiną T oraz troponiny C z troponiną I, w których troponina T i troponina I były znakowane chlorkiem dansylu również wykazywały wzrost fluorescencji w zakresie pCa 6—5 świadczący o wzmożonej interakcji lub indukowaniu zmian konformacyjnych w ich cząsteczkach przez troponinę C. W obecności jonów magnezu nie obserwowano takiego efektu (28).

Dodatkowych informacji o ilościowych zmianach w strukturze drugorzędowej troponiny C dostarczyły pomiary dichroizmu kołowego (CD). Zawartość α -spirali w cząsteczce troponiny C wyliczona z widma CD wynosi w nieobecności Ca^{2+} około 30% i wzrasta do 50% po związaniu Ca^{2+} . Zawartość struktury β prawie nie zmienia się pod wpływem wapnia i wynosi 12—14% (29). Zmiany w widmie CD obserwowano w zakresie mikromolowych stężeń wapnia lub milimolowych stężeń magnezu (29, 30). Cząsteczka troponiny C mięśni szkieletowych królika zawiera w pozycji 10 i 109 dwie reszty tyrozynowe. Brak tryptofanu sprawia, że można obserwować widmo wewnętrznej fluorescencji charakterystyczne dla tyrozyny z maksimum emisji przy $\lambda = 305$ nm (długości fali wzbudzenia $\lambda = 280$ nm). Pod wpływem jonów wapnia następuje około półtorakrotny wzrost intensywności fluorescencji. Również jony magnezu (29) lub obniżone pH (31) wywołują niewielki wzrost fluorescencji. Zmniejszenie intensywności fluorescencji troponiny C pod wpływem Ca^{2+} interpretowano zwykle jako wynik zmiany otoczenia reszt tyrozynowych na mniej hydrofobowe. Leavis i Lehrer wysunęli ostatnio pogląd, że to zjawisko jest wynikiem tłumienia fluorescencji przez sąsiadujące z tyrozyną grupy karboksylowe (32).

Wszystkie omówione prace jednoznacznie wskazują na występowanie zmian w drugorzędowej strukturze troponiny C pod wpływem jonów Ca^{2+} . Dzięki wysokiej stałej wiązania zmiany te zachodzą w obecności mikromolowych stężeń Ca^{2+} . Ważną z biologicznego punktu widzenia jest

zdolność wtórnego indukowania zmian konformacyjnych w pozostałych składnikach troponiny.

III-4. Struktura troponiny C

Na podstawie podobieństwa sekwencji troponiny C i parwalbumin Kretsinger i Barry (33) wyznaczyli hipotetyczną strukturę przestrzenną troponiny C i parametry wszystkich atomów w cząsteczce tego białka. Model struktury troponiny C został oparty na następujących założeniach:

1. Cztery domeny wiążące wapń w cząsteczce troponiny C (I, II, III, IV) są homologiczne w stosunku do siebie i posiadają konformację zasadniczo identyczną z konformacją domeny EF parwalbumin (por. tabela 1).

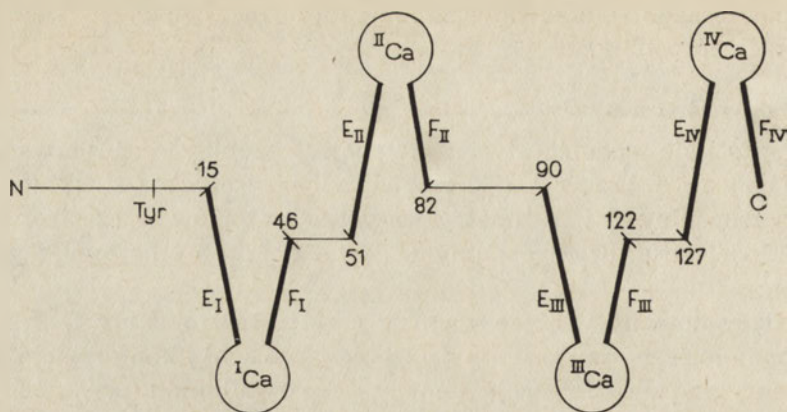
Tabela 1

Pierwszorzędowa struktura homologicznych białek wiążących wapń.
Porównanie sekwencji aminokwasowej w pętli wiążącej wapń

Białko	Domena	Sekwencja	Numery aminokwasów
Parwalbumina (mięśnie karpia)	AB	K A A D S F D H K A	19—28
	CD	D Q D K S G F I E E D E	51—62
	EF	D S D G D G K I G V D E	90—101
Troponina C (mięśnie szkieletowe królika)	I	D A D G G G D I S V K E	27—38
	II	D E D G S G T I D F E E	63—74
	III	D R N A D G Y I D A E E	103—114
	IV	D K N N D G R I D F D E	139—150
Kalmodulina (mózg cielęcy)	I	D K D G B G T I T T K E	20—31
	II	D A D G B G T I D F P E	56—67
	III	D K D G N G Y I S A A E	93—104
	IV	N I D G D G Z V B Y Z Z	129—140
Alkaliczny lekki łańcuch miozyny (mięśnie szkieletowe królika)	α	D R T G D S K I T L S Q	59—70
	β	D E Q M N A K I E F E Q	96—108
	γ	D K E D G T V G M G A E	136—147
	δ	Q E D S N G C I N Y E A	171—182
Białko wiążące wapń (śluzówka jelit świni)		D K N G D G E V S F E E	57—68

Wyróżniono aminokwasy, które dostarczają ligandów biorących udział w wiązaniu wapnia. Kolejne homologiczne domeny wiążące wapń oznaczono: w parwalbuminie AB, CD, EF, w troponinie C i kalmodulinie I, II, III, IV, a w alkalicznym lekkim łańcuchu miozyny α , β , γ , δ . Oznaczenia aminokwasów w kodzie jednoliterowym A—Ala, B—Asx, C—Cys, D—Asp, E—Glu, F—Phe, G—Gly, H—His, I—Ile, K—Lys, M—Met, N—Asn, P—Pro, Q—Gln, R—Arg, S—Ser, T—Thr, V—Val, Y—try, Z—Glx. Pętla w domenie AB ma 10 aminokwasów, w domenie β -13, a pętle pozostałych domen mają 12 aminokwasów.

2. Podobnie jak w parwalbuminach domeny tworzą pary symetrycznie ułożone względem przybliżonej osi dwukrotnej cząsteczki. Pary te utrzymują się głównie dzięki działaniu wiązań hydrofobowych łańcuchów bocznych tworzących odcinki spiralne (Ryc. 3).



Ryc. 3. Model struktury troponiny C oparty na homologii sekwencji do parwalbumin.

Ukośne grube linie (E_I , F_I , E_{II} , ...) reprezentują odcinki spiralne. Pętle I_{Ca} , II_{Ca} , III_{Ca} , IV_{Ca} — kolejne miejsca koordynacji jonów wapnia. Numerami oznaczono aminokwasy rozpoczynające i kończące kolejne domeny wiążące wapń.

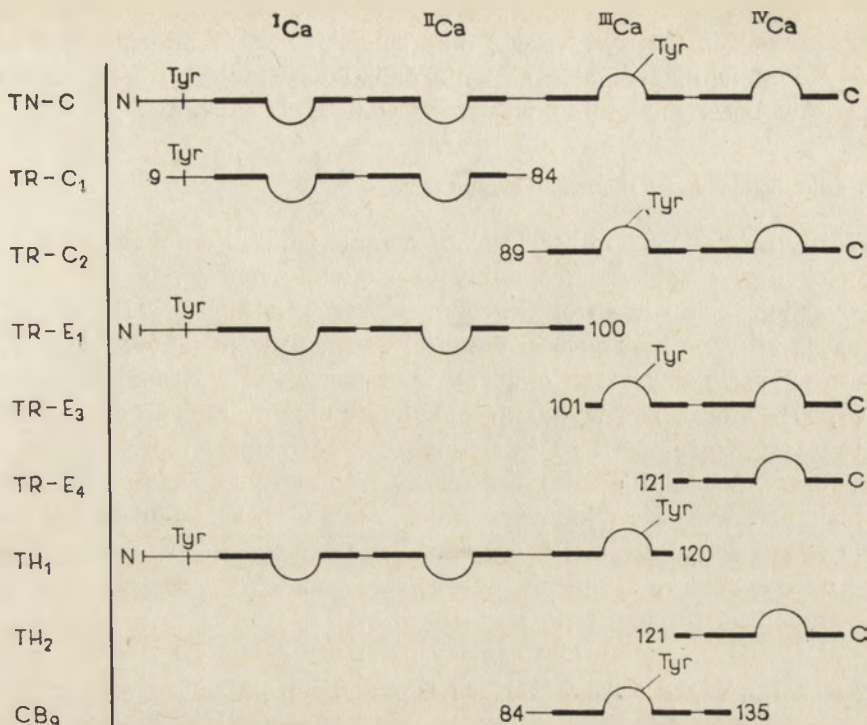
3. Domeny I i II oraz III i IV tworzą pary. Możliwości innych połączeń są znacznie mniej prawdopodobne i zostały wykluczone w wyniku dalszych obliczeń.

4. Dwie pary domen łączą się ze sobą w taki sposób, że ich wewnętrzne osie symetrii ustawione są przeciwnoległe. Takie ustawienie zapewnia maksymalny kontakt obu par domen poprzez reszty hydrofobowe.

Zarówno wyznaczona rentgenograficznie przestrzenna struktura parwalbumin jak i teoretyczny model cząsteczki troponiny C mają charakter statyczny, to znaczy nie uwzględniają obserwowanych zmian konformacyjnych.

III-5. Właściwości fragmentów troponiny C

Bliższe poznanie własności troponiny C, a w szczególności określenie specyficzności poszczególnych miejsc wiązania wapnia, scharakteryzowanie zmian konformacyjnych, rozpoznanie miejsc odpowiedzialnych za aktywność biologiczną, wreszcie zweryfikowanie teoretycznego modelu struktury przestrzennej podanego przez Kretsingera było możliwe dzięki badaniu fragmentów tego białka. Drabikowski i wsp. (34) działając na troponinę C trypsyną w obecności i nieobecności wapnia uzyskali peptydy zawierające odpowiednio I i II domenę wiążącą wapń (TR-C₁, reszty aminokwasowe 9—84), III i IV (peptyd TR-C₂, reszty 89—159) oraz pierwsze dwie domeny z fragmentem trzeciej (peptyd TR-E₁, reszty 1—100) i czwartą domenę z niekompletną trzecią (peptyd TR-E₃, reszty 101—159). Leavis i wsp. (35) w wyniku trawienia troponiny C trombiną uzyskali dwa fragmenty: TH₁ obejmujący domeny I, II, III (reszty aminokwasowe 1—120) i peptyd TH₂ zawierający jedynie czwartą domenę (reszty 121—159) (Rys. 4). Peptydy te, jak również dwa fragmenty otrzymane w wy-



Ryc. 4. Fragmenty troponiny C (TN-C) otrzymane w wyniku trawienia trypsyną w obecności wapnia (TR-C₁, TR-C₂) i nieobecności wapnia (TR-E₁, TR-E₃, TR-E₄), trombiną (TH₁, TH₂) oraz bromocyjanem (CB₉).

Numery oznaczają reszty aminokwasowe tych fragmentów. Grube linie reprezentują odcinki spiralne, a półkola miejsca koordynacji jonów wapnia (por. ryc. 3).

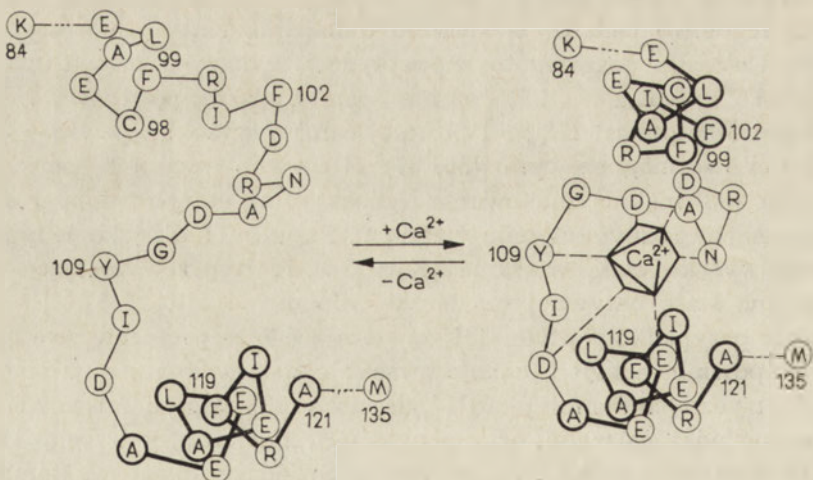
niku działania bromocyjanu: CB₈ (reszty 45—78) i CB₉ (reszty 83—135) były szczegółowo badane. W oparciu o badania zmian fluorescencji od stężenia Ca²⁺ dla poszczególnych peptydów wykazano przy współpracy z Leavis i wsp., że I_{Ca} i II_{Ca} są miejscami o niskim powinowactwie wobec wapnia, natomiast III_{Ca} i IV_{Ca} miejscami o wysokim powinowactwie, tzw. wapniowo-magnezowymi (36, 37). Niedawno wyniki te potwierdzili Sin i wsp. (38) metodą znakowania radioaktywną etanoloaminą troponiny C nasyconej w różnym stopniu wapniem. Peptyd TR-C₂ jako jedyny wykazywał wysoką stałą wiązania ($K_d = 2 \times 10^{-8}$) przewyższającą nawet analogiczną stałą natywnej cząsteczki troponiny C ($K_d = 5 \times 10^{-8}$), natomiast w przypadku peptydu TH₁ zawierającego teoretycznie dwa miejsca o niskim powinowactwie i jedno o wysokim, stała wyznaczona z pomiarów fluorymetrycznych dla miejsca III była niska (36). Peptyd TH₂ zawierający IV domenę wiążącą wapń, oraz peptyd CB₉ zawierający trzecią domenę, również wykazują niską stałą wiązania. Świadczy to, że wzajemne oddziaływania pomiędzy domenami III i IV są niezbędne do utrzymania właściwej struktury. Z drugiej strony, wystarczy pozabawienie peptydu

TR-C₂ odcinka spiralnego E_{III}, by spowodować znaczne obniżenie stałej wiązania wapnia (peptyd TR-E₃) (39). Sugeruje to, że oddziaływania pomiędzy domenami zachodzą głównie dzięki hydrofobowym własnościom łańcuchów bocznych aminokwasów w odcinkach spiralnych.

III-6. Lokalizacja zmian konformacyjnych

Ważnym osiągnięciem było zlokalizowanie zmian konformacyjnych zachodzących w cząsteczce troponiny C pod wpływem jonów Ca²⁺. Z pomiarów dichroizmu kołowego wynika, że zarówno peptyd TH₁, jak i TH₂ wykazują znaczne zmiany eliptyczności pod wpływem jonów Ca²⁺ świadczące o wzroście zawartości α -spirali w cząsteczce (37). Natomiast peptydy TR-C₁, TR-E₁ oraz TH₂ wykazują niewielkie zmiany eliptyczności. Świadczy to o tym, że rejon III i IV domeny wiążącej wapń odpowiedzialny jest za zaobserwowane dla całej cząsteczki troponiny C zmiany zawartości α -spirali pod wpływem jonów wapnia. Na g y i wsp. (40) badali spektralne własności peptydu CB₉ i wykazali, że odcinek E_{III} w tym peptydzie ulega odwracalnemu skręceniu w α -spirale pod wpływem wiązania jonu Ca²⁺ przez sąsiadującą pętlę III_{Ca} (Ryc. 5).

Niezależnie od zmian konformacyjnych w rejonie III domeny wiążącej wapń Levine i wsp. (41), jak również Seamon i wsp. (42) zbadali metodą jądrowego rezonansu magnetycznego (NMR) zmiany konformacyjne zachodzące w cząsteczce troponiny C. Badania te wskazują na serię zmian strukturalnych pod wpływem wiązania jonów Ca²⁺ z miejscami o wysokim powinowactwie włącznie z przegrupowaniem i uporządkowaniem szkieletu polipeptydowego. Wiązanie Ca²⁺ z miejscami o niskim powinowactwie wywołuje tylko nieznaczne zmiany konformacyjne w oto-



Ryc. 5. Zmiany strukturalne peptydu CB₉ po związaniu wapnia wg (40).

Numerzy oznaczają reszty aminokwasowe.

czeniu reszt hydrofobowych (reszty aminokwasowe waliny, leucyny, izoleucyny i fenyloalaniny). Jony magnezu powodują podobne lecz nieidentyczne zmiany w miejscach o wysokim powinowactwie, a nie wywołują ich w rejonach odpowiadających miejscom o niskim powinowactwie wobec wapnia (43).

Widmo NMR peptydu TR-C₁ sugeruje, że w nieobecności Ca²⁺ ma miejsce interakcja reszt hydrofobowych fenyloalaniny w pozycji 19, 23, 26 z resztami fenyloalaniny w pozycji 72 i 75 znajdującymi się w pętli II_{Ca} (44). Związanie jonów Ca²⁺ powoduje zniesienie tych oddziaływań bez zmiany zawartości α -spirali. Wiązanie wapnia wpływa więc destabilizująco na strukturę peptydu TR-C₁. Widmo NMR peptydu TR-C₂ wykazało natomiast wybitnie stabilizujący wpływ jonów Ca²⁺ na domeny III i IV. Prawdopodobnie jest to zasadnicza przyczyna różnic w stałych wiązania wapnia z miejscami I_{Ca} i II_{Ca} w porównaniu z miejscami III_{Ca} i IV_{Ca}. (Ryc. 3).

III-7. Aktywność biologiczna troponiny C

Podstawową, z biologicznego punktu widzenia, właściwością troponiny C jest zdolność wiązania składnika troponiny hamującego aktywność ATP-azy aktomiozynowej (troponiny I). Wyniki badania fragmentów troponiny C wskazują, że w jej cząsteczce dwa miejsca wiążą troponinę I, jedno znajduje się w odcinku 89—100 (III domena) i drugie dużo słabsze w rejonie II domeny (37, 39) (Ryc. 4). Również Weeks i Perry (45) badając peptydy troponiny C uzyskane w wyniku działania bromocyjanu zaobserwowali słabe wiązanie peptydu CB₉ z troponiną I wnioskując na tej podstawie o istnieniu miejsca wiązania troponiny I w rejonie III domeny wiążącej wapń.

Potter i Gergely (24) na podstawie analizy zależności aktywności ATP-azy aktomiozynowej od stężenia jonów wapnia doszli do wniosku, że regulującą rolę odgrywają miejsca charakteryzujące się niskim powinowactwem wobec wapnia, tj. I_{Ca} i II_{Ca}, podczas gdy miejsca wapnio-magnezowe o wysokim powinowactwie pełnią rolę strukturalną. Nasze wyniki (39, 46) uzyskane przy użyciu fragmentów troponiny C wykazały, że za znoszenie hamującego działania troponiny I na ATP-azę aktomiozynową, a więc za aktywność biologiczną troponiny C odpowiedzialny jest odcinek E_{III} (reszty aminokwasowe 89—100) niezależnie od tego, czy połączony jest z miejscami o wysokim (peptyd TR-C₂), czy niskim (peptyd TR-E₁) powinowactwie wobec wapnia.

III-8. Inne modele struktury troponiny C

Wszystkie wyniki uzyskane na podstawie badań fragmentów troponiny C potwierdzają proponowany przez Kretsingera i Barry'ego model cząsteczki troponiny C nie tylko pod względem rozmieszczenia elementów struktury drugorzędowej (odcinków spiralnych i pętli

wiązających wapń), lecz również pod względem przestrzennego rozmieszczenia poszczególnych domen z wytworzeniem par I—II oraz III—IV.

Wobec znacznych trudności związanych z wyznaczaniem struktury przestrzennej białek metodą analizy rentgenograficznej, w ostatnich latach coraz częściej stosuje się metody teoretyczne oparte na analizie struktury pierwszorzędowej białek. Wykazano bowiem, że istnieje ścisły związek pomiędzy sekwencją aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym a prawdopodobieństwem występowania określonej struktury drugorzędowej. Ptitsyn i wsp. (47) wyliczyli prawdopodobieństwo tworzenia α -spirali przez poszczególne aminokwasy w sekwencji troponiny C i uzyskali podobny rozkład odcinków spiralnych jak w modelu Kretsingera. Dokładniejsze rezultaty uzyskano ostatnio stosując metodę Garniera i wsp. (48), w której uwzględnia się wpływ na każdy aminokwas szesnastu sąsiednich aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym. W otrzymanym modelu cząsteczki troponiny C (49) nie stwierdzono obecności α -spirali w rejonie F_{II} . Również Ptitsyn obserwował obniżenie prawdopodobieństwa występowania α -spirali na tym odcinku. Być może model Kretsingera jest niepoprawny w tym miejscu. Jest również możliwe, że pomimo niskiego potencjału tworzenia α -spirali na tym odcinku taka spirala powstaje w natywnej cząsteczce dzięki stabilizacji przestrzennej spowodowanej oddziaływaniami z odległymi w łańcuchu polipeptydowym resztami aminokwasowymi.

Analizując szereg białek wiążących wapń Vogt i wsp. (50) wykazali, że miejsce w sekwencji odpowiadające pętli wiążącej wapń charakteryzuje się podwójnym maksimum prawdopodobieństwa występowania zwoju T. W cząsteczce troponiny C maksima te występują w miejscach przewidzianych omówionymi poprzednio metodami.

Wszystkie omówione metody teoretyczne dają w znacznym stopniu podobne modele cząsteczki troponiny C. Oprócz odcinka F_{II} wszystkie pozostałe odcinki spiralne znajdują się w tych samych miejscach z dokładnością 2—3 aminokwasów. Zarówno model Kretsingera jak i Ptitsyna nie pozwalał na rozróżnienie klas miejsc wiązania wapnia, podczas gdy analiza struktury troponiny C metodą Garniera umożliwiła dodatkowe pewne rozróżnienie pętli wiążących wapń. Pętłe III_{Ca} i IV_{Ca} mają lepiej zdefiniowaną strukturę złożoną z dwu zwojów T, podczas gdy w pętli I_{Ca} i II_{Ca} obserwuje się po jednym zwoju T. Może to być, obok wspomnianych poprzednio termodynamicznych efektów stabilizacji i destabilizacji struktury, przyczyną różnic w stałych wiązaniach jonów wapnia.

IV. Uwagi końcowe

Analizując strukturę, właściwości i mechanizm działania troponiny C, jako przedstawiciela grupy homologicznych białek wiążących wapń, należy pamiętać, że teoretycznie reprezentuje ona jedną z wielu możliwości wiązania jonów Ca^{2+} . Charakterystycznym elementem struktury tych

białek jest domena złożona z dwu odcinków α -spirali oraz pętli wiążącej wapń. Pozostaje otwarte zagadnienie czy ta stosunkowo złożona struktura domeny wiążącej wapń jest jedyną ewolucyjnie zachowaną i powieloną strukturą w białkach o różnorodnych aktywnościach biologicznych. W 1977 roku Kretsinger sugerował, że wszystkie białka wewnątrzkomórkowe wiążące jony wapnia w zakresie stężeń 10^{-7} — 10^{-5} M mają strukturę „EF hand”. (1). Dostępne obecnie informacje dotyczące struktury różnych białek wiążących wapń wydają się potwierdzać tę hipotezę.

Zaakceptowano do druku 21.12.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Kretsinger R. H., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H., i wsp., str. 63—72, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
2. Baryłko B., (1973), *Post. Bioch.*, **19**, 361—376.
3. Einspahr H., Brugg Ch. E., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 13—20, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
4. Williams R. J. P., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 3—12, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
5. Lehky P., Blum H. E., Stein E. A., Fischer E. H., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4332—4334.
6. Gerday Ch., Gillis J. M., (1976), *J. Physiol.*, **258**, 96P—97P.
7. Gillis J. M., Gerday Ch., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 193—196, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
8. Kretsinger R. H., Nockolds C. E., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 3313—3326.
9. Moews P. C., Kretsinger R. H., (1975), *J. Mol. Biol.*, **91**, 201—228.
10. Closed I., Gerday C., (1975), *Biochem., Biophys. Acta*, **405**, 228—235.
11. Donato H. J., Martin R. B., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4575—4579.
12. Collins J. H., Potter J. D., Horn M. J., Wilshire G., Jochman N., (1973), *FEBS Letters*, **36**, 268—272.
13. Collins J. H., (1976), *Nature*, **259**, 699—700.
14. Weeds A. G., McLachlan A. D., (1974), *Nature*, **252**, 646—649.
15. Goodman M., Pechere J. F., (1977), *J. Mol. Evol.*, **9**, 131—158.
16. Pechere J. F., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 213—221, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
17. Barker W. C., Ketcham L. K., Dayhoff M. O., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 73—75, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
18. Kuźnicki J., Kuźnicki L., Drabikowski W., (1979), *Cell. Biol. Inter. Rep.*, **3**, 17—23.
19. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1970), *Post. Bioch.*, **16**, 405—420.
20. Dąbrowska R., Drabikowski W., (1973), *Post. Bioch.*, **19**, 343—359.
21. Van Eerd J. P., Capony J. P., Pechere J. F., (1977), w Calcium Binding Proteins and Calcium Function, red. Wasserman R. H., str. 232—238, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
22. Van Eerd J. P., Takahashi K., (1975), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **64**, 122—127.
23. Van Eerd J. P., Takahashi K., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1171—1180.

24. Potter J. D., Gergely J., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4627—4633.
25. Winter M. R. C., Head J. F., Perry S. V., (1974) w *Calcium Binding Proteins*, red. Drabikowski W., Strzelecka-Gołaszewska H., Carafoli E., str. 109—128, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam i PWN, Warszawa.
26. Murray A. C., Kay C. M., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2622—2627.
27. Van Eerd J. P., Kawasaki Y., (1972), *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **47**, 859—865.
28. Van Eerd J. P., Kawasaki Y., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4972—4979.
29. Kawasaki Y., Van Eerd J. P., (1972), *Biochem. Biophys. Res Commun.*, **49**, 898—905.
30. McCubbin W. D., Kay C. M., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4228—4232.
31. Lehrer S. S., Leavis P. C., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 159—165.
32. Leavis P. C., Lehrer S. S., (1978), *Archives Biochim. Biophys.*, **187**, 243—251.
33. Kretsinger R. H., Barry C. D., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 40—52.
34. Drabikowski W., Grabarek Z., Baryłko B., (1977), *Biochem. Biophys. Acta*, **490**, 216—224.
35. Leavis P. C., Rosenfeld S., Lu R. C., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **535**, 281—286.
36. Leavis P. C., Drabikowski W., Rosenfeld S., Grabarek Z., Gergely J., (1977) w *Calcium Binding Proteins*, red. Wasserman R. H., str. 274—276, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.
37. Leavis P. C., Rosenfeld S. S., Gergely J., Grabarek Z., Drabikowski W., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5452—5459.
38. Sin J. L., Fernandes R., Mercola, (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1132—1139.
39. Grabarek Z., (1979), Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni Instytutu Biologii Dośw. PAN.
40. Nagy B., Potter J. D., Gergely J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5971—5974.
41. Levine B. A., Mercola D., Thornton J. M., Coffman D., (1977), *J. Mol. Biol.*, **115**, 743—760.
42. Seamon K. B., Hartshorne D. J., Bothner-By A. A., (1977), *Biochemistry*, **16**, 4039—4047.
43. Levine B. A., Thornton J. M., Fernandes R., Kelly C., Mercola D., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **535**, 11—24.
44. Evans J. S., Levine B. A., Leavis P. C., Gergely J., Grabarek Z., Drabikowski W., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, w druku.
45. Weeks R. A., Perry S. V., (1978), *Biochem. J.*, **173**, 449—457.
46. Grabarek Z., Drabikowski W., VIIth European Conference on Muscle and Motility, Warszawa, czerwiec 1979, str. 59.
47. Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V., Lim V. I., (1975) w *Proteins of Contractile Systems*, tom 31, red. Biro E. N. A., str. 145—160, Akademiai Kiado, Budapest.
48. Garnier J., Osguthorpe D. J., Robson B., (1978), *J. Mol. Biol.*, **120**, 97—120.
49. Kłoczewiak M., Grabarek Z., Drabikowski W., dane nie publikowane.
50. Vogt H. P., Strassburger W., Wollmer A., Fleischauer I., Bullard B., Mercola D., (1979), *J. Theor. Biol.*, **76**, 297—310.

DANUTA KOSK-KOSICKA *

Receptor acetylocholiny w mięśniu szkieletowym

Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle

Spis treści

Wstęp

- I. Struktura i działanie synapsy nerwowo-mięśniowej
 - II. Receptor acetylocholiny a aktywność esterazy acetylocholiny (E.C. 3.1.1.7.)
 - III. Izolowanie receptora acetylocholiny z sarkolemy mięśni szkieletowych
 - IV. Rola α -bungarotoksyny w badaniach właściwości receptora acetylocholiny
 - V. Właściwości wyizolowanego receptora acetylocholiny
 - VI. Modele oddziaływanie ligandów na receptor w błonie
 - VII. Właściwości receptora acetylocholiny *in vivo*; aspekty rozwojowe
 - VII-1. Tworzenie się synapsy nerwowo-mięśniowej
 - VII-2. Synaptyczne i pozasynaptyczne cząsteczki receptora acetylocholiny
 - VII-3. Synteza i rozpad receptora acetylocholiny
- Uwagi końcowe

Contents

Introduction

- I. Structure and function of the neuromuscular synapse
- II. Acetylcholine receptor and the acetylcholine esterase activity (E.C. 3.1.1.7)
- III. Isolation of acetylcholine receptor from skeletal muscle sarcolemma
- IV. Role of α -bungarotoxin in studies on acetylcholine receptor
- V. Properties of isolated acetylcholine receptor
- VI. Models of the interaction between ligands and the receptor in the membrane
- VII. Properties of acetylcholine receptor *in vivo*; developmental aspects
- VII-1. Neuromuscular junction formation

* Dr, Zakład Biochemii Układu Nerwowego i Mięśni, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Wykaz stosowanych skrótów: ACh — acetylocholina; AChE — esteraza acetylocholinowa (EC 3.1.1.7.); AChR — receptor acetylocholinowy; AChRs — receptor acetylocholinowy w synapsie; AChRp — receptor acetylocholinowy w błonie poza synapsą; α BT — α -bungarotoksyna; DEAE — grupa dwuetyloaminoetylowa; SDS — sól sodowa siarczanu dodecyłu.

VII-2. Synaptic and extrasynaptic acetylcholine receptor molecules**VII-3. Synthesis and degradation of acetylcholine molecules****Concluding remarks****Wstęp**

Skurcz mięśnia jest końcowym efektem szeregu reakcji wywołanych przez impuls nerwowy. Pobudzenie z nerwu przechodzi do włókna mięśniowego w specjalnym, wyodrębnionym obszarze zwanym płytką motoryczną lub synapsą nerwowo-mięśniową. Przeniesienie informacji z błony nerwowej na błonę mięśniową zachodzi poprzez wydzielenie neurotransmitera — acetylocholinę z zakończenia nerwowego do szczeliny synaptycznej i poprzez przyłączenie acetylocholinę do miejsc receptorowych w części postsynaptycznej. Cząsteczki receptora acetylocholinę, integralnego białka sarkolemy, pełnią co najmniej dwie funkcje: przyłączają acetylocholinę i następnie zmieniają przepuszczalność błony poprzez otwarcie kanału jonowego, który stanowi część efektorową receptora.

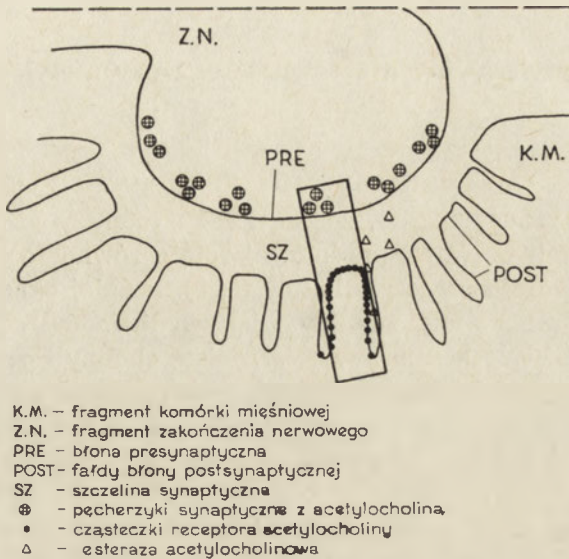
Celem artykułu jest omówienie właściwości receptora acetylocholinę z mięśnia szkieletowego. Badania z ostatnich lat dostarczyły wielu wiadomości na ten temat, przede wszystkim dzięki zastosowaniu α -toksyn z jadu węży. Szczególnie użyteczna jest α -bungarotoksyna, która wiąże się silnie i specyficznie z receptorem acetylocholinę (1). Część przedstawionych danych pochodzi także z badań receptora, który izolowano z komórek organu elektrycznego (elektrocytów) z *Torpedo sp.* i *Electrophorus sp.* Elektrocyty, które stanowią do 70% masy ciała tych ryb, są homologiczne z komórkami tkanki mięśniowej i charakteryzują się podobną wrażliwością na acetylocholinę; ze względu na małą zawartość białek kurczliwych, oraz bardzo dużą gęstość synaps są najbogatszym ze znanych źródeł receptora acetylocholinę (2).

I. Struktura i działanie synapsy nerwowo-mięśniowej

Włókno nerwu ruchowego, pozbawione w swej końcowej części osłonki mielinowej, rozgałęzia się dając zakończenia ułożone w płytkim zagłębieniu na powierzchni komórki mięśniowej. Błona komórkowa zakończenia nerwowego i błona komórkowa mięśnia wchodzi w skład struktury zwanej synapsą nerwowo-mięśniową. Na rycinie 1 przedstawiono schemat takiej synapsy.

Stosując technikę mikroskopii elektronowej wykazano, że błonę presynaptyczną tj. błonę zakończenia nerwowego oddziela od błony postsynaptycznej tj. błony komórki mięśniowej szczelina o szerokości 50 nm.

Wzdłuż zakończenia nerwowego rozmieszczone są co 1 μm skupiska pęcherzyków synaptycznych, z których każdy zawiera około 10 000 cząsteczek acetylocholíny. Błona postsynaptyczna tworzy wgłębienia, tzw. fałdy synaptyczne, zwiększające jej powierzchnię około sześciokrotnie. Na gór-



Ryc. 1. Schemat synapsy nerwowo-mięśniowej

nych brzegach fałd synaptycznych cząsteczek receptora acetylocholíny jest tak wiele, że wypełniają one całą powierzchnię zewnętrzną błony (3, 4).

Impuls elektryczny dochodzący do zakończenia nerwowego powoduje, że acetylocholina zmagazynowana w pęcherzykach synaptycznych uwalnia się do szczeliny synaptycznej i reaguje z receptorem znajdującym się w błonie postsynaptycznej. Wskutek przyłączenia acetylocholíny do receptora następuje otwarcie kanałów jonowych i swobodny przepływ jonów Na^+ , K^+ przez błonę komórkową mięśnia. Fala depolaryzacji przechodzi poprzez wpuklenia sarkolemmy tworzące system T do retikulum sarkoplazmatycznego i powoduje uwolnienie zmagazynowanych tam jonów Ca^{2+} . Stężenia wapnia w sarkoplazmie wzrasta do 10^{-6} – 10^{-5} M, co powoduje wyłączenie systemów blokujących interakcję aktyny z miozyna poprzez zmiany konformacyjne białek tropomiozyny i troponiny (5–7). W rezultacie zachodzi interakcja aktyny z miozyna, hydroliza ATP i skurcz mięśnia.

Po oddysocjowaniu acetylocholíny od receptora następuje ponowna polaryzacja błony i zamknięcie kanałów jonowych, a uwolniona acetylocholina zostaje rozłożona przez esterazę acetylocholinową. Bardzo duża szybkość wiązania acetylocholíny z receptorem w błonie postsynaptycznej,

jak również dysocjacji tego kompleksu i rozkładu acetylocholinę umożliwia powtarzanie transmisji nerwowo-mięśniowej do kilkuset razy w ciągu sekundy.

II. Receptor acetylocholinę a aktywność esterazy acetylocholinowej (EC 3.1.1.7)

Początkowo przypuszczano, że cząsteczka esterazy acetylocholinowej pełni w transmisji nerwowo-mięśniowej rolę zarówno receptora acetylocholinę, jak i hydrolazy acetylocholinę (8, 9). Później okazało się jednak, że zdolność wiązania acetylocholinę i innych ligandów cholinergicznę oraz hydrolizę acetylocholinę z wytworzeniem cholinę i octanu są właściwościami dwóch różnę, specyficznę białek. Obydwa białka udało się wyizolować i scharakteryzować (10—12). Ponieważ w błonie odnerwionę mięśni zaobserwowano dwustu a nawet trzystukrotnę wzrost liczby miejsc receptorowę na obszarze poza synapsą przy stałym lub nawet nieznacznie obniżonym poziomie aktywności esterazy acetylocholinowej przypuszcza się, że mechanizmy regulacji zawartości tych dwóch białek *in vivo* są różnę (13, 14).

Dane z ostatnich lat wskazują, że w przeciwieństwie do receptora, esteraza acetylocholinowa nie stanowi integralnę składnika błony plazmatycznę komórki mięśniowej. Prawdopodobnie jest to białko zasocjowane z błoną podstawną albo luźno ułożonymi włóknami kolagenu i mukopolisacharydami wypełniającymi szczelinę synaptyczną i wchodzącymi w fałdy synaptyczne (11, 15). Monomery esterazy acetylocholinowej mogą tworzyć agregaty przypominające kiście winogron (16). Enzym ten można uwolnić z błony stosując roztwory o wysokiej sile jonowej, np. 1 M KCl, lub poprzez trawienie kolagenazą (17, 18).

Cząsteczka receptora acetylocholinę składa się z kwaśnę białka i reszty cukrowę. Część hydrofobowa białka receptora wiąże się z dwumolekularną lipidową warstwą błony. Interakcja z α -bungarotoksyną, z syntetycznymi czwartorzędowymi związkami amonowymi i z przeciwciałami antyreceptorowymi sprzężonymi z ferrytyną wykazała dostępność cząsteczki receptora z zewnątrznej strony błony; nie wiadomo jednak, czy receptor „wystaje” także na stronie wewnętrznej (cytoplazmatycznę) (19). Część cukrowa występuje na zewnątrznej stronie błony. Całkowita zawartość cukrów wynosi 5⁰/₀ ciężaru cząsteczki. Najwięcej jest glukozaminy, galaktozy i mannozy (20).

III. Rola α -bungarotoksyny w badaniach właściwości receptora acetylocholinoliny

Wymieniona już wcześniej α -bungarotoksyna jest przykładem substancji, której zastosowanie pozwoliło na niezwykle szybki postęp badań właściwości receptora acetylocholinoliny, a pośrednio przyczyniło się także do rozwoju metod badawczych użytecznych w poznaniu innych receptorów błonowych. Jak wspomniano, działanie jej polega na bardzo silnym i specyficznym wiązaniu się z receptorem acetylocholinoliny (21). α -Bungarotoksyna, która jest białkiem zasadowym o masie cząsteczkowej 8 000 wiąże się kowalencyjnie z kwaśnym białkiem receptora. Po przyłączeniu α -bungarotoksyny receptor traci równocześnie zdolność przyłączania acetylocholinoliny i innych agonistów tj. substancji chemicznych o działaniu podobnym do acetylocholinoliny, których przyłączenie do receptora powoduje zmianę przepuszczalności sarkolemy dla jonów, bądź antagonistów, tj. substancji, których efekt działania jest przeciwny do acetylocholinoliny i ich przyłączenie blokuje transmisję nerwowo-mięśniową. Stopień utraty zdolności przyłączania agonistów i antagonistów jest proporcjonalny do ilości związanej toksyny. Z kolei przyłączenie do receptora substancji agonistycznych zmniejsza stopień wiązania dodawanej później [^{125}J] α -bungarotoksyny. Metodą autoradiografii wykazano też, że [^{125}J] α -bungarotoksyna gromadzi się w miejscach, gdzie w mięśniach normalnie rozwiniętych znajduje się płytka motoryczna. W mięśniach odnerwionych [^{125}J] wykrywano na całej powierzchni błony (patrz też dalej) (12, 22).

Dzięki swoim właściwościom, α -bungarotoksyna ma zastosowanie przy oczyszczaniu receptora acetylocholinoliny (chromatografia powinowactwa), wykrywaniu jego obecności, rozmieszczenia i gęstości (autoradiografia), badaniu właściwości wiązania ligandów. Np. oznaczając stopień, w jakim różne leki zmniejszają przyłączenie α -bungarotoksyny dodawanej do mieszaniny receptora i badanego leku można określić ich powinowactwo wobec receptora. Z doświadczeń takich wywnioskowano, że α -bungarotoksyna i niektóre niskocząsteczkowe ligandy cholinergiczne mają wspólne, zachodzące na siebie częściowo lub całkowicie miejsca, wiązania w cząsteczce receptora oraz, że miejsca te nie ulegają uszkodzeniu w procesie ekstrakowania i oczyszczania receptora z błony (20).

IV. Izolowanie receptora acetylocholinoliny z sarkolemy mięśni szkieletowych

Właściwości receptora powodują, że izolowanie go z błony wymaga zastosowania metod dość drastycznych, jak ekstrakcja rozpuszczalnikami organicznymi lub detergentami (10, 20). Do ekstrakcji stosuje się naj-

częściej roztwory dezoksycholanu lub Triton X-100; 1% roztwór Triton X-100 pozwala na uwolnienie receptora z hodowanych *in vitro* komórek mięśniowych (23). Oczyszczanie przeprowadza się metodą chromatografii powinowactwa stosując nośnik, najczęściej agarozowy, sprzężony z ligandem o wysokim powinowactwie wobec izolowanego białka (20). Początkowo stosowano jako ligand syntetyczne analogi acetylocholin, które przyłączają zarówno receptor acetylocholin, jak i esterazę acetylocholinową, a obydwie białka rozdzielano przez wymywanie z kolumny chromatograficznej roztworami soli o wzrastającym stężeniu. Obecnie stosuje się nośnik ze związaną α -bungarotoksyną.

Ekstrakt komórek mięśniowych, który otrzymuje się po zastosowaniu 1% roztworu Triton X-100 wytrząsa się z kompleksem agaroz- α -bungarotoksyna. Specyficzność i trwałość wiązania α -bungarotoksyny z receptorem acetylocholin pozwala na prowadzenie tej czynności przez kilkanaście godzin bez obawy, że tworzący się kompleks może ulegać rozpadowi. Długotrwałe wytrząsanie zapewnia wydzielenie z błony maksymalnej ilości receptora, który występuje w tkance mięśniowej w znikomych ilościach ($1,1 \times 10^{-2}$ mol/g mięśnia) (24). Kompleks agaroz-toksyna-receptor przemywa się buforowanymi roztworami detergentów usuwając w ten sposób zanieczyszczenia innymi składnikami komórkowymi.

Aby uwolnić receptor z kompleksu z α -bungarotoksyną stosuje się benzochininę, substancję antagonistyczną o dużym powinowactwie wobec receptora. Roztwór benzochininy przepływa przez układ zamknięty: agaroz-toksyna-receptor i kolumna z DEAE-celulozy. Ujemnie naładowany receptor zatrzymuje się na DEAE-celulozie, z której wymywa się go roztworem detergentu i 0,5 M NaCl. Cała ta skomplikowana procedura pozwala w ciągu 2 dni otrzymać oczyszczony, zagęszczony i jednorodny preparat receptora acetylocholin (25).

Dane doświadczalne pozwalają stwierdzić, że część receptorowa receptora acetylocholin, odpowiedzialna za wiązanie acetylocholin, wytrzymuje procedurę oczyszczania stosunkowo dobrze. Nie wiadomo natomiast, co dzieje się z częścią efektorową czyli kanałem jonowym. Nie można wykluczyć, że ulega on odłączeniu bądź denaturacji. Najprostszym sposobem sprawdzenia, czy izolowany receptor acetylocholin jest kompletny strukturalnie i funkcjonalnie byłoby wbudowanie wyizolowanego receptora do sztucznych błon lipidowych i doświadczalne wykazanie, że określone ligandy przyłączające się do miejsca receptorowego wywołują określoną zmianę przepuszczalności błony. Na razie nie udało się przeprowadzić takiej rekonstrukcji w sposób nie budzący zastrzeżeń (26—28).

W kilku przypadkach otrzymano z mięśni preparaty błon w formie pęcherzyków, w których 50% białka stanowiły cząsteczki receptora (22, 29). Niekiedy receptor był aktywny i można było wykazać *in vitro* indukowany substancją agonistyczną — karbamylcholiną wzrost przepuszczalności błony dla jonów sodu (30).

V. Właściwości wyizolowanego receptora acetylocholinyl

Z mięśni szkieletowych, jak wspomniano, można otrzymać jednorodne preparaty receptora acetylocholinyl, który podczas wirowania w gradiencie stężeń sacharozy wykazuje pojedynczy szczyt odpowiadający białku o stałej sedymentacji 9,5 S. Receptor izolowany z organu elektrycznego ryb elektrycznych po wirowaniu w gradiencie stężeń sacharozy wykazuje dodatkowy szczyt odpowiadający dimerowi (12, 22, 28). W obu przypadkach wszystkie monomery składają się z czterech łańcuchów polipeptydowych, zawierających cukry. Ciężary cząsteczkowe poszczególnych łańcuchów, jak wykazano stosując metodę elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, wynoszą ok. 38 000, 49 000, 57 000 i 64 000 (22, 28). Ciężar cząsteczkowy całej cząsteczki receptora określono jako $300\ 000 \pm 100\ 000$ (2, 20).

Funkcje poszczególnych łańcuchów nie są znane. Po dodaniu do receptora acetylocholinyl czwartorzędowej zasady amonowej stwierdzono jej wiązanie wyłącznie z łańcuchem o c.c.z. 38 000 co sugeruje, że tu właśnie znajduje się miejsce przyłączania agonistów do części receptorowej (28). Ponieważ w niektórych preparatach receptora z organu elektrycznego *Torpedo marmorata* przeważa łańcuch o c.c.z. 38 000 (29) rozważano możliwość, że pozostałe łańcuchy stanowią jedynie zanieczyszczenia. Stosując przeciwciała wykazano jednak, że wszystkie wymienione łańcuchy są składnikami rodzimego receptora; wszystkie przeciwciała otrzymane przeciwko każdemu z tych czterech łańcuchów oczyszczonego receptora reagują z receptorem *in vivo*. Reakcję przeciwciał można zahamować dodając odpowiedni łańcuch, który został użyty jako antygen (25).

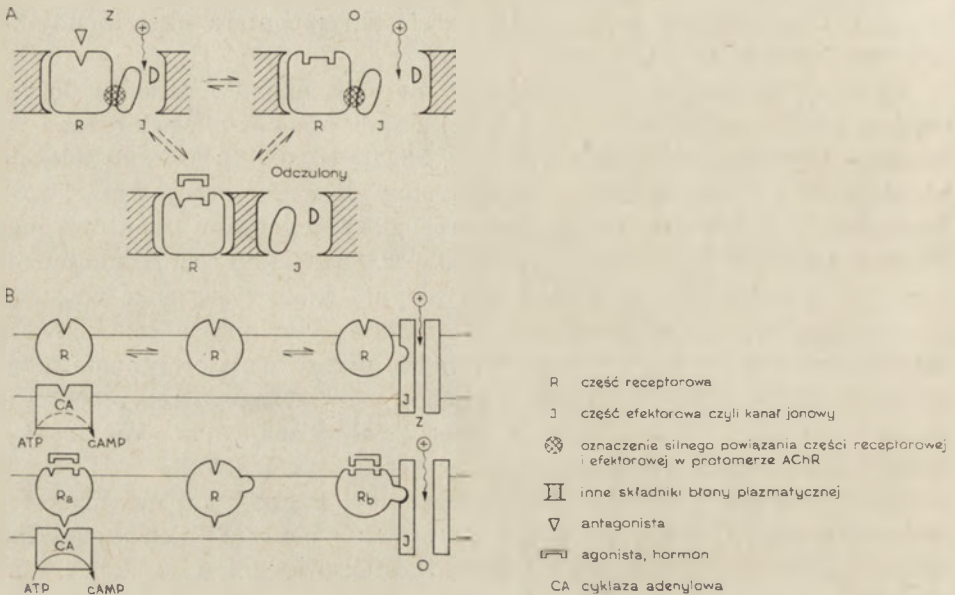
Stosując techniki negatywnego barwienia i mikroskopii elektronowej zaobserwowano, że receptor acetylocholinyl otrzymany z elektrocytów ma strukturę rozetki złożonej z 5—6 podjednostek o średnicy 20—25 Å, otaczających otwór o średnicy 15—20 Å (31—33).

VI. Modele oddziaływania ligandów na receptor w błonie

Mechanizm funkcjonowania receptora acetylocholinyl jako kompleksu podjednostek o co najmniej dwóch różnych zadaniach można rozpatrywać jako szczególny przykład bardziej ogólnego modelu oddziaływania różnych hormonów i neurotransmiterów na receptory w błonach. Przyłączenie agonisty do miejsca receptorowego powoduje zmianę konformacji białka, które reguluje albo działanie kanału jonowego, jak w przypadku receptora acetylocholinyl, albo aktywność cykazy nukleotydowej, lub działa na jeszcze inny efektor (34). Efektor może, ale nie musi wchodzić w skład cząsteczki receptora.

Zauważono, że krzywa sigmoidalna obrazująca zależność między stę-

zeniem ligandu dodawanego do receptora acetylocholin, a wywieranym przez niego efektem — takim jak np. zmiana przepuszczalności błony po dodaniu acetylocholin — przypomina wykres zależności szybkości reakcji od stężenia substratu, charakterystyczny dla niektórych enzymów, przypomina również krzywą obrazującą wiązanie tlenu przez hemoglobinę. Dla wyjaśnienia tej zależności — posługując się modelem Monoda, tłumaczącym działanie enzymów regulatorowych — zaproponowano model dwóch stanów receptora (35). Z danych elektrofizjologicznych wywnioskowano, że składnik(i) błony, w którym zachodzi transport jonów przez kanał istnieje w dwóch stanach konformacyjnych: otwartym (o) i zamkniętym (z) (34) (Ryc. 2A).



Ryc. 2. Modele opisujące działanie ligandów na cząsteczkę receptora w błonie.

Według Hollenberger M. D. w *Neurotransmitter Receptor Binding*, red. Yamamura H. J., Ehna S. J., Kuhar M. J., Raven Press, New York (34). Publikowane za zezwoleniem Wydawcy. A. Model dwóch stanów receptora (*Two-state model*): z — stan zamknięty; o — stan otwarty; B. Model receptora ruchomego (*Mobile receptor model*): CA — cyklaza adenylowa; R_a — część receptorowa, dla której efektem jest CA; R_b — część receptorowa, dla której efektem jest kanał jonowy.

Autorzy tego modelu uważają, że część receptorowa i efektorowa receptora acetylocholin tworzą „protomer”, który w normalnych warunkach może występować w dwóch stanach konformacyjnych różniących się powinowactwem wobec ligandów. W nieobecności ligandów ustala się równowaga pomiędzy „protomerami” znajdującymi się w stanie otwartym i zamkniętym, dla której $K = \frac{K_z}{K_o}$. Dodanie agonistów o dużo wyższym powinowactwie wobec formy „o” powoduje przesunięcie równowagi na korzyść „o” i otwarcie kanałów jonowych. Substancje antagonistyczne

ne — o większym powinowactwie wobec formy „z” — przesuwają równowagę na korzyść stanu „z”, co powoduje zamknięcie kanałów i w rezultacie zahamowanie transmisji nerwowo-mięśniowej. Na rycinie 2A pokazano też receptor w stanie „odwrażliwionym”, w którym protomer występuje w formie zdysocjowanej tak, że część receptorowa jest oddzielona od kanału jonowego przez jakiś inny składnik błonowy. Przyłączenie agonistów w tym stanie nie powoduje otwarcia kanału jonowego. Niektórzy autorzy (36) określają stan „odwrażliwienia” jako inaktywację receptora spowodowaną przez agonistę.

Changeux (37) i Karlín (38) rozszerzyli ten podstawowy model. Według nich poszczególne „protomery” nie działają niezależnie od siebie lecz są powiązane tak, że n „protomerów” musi przyjąć tę samą konfigurację, aby spowodować otwarcie lub zamknięcie kanałów jonowych.

Wymienione modele zakładają, że część receptorowa receptora acetylocholinowego przejawia różne powinowactwo wobec różnych ligandów — powinowactwo to może być jeszcze dodatkowo zmienione w stanie „odwrażliwienia”. Autorzy zakładają ścisłą zależność między częścią receptorową, a częścią jonoforową. Badając receptor acetylocholinowy wykazano, że zmiana przepuszczalności błony następuje w ciągu mikrosekund od chwili przyłączenia acetylocholinowego do receptora, a zamknięcie kanału jonowego już po upływie milisekund od oddysocjowania acetylocholinowego (39). Ta szybkość procesu świadczy o rzeczywiście ścisłym kontakcie między częścią receptorową i efektohem, w obrębie tej samej cząsteczki.

Na rycinie 2B przedstawiono nowszy, bardziej uniwersalny model tzw. receptora ruchomego. Autorzy tego modelu (40, 41) zakładają, że w nieobecności agonisty część receptorowa i kanał jonowy nie muszą być ściśle związane ze sobą. Dopiero po przyłączeniu agonisty zachodzi zmiana konformacyjna części receptorowej ($R \rightarrow R_b$) i jej związanie z częścią efektorową (J). W tym stanie (O) następuje otwarcie kanału jonowego (J). Liczba efektorów, z którymi może wiązać się kompleks agonista — część receptorowa nie jest tu ograniczona. Jak widać na rycinie 2B, również cyklaza adenylowa (CA) może być efektohem w przypadku tej samej cząsteczki (R), związanej z innym agonistą (Ra). Także cząsteczki receptorowe różnych neurotransmiterów mogą wiązać się z tym samym efektohem. Posługując się modelem receptora ruchomego łatwiej jest wytłumaczyć nadwrażliwość błony czyli zdolność do zmiany przepuszczalności przy zadziałaniu dużo niższej dawki acetylocholinowej niż normalnie — obserwowaną w mięśniach po odnerwieniu. Stan ten można uznać za spowodowany zmianą stosunku liczby części receptorowych i efektorowych receptora acetylocholinowego.

VII. Właściwości receptora acetylocholinu *in vivo*; aspekty rozwojowe

VII-1. Tworzenie się synapsy nerwowo-mięśniowej

Stwierdzono, że pojawienie się w sarkolemie nowych miejsc receptorowych acetylocholinu jest wynikiem syntezy receptora acetylocholinu (42). W okresie fuzji mioblastów zaobserwowano stokrotny wzrost liczby cząsteczek receptora acetylocholinu — mierzony ilością [¹²⁵J] α -bungarotoksy wiążącej się z receptorem (43). Fuzja mioblastów nie jest jednak warunkiem koniecznym ujawnienia receptora na powierzchni błony, albowiem mioblasty, które osiągnęły pewien stan rozwoju wykazują wrażliwość na acetylocholinę oraz zwiększoną zdolność wiązania α -bungarotoksyny nawet w przypadku, gdy spowodowano zahamowanie ich fuzji (44).

Embrionalne komórki mięśniowe wykazują wrażliwość na acetylocholinę na całej powierzchni swojej błony. Pod wpływem unerwienia i w miarę dojrzewania komórek wrażliwość ta ogranicza się do obszaru synapsy nerwowo-mięśniowej a pozasynaptyczna wrażliwość zanika (45). Płytką nerwowo-mięśniową rozwija się powoli, np. u szczura jest ona ostatecznie uformowana dopiero w pierwszych tygodniach po urodzeniu się zwierzęcia (46, 47). W prawidłowych komórkach mięśni zwierząt dorosłych wrażliwość na acetylocholinę wykrywa się prawie wyłącznie w synapsie, która zajmuje bardzo małą część powierzchni komórki. Np., w mięśniu trójgłowym ramienia synapsa zajmuje tylko $0,001 \pm 0,01\%$ powierzchni błony komórkowej (3).

Po odnerwieniu dorosłych mięśni sytuacja staje się podobna jak w mięśniach embrionalnych; cała powierzchnia błony wykazuje wrażliwość na acetylocholinę i zdolność wiązania neurotoksyny. Liczba cząsteczek receptora może wzrosnąć wielokrotnie w ciągu kilku dni po odnerwieniu mięśni (14, 48). Stwierdzono, że gęstość cząsteczek receptora poza synapsą (100—635 miejsc wiążących toksynę/ $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni) (14, 49) nigdy nie osiąga gęstości cząsteczek receptora w synapsie. W synapsie jest średnio 8 000—9 000 miejsc wiążących toksynę/ $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni — przy czym największa gęstość na szczycie fałd synaptycznych wynosi $30\,000 \pm 6\,000$ miejsc wiążących toksynę/ $1 \mu\text{m}^2$ powierzchni (50).

Zaobserwowano, że po ponownym unerwieniu odnerwionego uprzednio włókna mięśniowego synapsa zostaje odtworzona na dawnym miejscu, a pozasynaptyczna wrażliwość na acetylocholinę zanika — podobnie jak odbywa się to w normalnym rozwoju ontogenetycznym (51).

Rolę unerwienia w przemieszczeniu receptora z obszaru całej powierzchni błony komórkowej mięśni do synapsy sugerują wyniki doświadczenia, w którym odnerwiony mięsień drażniono bodźcem elektrycznym; obserwowano wtedy zanik pozasynaptycznej wrażliwości na acetylocholinę (52).

W hodowlach mieszanych komórek nerwowych i mięśniowych nie-

które neurony tworzą synapsy na pobliskich miotubach, a właściwości elektrofizjologiczne tych połączeń są identyczne z obserwowanymi w synapsach mięśni zarodkowych, a także dorosłych ponownie unerwionych (po uprzednim odnerwieniu). Cechą charakterystyczną hodowli jest synchroniczność rozwoju. W niektórych środowiskach fuzja komórek jednojądrowych zaczyna się i kończy w przeciągu 48 godzin, co daje możliwość stwierdzenia, że receptor acetylocholinowy i pobudliwość elektrofizjologiczna charakterystyczna dla komórek zwierząt dorosłych pojawiają się podczas miogenezy bardzo wcześnie (44, 53).

Unerwienie włókna mięśniowego powoduje co najmniej dwa różne i niezależne od siebie zjawiska wiążące się z metabolizmem receptora.

Pierwsze to sto- do tysiąckrotne zmniejszenie się liczby cząsteczek receptora na obszarze błony, które obserwuje się m.in. po fuzji komórek, gdy w miotubach zaczynają kształtować się synapsy (54). Przypuszczano, że jest to spowodowane zwiększoną szybkością rozpadu receptora pozasynaptycznego (55). Stwierdzono jednak doświadczalnie, że czas rozkładu kompleksu [^{125}J] α -bungarotoksyna-receptor pozasynaptyczny nie jest wcale krótszy, a przeciwnie jest nawet nieco dłuższy niż czas rozpadu kompleksu [^{125}J] α -bungarotoksyny z receptorem w synapsie (50). Zmniejszenie ilości receptora występującego na obszarze poza synapsą jest więc wynikiem zahamowania jego syntezy. Wydaje się, że zapoczątkowanie elektrycznej i mechanicznej aktywności mięśnia powoduje zahamowanie syntezy receptora pozasynaptycznego. Część cząsteczek receptora, która z obszaru całej błony przedyfundowała do synapsy zostaje tam unieruchomiona, natomiast szybkość rozpadu pozostałego receptora pozasynaptycznego utrzymuje się na zwykłym lub nieco obniżonym poziomie. Nie jest znana natura chemiczna sygnału powodującego zahamowanie syntezy receptora pozasynaptycznego. Rozważa się udział jonów Ca^{2+} (56) lub cyklicznych nukleotydów (57).

Drugie zjawisko, które obserwuje się po unerwieniu mięśnia to stabilizacja cząsteczek receptora w synapsie. Zmieniają się cechy receptora, takie jak ruchliwość (współczynnik dyfuzji w płaszczyźnie bocznej $5 \times 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{sek}$) i trwałość. Po unerwieniu mięśnia receptor staje się nieruchomy i bardziej trwały (patrz też VII-2). Być może, wrastający nerw dostarcza do synapsy „substancję troficzną”, która albo modyfikuje cząsteczki receptora, albo też bierze bezpośredni udział w wiązaniu cząsteczek receptora w synapsie. Substancją taką mógłby być neurotransmitter, ATP lub produkty jego rozpadu, enzymy lub hormony polipeptydowe (58).

Changéux i wsp. (50) uważają, że receptor acetylocholinowy występuje w dwóch formach: labilnej i dyfundującej oraz unieruchomionej i odpornej na degradację. Z organu elektrycznego *Torpedo marmorata* udało się wyizolować dwie formy receptora o podobnych właściwościach, różniące się jedynie ładunkiem elektrycznym; przeprowadzono przekształcenie jednej formy w drugą w obecności odpowiednio NaCl i NaF (59).

Według wspomnianych autorów forma unieruchomiona powstaje z formy dyfundującej w wyniku nieodwracalnej reakcji stabilizacji, pod wpływem nieznanego czynnika uwalnianego przez zakończenie nerwowe (59).

VII-2. Synaptyczne i pozasynaptyczne cząsteczki receptora acetylocholin

Cząsteczki receptora, synaptyczna (AChRs) i pozasynaptyczna (AChRp), wykazują pewne różnice. Przede wszystkim, jak wspomniano w rozdziale VII-1, różnią się one trwałością. Porównano znikanie znakowanej [¹²⁵J] α-bungarotoksyny związanej z receptorem na obszarze synapsy i poza nią (60). Z badań tych — prowadzonych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* na mięśniu przepony szczurów nowonarodzonych i dorosłych na mięśniach normalnych i odnerwionych wynika, że przemiana (*turnover*) receptora pozasynaptycznego jest zdecydowanie szybsza niż przemiana receptora w synapsie. Odpowiednie dane liczbowe wynoszą: $t_{1/2}$ AChRp = 8—19 godzin i $t_{1/2}$ AChRs = 5—8 dni (60). Stosując [³⁵S] metioninę jako wskaźnik syntezy białek udało się wykazać jej włączanie do pozasynaptycznych cząsteczek receptora w mięśniu przepony szczura po odnerwieniu (61). Brak jest danych o wbudowywaniu [³⁵S] metioniny do cząsteczek receptora w synapsie.

Kolejna różnica uwidoczniła się w badaniach powinowactwa cząsteczek receptora acetylocholin wobec agonistów cholinergicznym. Stan „odwrażliwienia” jest łatwiej osiągalny przez receptor na obszarach błony poza synapsą (62). Także powinowactwo cząsteczek receptora synaptycznych i pozasynaptycznych wobec antagonistów — jak zauważono na przykładzie przyłączania kurrary i d-tubokurraryny — jest nieco odmienne (63).

Cząsteczki receptora w synapsie i poza synapsą różnią się też pewnymi właściwościami fizykochemicznymi, np. stosując metodę elektroogniskowania wykazano, że w pierwszych białko jest bardziej kwaśne niż w drugich (64).

Badając receptor acetylocholin w mięśniach patologicznych zaobserwowano, że w przypadku choroby mięśni Myastenia Gravis (Miastenia rzekomo porażna) wiązanie [¹²⁵J] α-bungarotoksyny jest trzy do ośmiokrotnie niższe niż w mięśniach normalnych (65). Stwierdzono, że w surowicy chorych obecne są specyficzne immunoglobuliny, które blokują przestrzennie część receptora acetylocholin i powodują zmianę liczby miejsc wiążących α-bungarotoksynę, pozostając bez wpływu na ich powinowactwo z toksyną. Wspomniane immunoglobuliny rozróżniają receptory synaptyczne i pozasynaptyczne, co potwierdza istnienie różnic strukturalnych i konformacyjnych między tymi dwiema populacjami cząsteczek receptora.

Nie udało się jeszcze stwierdzić, czy synaptyczne i pozasynaptyczne cząsteczki receptora są produktami różnych genów. Za takim wyjaśnieniem przemawiają wyniki badań syntezy receptora (63), ale nie uwzględnia ono faktu obecności cząsteczek receptora, które w wyniku unerwienia mięśnia przemieszczają się z obszaru całej błony do synapsy. Niewykluczone, że obserwowane różnice we właściwościach receptora acetylocholino- w synapsie i poza nią wynikają z różnic we wzajemnym oddziały- waniu cząsteczek receptora i sąsiadujących z nim składników błony. Pod uwagę brano ściśle powiązanie między sobą cząsteczek receptora w synap- sie, powiązanie receptora z błoną podstawną na powierzchni zewnętrznej lub cytoskeletonem na powierzchni wewnętrznej sarkolemy. Pewne dane sugerują, że przemiana receptora pozasynaptycznego w receptor sy- naptyczny, może zachodzić w wyniku modyfikacji kowalencyjnej. W eks- traktach elektrocytów znaleziono kinazę białkową i fosfatazę fosfobiał- kową, a w obecności [³²P]ATP obserwowano fosforylację jednego z łań- cuchów cząsteczki receptora. Możliwe, że procesy fosforylacji i defosfory- lacji odgrywają rolę we wzajemnych przemianach synaptycznych i po- zasynaptycznych cząsteczek receptora acetylocholino- (63).

Podobieństwo we właściwościach pozasynaptycznego receptora acety- locholino- w mięśniach rozwijających się i odnerwionych sugeruje, że róż- nice pomiędzy receptorem synaptycznym i pozasynaptycznym mogą być istotne dla rozwoju mięśnia. Niewykluczone, że pozasynaptyczne czą- steczki receptora są prekursorami cząsteczek synaptycznych (59, 66).

VII-3. Synteza i rozpad receptora acetylocholino-

Mimo że białka należą do składników stale syntetyzowanych i roz- kładanych w komórce, ciągle wiemy niezbyt wiele o mechanizmach re- gulujących szybkość tych procesów w poszczególnych przypadkach. Re- ceptor acetylocholino- jest właściwie jedynym białkiem błony komórkowej mięśni, dla którego możliwe było przebadanie tego procesu dzięki obser- wacji losów znakowanej α -bungarotoksyny przyłączonej do receptora (3).

Syntetyzowane podjednostki receptora szybko gromadzą się tworząc jednostki receptorowe przypominające te, które funkcjonują już w błonie postsynaptycznej komórki mięśniowej. Nowoutworzone jednostki recep- torowe przedostają się poprzez system błon wewnątrzkomórkowych do cy- toplazmy komórki mięśniowej i przebywając tu 2—3 godzin stanowią „pule prekursora”. Następnie w procesie wymagającym dostarczenia energii cząsteczki receptora są przenoszone do błony plazmatycznej. Do- dając cykloheksimid do hodowli tkankowej stwierdzono, że po 3 godzi- nach liczba miejsc wiążących α -bungarotoksynę wewnątrz komórki zmniejszała się o 30⁰%. W tym czasie równoważna ilość miejsc wiążących α -bungarotaksynę pojawiała się na powierzchni błony plazmatycznej ko-

mórki mięśniowej. Prawdopodobnie wewnątrz komórki znajduje się już wstępnie uformowana błona i włączanie jej w sarkolemmę odbywa się w drodze egzocytozy (3, 67).

Rozpad receptora jest procesem wymagającym energii. Cząsteczki receptora są usuwane z błony i przenoszone do lizosomów, gdzie odbywa się ich rozkład proteolityczny.

Uwagi końcowe

Obszar błony komórkowej mięśnia, wchodzący w skład synapsy wyróżnia się specjalną strukturą i funkcją. Silnie pofałdowana sarkolemma, zawierająca bardzo wiele cząsteczek receptora, jest tu względnie stabilna i sztywna.

Synteza receptora acetylocholinyl jest regulowana w czasie rozwoju mięśnia. Rozmieszczone na całym obszarze błony cząsteczki receptora stopniowo, w miarę rozwoju mięśnia, skupiają się w jej części postsynaptycznej.

W układzie nerwowym zwierząt stwierdzono występowanie dwu rodzajów receptorów: nikotynowych i muskarynowych. Receptory nikotynowe są stymulowane przez nikotynę i blokowane przez kurrarę w przeciwieństwie do występujących tylko w ośrodkowym układzie nerwowym receptorów muskarynowych stymulowanych przez muskarynę i hamowanych przez atropinę. Receptor acetylocholinyl występujący w komórkach mięśniowych i elektrocytach należy do grupy receptorów nikotynowych. W ostatnich latach stwierdzono obecność receptora nikotynowego także w mózgu.

Z różnych danych — częściowo przedstawionych w niniejszym artykule — wynika, że omawiany receptor acetylocholinyl można rozpatrywać jako szczególny przypadek receptora błonowego. Na przykładzie modelu receptora ruchomego, zgodnie z którym liczba współdziałających ze sobą receptorów i efektorów może ulegać zmianom wykazano, że mechanizm wiązania ligandów z receptorem acetylocholinyl jest podobny do mechanizmu oddziaływania różnych neurotransmiterów i hormonów z receptorami w błonach biologicznych. Ogólny schemat zakłada zmianę konformacji białka receptora wskutek przyłączenia lub odłączenia wspomnianych ligandów. W efekcie tych zmian następuje przeniesienie przez błonę odpowiedniej informacji do komórki. W przypadku omawianego receptora acetylocholinyl informacją dla komórki jest zmiana przepuszczalności błony dla jonów, a efektem informacji otrzymanej przez komórkę mięśniową z komórki nerwowej jest skurcz mięśnia.

Znaczenie wyników badań receptora acetylocholinyl jest więc ogromne także dlatego, że jest to pierwszy wyizolowany i oczyszczony receptor błonowy. Na jego przykładzie poznaje się różnego rodzaju zależności

strukturalne i funkcjonalne w synapsie a także rolę receptorów w synaptogenezie.

Nie sposób w jednym artykule omówić wszystkie problemy dotyczące receptora acetylocholiny; o aspektach budowy i działania synapsy nerwo-mięśniowej i receptora acetylocholiny przeczytać można również w artykułach Fambrougha i innych autorów (49, 68—77).

Zaakceptowano do druku 21.12.1979

PIŚMIENNICTWO

1. Lee C. Y., Chang C. C., (1966), *Mem. Inst. Butantan Symp. Internat.*, **33**, 555—572.
2. Potter L. T., (1974), w *Neurochemistry of Cholinergic Receptors*, red. De Robertis E., Schacht J., str. 31—35; Raven Press, New York.
3. Fambrough D. M., (1974), w *Neurochemistry of Cholinergic Receptors*, red. De Robertis E., Schacht J., str. 85—113; Raven Press, New York.
4. Porter C., Barnard E., (1975), *J. Membr. Biol.*, **20**, 31—49.
5. Ebashi S., Endo M., (1968), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 123—183.
6. Hasselbach W., (1964), *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **14**, 167—222.
7. Endo M., (1977), *Physiol. Rev.*, **57**, 71—108.
8. Snyder S. H., (1978), w *Neurotransmitter Receptor Binding*, red. Yamamura H. J., Ehna S. J., Kuhar M. J., str. 1—13; Raven Press, New York.
9. Župancić A. O., (1969), *Life Sci.*, **8**, 989—993.
10. Miledi R., Molinoff P., Potter L. T., (1971), *Nature*, **229**, 547—557.
11. Hall Z. W., Kelly R. B., (1971), *Nature*, **232**, 62—63.
12. Raftery M. A., Vandlen R. L., Reed K. L., Lee R., (1976), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 193—202.
13. Miledi R., Potter L. T., (1971), *Nature*, **233**, 599—603.
14. Hartzell H. G., Fambrough D. M., (1972), *J. Gen. Physiol.*, **60**, 248—262.
15. Molinoff P. B., Potter L. T., (1972), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **6**, 111—134.
16. Cartaud J., Bou S., Massoulie J., (1978), *J. Cell. Biol.*, **77**, 315—321.
17. Rieger F., Bon S., Massoulie J., Cartaud J., Picard B., Benda P., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **58**, 513—521.
18. Lwebuga-Mukasa J. S., Lappe S., Taylor P., (1976), *Biochemistry*, **15**, 1425—1434.
19. Karlin A., (1977), w *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies* red. Rowland L. P., str. 73—85; Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford.
20. Raftery M. A., Schmidt J., Vandlen R., Moody T., (1974), w *Neurochemistry of Cholinergic Receptors*, red. De Robertis E., Schacht J., str. 5—18; Raven Press, New York.
21. Burt D. R., (1978), w *Neurotransmitter Receptor Binding*, red. Yamamura H. J., Ehna S. J., Kuhar M. J., str. 41—57; Raven Press, New York.
22. Changeux J. P., Benedetti L., Bourgeois J. P., Brissan A., Cartaud J., Devaux P., Grunhagen H., Moreau M., Popot J. L., Sobel A., Weber M., (1976), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 211—230.
23. Devreotes P. N., Fambrough D. M., (1975), *J. Cell. Biol.*, **65**, 335—358.
24. Lindstrom J. M., (1977), *J. Clin. Immunol. Immunopathol.*, **7**, 36—43.

25. Lindstrom J. M., (1978), w Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. J., Ehna S. J., Kuhar M. J., str. 91—109; Raven Press, New York.
26. Michaelson D., Raftery M. A., (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 4768—4772.
27. Eldefrawi M. E., Eldefrawi A. T., Shamoo A. E., (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **264**, 183—202.
28. Karlin A., Weill C. L., McNamee M. G., Valderama R., (1976), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 203—210.
29. Sobel A., Weber M., Changeux J. B., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **80**, 215—222.
30. Kasai M., Changeux J. P., (1971), *J. Membr. Biol.*, **6**, 1—23.
31. Cartaud J., Benedetti L., Cohen J. B., Meumier J. C., Changeux J. P., (1973), *FEBS Letters*, **33**, 109—113.
32. Nickel E., Potter L. T., (1973), *Brain Res.*, **57**, 508—517.
33. Raftery M. A., Bode J., Vandlen R., Chao Y., Deutsch J., Duguid J. R., Reed K., Moody T., (1974), *Biochemistry of Sensory Functions*, str. 541—564; Springer-Verlag, New York.
34. Hollenberg M. D., (1978), w Neurotransmitter Receptor Binding, red. Yamamura H. J., Ehna S. J., Kuhar M. J., str. 13—37; Raven Press, New York.
35. Monod J., Wyman J., Changeux J. P., (1965), *J. Mol. Biol.*, **12**, 88—118.
36. Alman R. R., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 553—559.
37. Changeux J. P., Blumenthal R., Kasai M., Podleski T., (1970), *Molecular Properties of Drug Receptors*, str. 197—214; Porter R., O'Connor M., Churchill, London.
38. Karlin A., (1967), *J. Theoret. Biol.*, **16**, 306—308.
39. Katz B., Miledi R., (1972), *J. Physiol.*, **224**, 665—699.
40. Cuatrecasas P., Hollenberg M. D., (1976), *Adv. Protein Chem.*, **30**, 251—451.
41. De Haën C., (1976), *J. Theoret. Biol.*, **58**, 383—400.
42. Merlie J. P., Sobel A., Changeux J. P., Gros F., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 4028—4032.
43. Whalen R. G., Buckingham M. E., Goto S., Merlie J. P., Gros F., (1977), w Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. Rowland L. P., str. 433—450; Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford.
44. Fambrough D., Rash J. E., (1971), *Dev. Biol.*, **26**, 55—68.
45. Diamond J., Miledi R., (1962), *J. Physiol.*, **162**, 398—408.
46. Jansen J. K. S., Thompson W., Kuffler D. P., (1978), w Progress in Brain Research, red. Corner M. A., Baker R. E., Van der Pol M. E., str. 3—21; Amsterdam, New York, Oxford.
47. Kelly A. M., Zachs S. J., (1969), *J. Cell Biol.*, **42**, 154—169.
48. Berg D. K., Kelly R. B., Sargent P. B., Williamson P., Hall Z. W., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 147—151.
49. Fambrough D. M., (1979), *Physiol. Rev.*, **1**, 165—227.
50. Changeux J. P., Mikoshiba K., (1978), w Progress in Brain Research, red. Corner M. A., Baker R. E., Van der Pol M. E., t. 48, str. 43—68; Elsevier North Holland Publ. Co., Amsterdam, New York.
51. Landmesser L., (1972), *J. Physiol.*, **220**, 243—256.
52. Drachman D., Witzke E., (1972), *Science*, **176**, 514—516.
53. Fischbach G. D., (1977), w Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. Rowland L. P., str. 823—825; Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford.
54. Betz H., Bourgeois J. P., Changeux J. P., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 219—224.

55. Devreotes P. N., Card D. J., Tepperman K. G., Fambrough D. M., (1977), w Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. Rowland L. P., str. 97—110; *Excerpta Medica*, Amsterdam, Oxford.
56. Rose B., Loewenstein W., (1975), *Science*, **190**, 1204—1206.
57. Greengard P., (1976), *Nature*, **260**, 101—108.
58. Whittaker V. P., (1973), w *Methods of Neurochemistry*, red. Fried R., Dekker M., t. 2, str. 1—24; New York.
59. Teichberg V., Changeux J. P., (1977), *FEBS Letters*, **74**, 71—76.
60. Berg D. K., Hall Z. W., (1975), *J. Physiol.*, **252**, 771—791.
61. Merlie J., Changeux J. P., Gros F., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 2882—2891.
62. Feltz A., Mallart A., (1971), *J. Physiol.*, **318**, 85—100.
63. Brockes J. P., Hall Z. W., (1977), w Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies, red. Rowland L. P., str. 171—180; *Excerpta Medica*, Amsterdam, Oxford.
64. Brockes J. P., Hall Z. W., (1975), *Biochemistry*, **14**, 2100—2106.
65. Fambrough D. M., Drachman D., Sutyamurti S., (1973), *Science*, **182**, 293—295.
66. Gordon A. S., Davis G. G., Milfay D., Diamond J., (1977), *Nature*, **267**, 539—540.
67. Devreotes P. N., Fambrough D. M., (1976), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 237.
68. Gordon T., Jones R., Vrobova G., (1976), *Progr. Neurobiol.*, **6**, 103—136.
69. Fambrough D. M., (1976), w *Neuronal Recognition*, red. Barondes S., str. 25—67; Plenum, New York.
70. Fambrough D. M., (1976), w *Biology of Cholinergic Function*, red. Goldberg A. M., Hanin J., str. 101—160; Raven Press, New York.
71. Purves D., (1976), w *International Review of Physiology*, red. Porter R., t. 10, str. 125—178; University Park Press, Baltimore.
72. Harris A. J., (1974), *Ann. Rev. Physiol.*, **36**, 251—305.
73. Drachman D. B., (1976), w *Biology of Cholinergic Function*, red. Goldberg A. M., Hanin J., str. 161—186; Raven Press, New York.
74. Gutmann E., (1976), *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 177—226.
75. Cohen J. B., Changeux J. P., (1975), *Ann. Rev. Pharmacol.*, **15**, 83—103.
76. Dryden W. F., Harvey A. L., (1977), *J. Pharm. Sci.*, **66**, 913—922.
77. Gage P., (1976), *Physiol. Rev.*, **56**, 177—247.

SPRAWOZDANIE

III Krajowe Konwersatorium — Analiza Biopolimerów n.t. „Zastosowanie automatycznych analizatorów aminokwasów w analizie chemicznej”

W dniach 18 i 19 października 1979 roku w Sosnowce koło Jeleniej Góry odbyło się III Krajowe Konwersatorium — „Analiza Biopolimerów” nt: „Zastosowanie automatycznych analizatorów aminokwasów w analizie chemicznej”, zorganizowane przez Instytut Biochemii Uniwersytetu Wrocławskiego (przez docenta dr Tadeusza Wilusza) i Sekcję Analizy Biopolimerów Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk. W spotkaniu wzięło udział ok. 70 uczestników oraz przedstawiciele zagranicznych producentów automatycznych analizatorów aminokwasów, a mianowicie firmy LKB i Rank-Hilger. Miało ono, podobnie jak poprzednie charakter szkoleniowo-dyskusyjny. Uczestnicy mogli zapoznać się z różnymi technikami analiz aminokwasów, jak również z różnymi zastosowaniami automatycznych analizatorów aminokwasów. Głównymi problemami poruszonymi w referatach plenarnych oraz komunikatach były: budowa i różne właściwości techniczne automatycznych analizatorów aminokwasów, nowe aparaty, różne techniki analizy aminokwasów, wykorzystanie automatycznych analizatorów aminokwasów do innych analiz, jak np. ketokwasów, aminocukrów czy w analizie sekwencyjnej białek, wprowadzanie usprawnień technicznych i metodologicznych oraz zastosowania w badaniach naukowych.

Na spotkaniu podjęto też szereg uchwał, z których najważniejsza to utworzenie stałego punktu wymiany informacji kierowanego przez dr Piotra Mendelewskiego z Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu (ul. Strzeszyńska 30/36, tel. 20 37 41). Zorganizowania kolejnego Konwersatorium w roku 1980 podjął się dr K. Waliszewski z Instytutu Żywności Człowieka Akademii Rolniczej w Poznaniu.

K. Nowak

RECENZJE

R. A. Day How to Write and Publish a Scientific Paper

ISI Press, 1979, Philadelphia, str. XI + 160, cena US \$ 8,95 (oprawa kartonowa) lub 15,00 (oprawa płócienna)

Myśl przewodnią książki streszcza autor następującymi słowy: „Badania naukowe nie są zakończone, dopóki wyników nie opublikowano. Publikacja naukowa stanowi zatem podstawowy składnik procesu badawczego. Opracowanie zatem prac wiernie i zrozumiale przedstawiających wyniki jest równie istotne jak sam proces badawczy. Należy zatem w rozprawie naukowej odważać słowa równie stanowczo, jak odczynniki w laboratorium. Naukowiec zaś winien wiedzieć, jak posługiwać się słowami, kształcenie naukowca przeto nie jest kompletne, dopóki nie posiadał on umiejętności przygotowywania pracy do druku” (s. 133). Stylem klarownym, zaprawionym humorem niekiedy czarnym, niekiedy surrealistycznym — a zawsze przyjaznym w stosunku do czytelnika, wyjaśnia R. A. Day czym jest praca naukowa, a następnie podaje jak należy i jak nie należy: tytułować prace, ustalać kolejność autorów, sporządzać streszczenie i wstęp, opisywać materiały i metody, przedstawiać wyniki i dyskutować je; do jakich czasopism wysyłać maszynopisy; jak współpracować z redakcją i wydawcą; jak reagować na recenzje. Cenne są uwagi nt. specyfiki pisania przeglądów, referatów konferencyjnych i tez doktorskich. Nader istotne są uwagi nt. etyki naukowej. Wiele pożytecznych rad znaleźć można w rozdziałach omawiających specyfikę angielskiego języka naukowego, z wyszczególnieniem typowych błędów syntaktycznych, stylistycznych, gramatycznych i wręcz ortograficznych. Książkę uzupełnia sześć dodatków, takich jak wykazy skrótów, błędów stylistycznych, wyrażen żargonowych, jednostek SI.

„Tylko tyle”? — zachnąć się ma prawo Czytelnik. Właśnie, **aż** tyle. Gdyby każdy naukowiec wiedział, jakim kryteriom musi odpowiadać „ważna” publikacja (*valid publication*) oraz czym jest „oryginalna” publikacja naukowa (*primary scientific paper*), to mniej byłoby zawiedzionych nadziei, zmarnowanego wysiłku i pieniędzy, prac zaprzepaszczonej przez wydrukowanie w czasopismach o ograniczonym zasięgu bądź nieodpowiednim profilu, bądź w wydawnictwach efemerycznych (np. w materiałach kongresowych). Gdyby każdy zdawał sobie z tego sprawę, prace byłyby krótkie, prezentowałyby wyłącznie wyniki „nowe, prawdziwe i ważne” w formie łatwo przyswajalnej, tj. „logicznej, klarownej i precyzyjnej” z użyciem słów „właściwych, znanych i krótkich”.

Czy naprawdę każdy z nas zaczyna opisywać wyniki gdy doświadczenia jeszcze trwają, tj. gdy bez kłopotu można wypełnić luki wyłaniające się przy krytycznej analizie już uzyskanych danych? Czy zdajemy sobie sprawę — zabierając się do pisania dla kogo piszemy? Mnie osobiście — po dwudziestu latach publikowania w różnych czasopismach typu „*primary*”, szokującą nowością wydało się sformu-

lowanie zdawałoby się oczywiste: „Gdy doskonała praca została napisana — jeżeli zostanie kiedyś napisana — to część Wyniki mogłoby zawierać dokładnie jedno zdanie: Wyniki przedstawiono w Tabeli 1” (s. 31). Aczkolwiek wyniki stanowią najważniejszą część pracy naukowej, mogą być rzeczywiście zawarte w paru słowach, zwłaszcza poprzedzonych właściwie sformułowaniem wstępem i odpowiednio opisanymi metodami, a zakończonych dobrą dyskusją. A dobra dyskusja to dyskusja a nie rekapitulacja faktów; autor powinien wyzbyć się wstydlivosti, powinien wskazać teoretyczne implikacje swojej pracy, jak również wszelkie możliwości praktycznego wykorzystania wyników. Należy wyciągać wnioski — nawet daleko idące, gdy podbudowane faktami. Nie jest prawdą, iż najlepszym trybem w pracach naukowych jest tryb warunkowy z zastrzeżeniem do kwadratu. Twardo stojąc na gruncie faktów, należy umieć dostrzec — i mieć śmiałość przedstawić, wszelkie konsekwencje z tych faktów płynące!

Czy każdy z naukowców zdaje sobie sprawę, jak wiele dobrych prac i ważkich wyników nie ujrzało światła dziennego, bądź ujrzało je z dużym opóźnieniem, tylko z powodu złego przepisania na maszynie bądź beztroskiego opakowania maszynopisu przy wysyłce pocztowej? Czy autorzy, postawieni przed recenzją sugerującą poprawki i wpadający z tego powodu we frustrację, wiedzą iż dobre czasopisma odrzucają średnio co drugi maszynopis, a przyjęcie pracy do publikacji bez poprawek jest taką samą rzadkością jak spotkanie jamnika na Giewoncie? Nawet przeciętny wynik, prawidłowo podany, ma szansę przedrzeć się na łamy czasopisma; a wynik rewelacyjny wróci — niestety, do autora, gdy będzie podany w byle jakiej formie.

Kandydatów na doktorów zaszokuje zapewne motto z J. Franka Dobiego: „Przeciętne tezy doktorskie są niczym innym, jak przenoszeniem kości z jednego cmentarzyska na inne” (s. 105). Jeżeli gryząca ironia tego stwierdzenia podziała jak powszechnie dawniej stosowany plaster gorczycowy, może więcej krwi i mięsa niż kości i kadzidła mieć będziemy w naszych rozprawach? Czy nie czas, by rozprawa miast 200 stron liczyła stron 50, a najlepiej by składała się z 2—3 komunikatów, stanowiących pierwszorzędowe źródło informacji, opublikowanych prawidłowo, tj. w *Acta Biochim. Polon.*, *Biochim. Biophys. Acta*, bądź *Biochem. Biophys. Res. Commun.*?

Co się zaś etyki dotyczy: „Pisząc pracę naukową, autor **musi** wiedzieć dokładnie co robi oraz **po co to robi**.” Nie wolno mu zapominać o pewnych zasadach, „jeżeli pragnie uniknąć błędów, które zrujnowały reputację wielu naukowców-autorów. Być winnym dwukrotnej publikacji, tego samego materiału lub wykorzystać prace innych bez odpowiedniego cytowania jest pogwałceniem etyki naukowej, uważanym za niewybaczalne w środowisku naukowym” (s. VI). „Pierwotna praca doświadczalna może być opublikowana w jednym czasopiśmie tylko raz. (...) łagiat oznacza brak naukowej obiektywności i skromności” (s. 109).

Robert A. Day ponad ćwierć wieku zajmuje się bibliotekarstwem, wykładaniem, oraz edycją czasopism mikrobiologicznych. Wszystkie jego rady i porady dyktowane są więc bogatym doświadczeniem życiowym i mistrzowskim opanowaniem rzemiosła pisarskiego. Napisał dzieło, które jest czymś więcej, niż książką kucharską. Owszem, porad praktycznych i recept tu sporo. Żadna jednak recepta nie sprawi, by ze sparciałej mąki dobre wyrosło ciasto. W tej książce jest coś więcej: głęboki rozum i mądrość wsparte nie dającą się ukryć życzliwością wobec czytelnika; ironia trawiąca rdzę do czystego metalu; jest coś, co zapobiega psuciu się mąki, co stanowi czynnik anty—inflacyjny w nauce. Jest ta książka rozsądkiem bakcyła dobrej roboty! Stanowić powinna rzecz codziennego użytku: dla młodych — ku nauce, dla dojrzałych — ku rozwadze i refleksji.

Ten niewątpliwie bestseller wart jest wydania w języku polskim, w nakładzie co najmniej równym liczbie studentów wszystkich kierunków biologicznych i asy-

stentów instytutów naukowo-badawczych i uniwersyteckich. Każdy z nas — biologów, ma do powiedzenia coś oryginalnego o czymś bardzo wąskim i wyrafinowanym w swojej dziedzinie; mówmy to prosto, pamiętając że za „łatwym czytaniem skrywa się piekielna męka pisania” (s. 65). Warto zapamiętać sformułowanie Roberta A. Daya, iż „marnie zrobiony manuskrypt jest — prawie bez wyjątku, nośnikiem wątlej nauki.” Głębką prawdę skrywa zaczerpnięte z Sir Jamesa Barriero motto, otwierające tę książkę: „Wydaje się, iż Człowiek Nauki jest jedynym człowiekiem, który ma coś do powiedzenia właśnie teraz — i jedynym, który nie wie, jak to wyrazić.”

Wyrażam słowa głębokiej wdzięczności Wydawcy — ISI Press (*Institute for Scientific Information, 325 Chestnut Street, Philadelphia, Pennsylvania 19106, U.S.A.*) za nadesłanie egzemplarza recenzenckiego, oraz Autorowi za stworzenie wyśmienitego tekstu.

J. S. Knypl

R. Haschen, D. W. Scheuch Abriss der Pathologischen Biochemie

V. E. B. Gustav Fischer Verlag Jena 1978, 188 stron, cena 29 M

Jest rzeczą zupełnie nie przypadkową, że w ostatnich 3 latach pokazało się kilka pozycji w poważnych, o światowym zasięgu firmach wydawniczych, ze znamienym terminem w tytule „Pathobiochemie” np.: E. Buddecke „Pathobiochemie” wyd. de Gruyter, P. Karlson „Pathobiochemie” wyd. G. Thieme, oraz szereg wydawnictw amerykańskich, których tytułów aktualnie nie pamiętam.

Jest to przejawem pewnej prawidłowości i wskazuje, że w różnych miejscach podobnie przebiegają procesy rozwojowe biochemii i mniej więcej w tym samym czasie dochodzi się do tych samych wniosków, które ujmuje się w jednym terminie — patobiochemia — wydzielając tę gałąź dyscypliny biochemicznej od biochemii podstawowej, i bardziej stosowanej, praktyczystycznej biochemii klinicznej.

Znani mi doskonale osobiście koledzy z Niemieckiej Republiki Demokratycznej, znakomici specjaliści, prof. R. Haschen i W. Scheuch książkę swoją „Abriss der Pathologischen Biochemie” wykazali, że idą pari passu z czołówką światową pod tym względem. Znakomicie sformułowali obecny stan i podział dyscyplin biochemicznych w tabeli Nr 1 na str. 13 przeprowadzając analogie: biologia (ludzka) — patologia — diagnostyka; biochemia — patobiochemia — kliniczna biochemia; fizjologia — patologia — fizjologia kliniczna; anatomia — anatomia patologiczna — prosekтура i cytomorfologia.

Nagromadziło się bowiem takie mnóstwo informacji z „patologii” wszystkich szlaków metabolicznych, że ich przyswojenie jest dla nie-lekarsko nastawionego biochemika bardzo trudne. Względy więc merytoryczne, dydaktyczne i praktyczne zmuszają też do trójsczeblowego podziału biochemii w zastosowaniu do dyscyplin medycznych.

O ile „Pathobiochemie” Karlsona jest prawie zupełnie pozbawiona cech typowej biochemii klinicznej, jest czystą patobiochemią, o tyle „Zarys Patologicznej Biochemii” Haschena i Scheucha jest jakby ustawiony pośrodku tych dyscyplin. Przejawem tego jest układ książki i rozwiniecie treściowe. W pierwszym rozdziale poruszano następujące zagadnienia: określenie przedmiotu, stosunek do dyscyplin stykanych, znaczenie patobiochemii dla opisu zdrowia i choroby, pojęcie zdrowia

i choroby, wpływ działalności służby zdrowia na przebieg procesu chorobowego, historia naturalna choroby i miejsce „wejścia” ingerencji służby zdrowia, przedkliniczne okresy choroby, strategiczne kierunki działań służby zdrowia Niemieckiej Republiki Demokratycznej, badania screeningowe jako instrument czynnej zorganizowanej opieki zdrowotnej.

Fenomenologia przejawów klinicznych podstawowych zaburzeń biochemicznych na różnych szczeblach organizacji komórkowo-tkankowo-narządowej, jest tak ogromna, że autorzy są zmuszeni do selekcji przykładów modelowych określonego typu uszkodzenia biochemicznego. Autorzy wyszli zapewne z założenia, że nie ma sensu mnożenia przykładów dla tej samej zasady. Materiał kliniczny uległ redukcji na korzyść przedstawienia zasad biochemicznych.

Molekularne podstawy zaburzeń przemiany materii są niezwykle ekspansywną dziedziną dotyczącą prawie wszystkich szczebli syntezy białka i jego regulacji. Przykładowo wymienię zagadnienia, które dotychczas w podręcznikach chemii klinicznej były wzmiankowane marginesowo: rola społeczna wad metabolicznych, umieralność i śmiertelność, rodzaje mutacji, lokalizacja zmian DNA nieinformatywnego, hemoglobinopatie, anomalie łańcuchów peptydowych, polimorfizmy, defekty enzymatyczne, modelowo potraktowana jest fenylketonuria, defekty genetyczne a ewolucja, mutacje a selekcje, genetyka ludzka w społeczeństwie socjalistycznym.

Szereg rozdziałów opracowanych jest typowo: upośledzenia trawienia i wchłaniania, zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej, zaburzenia regulacji hormonalnej, patobiochemia narządów: wątroba, nerki, zaburzenia hemostazy, krzepnięcia i fibrynolizy.

Z tematów nowych, zwykle słabo uwzględnianych dotychczas w podręcznikach chemii klinicznej, to: patobiochemia obrony immunologicznej, oraz patobiochemia złośliwego wzrostu, wpływ energii promienistej.

Spis rzeczy ilustruje formalną zawartość książki. Specjalista przeglądając dzieło zauważy w nim wlot co „nowego”, zarówno pod względem treści jak i ujęcia.

A „nowego” w „Abriss der Pathologischen Biochemie” jest bardzo wiele. Wypunktuję te nowości: *skringing*, zarys teorii badań skringingowych, zmiany informatywnego DNA, hemoglobinopatie jako przykład punktowych mutacji, informacje o genetyce ludzkiej, przy wadach metabolicznych jest od razu wprowadzenie w duże biologiczne problemy, jak: genetyka populacyjna, mutacja i selekcja. Charakterystyczne jest, że w rozdziale „Regulacja hormonalna” i „Przemiana węglowodanowa” znajdują się podrozdziałki zatytułowane: „Chemia kliniczna”.

Szok jest nowoczesnie przedstawiony: mikro- i makrokrażenie, przemiany w szoku, mediatory w szoku, kaskada kininowa.

W rozdziale o regulacji przemiany materii w spoczynku i wysiłku wpleciona jest energetyka biochemiczna, stany anoksemii ostrej i przewlekłej, rola AMP, lokalna ischemia mięśnia sercowego — zawał i jego ewolucje.

Prof. R. Haschen jest specjalistą w biochemii klinicznej z zakresu hepatologii i nefrologii. Rozpoznaje się to doskonale w ujęciu przedmiotu, gdyż rozdziały te, mimo silnej, przestrzennej kompresji, oszczędności werbalnej, są napisane znakomicie. Zwraca uwagę rozdział „Diagnostische Aspekte, Abgestufte Laboratoriums Diagnostik”.

W rozdziale poświęconym nerce, opisany jest aparat przykłębkowy (apparat iuxtamedullaris) i jego rola w utrzymaniu izowolemii i izonatremii. Ten rozdział, podobnie jak poprzedni — wątroba — jest bardziej kliniczno-biochemiczny niż patobiochemiczny.

Nowymi rozdziałami są: patobiochemia odporności z reakcją gospodarz i przeszczep i przejęcie lub odrzucenie przeszczepu, biochemia chorób autoimmunologicznych, reakcja anafilaktyczna, choroba posurowicza, alergie kontaktowe.

Nowością jest rozdział „Biochemia guzów” z naszkicowaną przemianą kwasów

nukleinowych z informacją o chalonach i ich roli, swoistością przemian oraz chemią kliniczną nowotworów.

Dla mnie osobiście jest znakomity mały rozdziałik, ale jakże pełen treści, „Strahlenvirkung...” stanowiące świetne i klarowne wprowadzenie do mechanizmów reparacyjnych, defektów mechanizmów reparacyjnych i ich patologii.

W ujęciu biochemicznym ustrój coraz bardziej przybiera cechy wspaniałej, niesłychanie skomplikowanej maszyny, która zadbała nawet o własne warsztaty naprawcze i wykazuje poważne zaburzenia z powodu niedomogi tych warsztatów.

Reasumując, ci którzy znają niemiecki, otrzymują doskonałe, zwarte, bardzo proste i klarowne w formie opracowanie najnowszych informacji z zakresu biochemii klinicznej.

Bardzo wartościowa książka.

L. Tomaszewski

R. A. D. Williams, J. C. Elliot
Basic and Applied Dental Biochemistry

Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 1979, str. 311.

Recenzowana książka, zgodnie z zapowiedzią wydawcy przeznaczona jest dla studentów stomatologii jako podręcznik biochemii. Byłby więc to pierwszy na świecie podręcznik biochemii specjalnie przeznaczony dla tego kierunku nauczania. Jako taki ma też nietypowy układ i odbiegający od większości podręczników biochemii zakres treści. Biochemia ogólna zajmuje bowiem połowę objętości książki, w drugiej natomiast połowie przedstawiono niektóre zagadnienia z biochemii, ważne dla studentów stomatologii, takie jak biochemia bakterii, chemia fosforanów wapnia, skład i chemia zębów z uwzględnieniem środowiska zewnętrznego, wapnienie kości i zębów, biochemia związków fluoru oraz biochemiczne aspekty różnych chorób zębów. Całość książki uzupełnia dodatek obejmujący opis niektórych technik stosowanych w biochemii i biofizyce.

Pierwszych pięć rozdziałów książki autorzy poświęcili opisowi właściwości i budowy podstawowych składników ustroju, począwszy od atomów a zakończywszy na skomplikowanych cząsteczkach biopolimerów. Szczególnie dokładnie, z dużą zaciętością pedagogiczną, opracowano w rozdziale pierwszym tematy dotyczące wiązań chemicznych i tworzenia się chelatów. Krótko, chociaż w sposób istotny dla studentów stomatologii opisano stan krystaliczny związków i sposoby jego badania. Rozdziały od 2 do 4 włącznie poświęcono biopolimerom. Budowę i własności tych związków przedstawiono w sposób prosty, nie przeładowany szczegółami, chociaż całkowicie wystarczający dla zrozumienia ich funkcji biologicznej. Również wybór przykładów, doskonale dobranych do celu jakiemu ma służyć książka a cytowanych przez autorów w tych rozdziałach, świadczy o ich dużym znawstwie przedmiotu. Widoczne jest to także podczas czytania kolejnego rozdziału książki, dotyczącego lipidów, błon komórkowych i detergentów.

W następnych czterech rozdziałach książki autorzy omówili biochemię dynamiczną, a więc przemiany energetyczne komórki, przemiany anaboliczne i kataboliczne jak również trawienie i żywienie. Znaleźć w nich można też pewne elementy budowy morfologicznej komórki. Wszystkie rozdziały są dobrze ilustrowane, co ułatwia przyswajanie zawartego w nich materiału.

Porównując ilość materiału zawartego w rozdziałach dotyczących biochemii

statycznej z ilością materiału zawartego w części dotyczącej biochemii dynamicznej odnosi się wrażenie, że tego pierwszego jest zbyt dużo, że zbyt szczegółowo potraktowano opis budowy i własności fizyko-chemicznych atomów i cząsteczek związków. Bardzo istotnym więc uzupełnieniem materiału z biochemii dynamicznej, zwłaszcza dla studentów stomatologii jest omówienie w dalszych rozdziałach książki wybranych działów ściśle związanych z przemianami zachodzącymi w zębach i jamie ustnej.

Biochemię bakterii, w tym fermentację bakteryjne i bakteryjne hydrolizy biopolimerów autorzy przedstawili w kolejnym dziesiątym rozdziale książki. Dwa dalsze dotyczą składu chemicznego zębów, procesów chemicznych zachodzących w nich, chemii fosforanów wapnia a w szczególności procesów wapnienia. Rozdziały te świadczą o bogatej wiedzy specjalistycznej autorów tego podręcznika oraz umiejętności podania jej w sposób najbardziej celowy dla osiągnięcia zamierzonych rezultatów. Dotyczy to również dwóch ostatnich rozdziałów książki, w których autorzy zajęli się opisem chorób zębów i ich biochemicznym skutkom oraz zapobieganiu tym chorobom. Obszernie też potraktowano chemiczne właściwości związków fluoru, odgrywających tak istotną rolę zarówno w kostnieniu zębów jak i w podatności zębów na próchnicę. Ostatnie sześć rozdziałów książki zawiera więc nowoczesną wiedzę z zakresu biochemii zębów i ich otoczenia a na tyle obszerną, że mogą z niej korzystać nie tylko studenci stomatologii ale również lekarze praktycy. Dodatkową zaletą książki, jako podręcznika jest bogaty zbiór cytowanej na końcu każdego rozdziału literatury umożliwiającej pogłębienie wiedzy z różnych działów biochemii, zwłaszcza że cytowane są najnowsze pozycje piśmiennictwa (do roku 1977 włącznie).

W sumie książka Williamsa i Elliotta stanowi istotną pozycję wśród podręczników biochemii i jedyną przeznaczoną specjalnie dla studentów stomatologii.

K. Nowak

Steroid Hormone Receptor Systems

Red. Wendell W. Leavitt, and James H. Clark

Plenum Press, 1979, New York, London, stron IX + 489, cena \$ 45

Recenzowana książka stanowi 117 tom serii *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Składa się z 26 prac prezentowanych na Sympozjum Układy receptorne hormonów sterydowych, które odbyło się w Shrewsbury (Massachusetts) w dniach 18—20 października 1978 r. Sympozjum zgromadziło wielu wybitnych badaczy zajmujących się zagadnieniem receptacji hormonów sterydowych przez komórki tkanek docelowych oraz stało się okazją do wręczenia dwóm spośród nich: doktorowi Elwoodowi Jensenowi (Stany Zjednoczone) i profesorowi Etienne Baulieu (Francja) nagrody imienia Gregory Pincusa — twórcy hormonalnej antykoncepcji. W związku z tym wyróżnieniem w wystąpieniach obu uczonych znalazły się wspomnienia o ich kontaktach z dr Pincusem i refleksje poświęcone oddziaływaniu tej nieprzeciętnej indywidualności naukowej na kształtowanie osobowości badawczej uczniów i współpracowników. Celem Sympozjum było przedstawienie, dyskusja i popularyzacja nowych osiągnięć w dziedzinie regulacji i funkcji białek receptorowych pośredniczących w czynności hormonów o strukturze sterydowej. Monografia zawiera prace dotyczące receptorów wszystkich grup hormonów sterydowych: estrogenów (9 prac), progestagenów (7 prac), glikokortykosterydów (4 prace)

i androgenów (1 praca). Tematem dwóch prac są receptory występujące w guzach sutka, a jednej — wiążące sterydy białka niereceptorowe, które różnią się od receptorów mniejszą swoistością wiązania oraz niższą wartością stałej asocjacji K_a kompleksu białko-ligand sterydowy.

Prawie wszystkie prace mają charakter prezentacji wyników eksperymentalnych uzyskanych przez poszczególne zespoły w okresie poprzedzającym Sympozjum. Jedynie wykład prof. Baulieu („*Aspects of steroid hormone-target cell interactions*”) różni się od wystąpień innych uczestników, stanowi bowiem rodzaj przeglądu dotychczasowych osiągnięć w dziedzinie badań nad mechanizmami receptacji hormonów sterydowych przez komórki docelowe oraz fizjologicznymi i farmakologicznymi aspektami tych zjawisk. Wykład ten, odznaczający się logiczną konstrukcją i typową dla tego badacza jasnością stylu, jest doskonałym uzupełnieniem prac eksperymentalnych i od niego właśnie, zdaniem recenzenta, powinni rozpoczynać lekturę omawianej książki Czytelnicy będący na początkowych etapach fascynacji zagadnieniem receptacji hormonów sterydowych. Wyniosą oni również duże korzyści z lektury krótkich rozdziałów wprowadzających, które poprzedzają wszystkie prezentowane prace. Zawierają one treściwe rekapitulacje wyników dotychczasowych badań w danej dziedzinie oraz motywację podjęcia badań aktualnie prowadzonych.

Chciałbym przede wszystkim zwrócić uwagę na dwie prace z laboratorium Berta O'Malleya: „*Structural relationships between the chick oviduct progesterone receptor A and B proteins*” oraz „*The ovalbumin gene: transcriptional regulation by estrogen*”. Wrażliwe na progesteron komórki jajowodu kurczęcia zawierają w cytoplazmie białka posiadające zdolność „rozpoznawania” tego hormonu (receptory) i łączenia się z nimi w sposób wybiórczy. Kompleks cytoplazmatycznego receptora z cząsteczką progesteronu przemieszcza się w kierunku jądra komórkowego, w którym przyłącza się do miejsc receptorowych rozmieszczonych na chromatynie. W ten sposób dochodzi do aktywacji pewnej liczby ściśle określonych genów i ta selektywność działania kompleksu receptor-steryd przejawia się w gromadzeniu swoistych typów cząsteczek mRNA. Stwarza to warunki syntezy swoistych białek i tłumaczy efekty fizjologiczne wywoływane przez progesteron (a także inne hormony sterydowe, bo mechanizm ten jest wspólny dla wszystkich ich grup). Autorzy izolowali kwasy rybonukleinowe dla takich białek, oczyścili je i zastosowali do bezpośredniej, prowadzonej *in vitro*, syntezy komplementarnego DNA (cDNA). Przy użyciu znakowanego cDNA udało się ocenić ilości mRNA powstającego w wyniku działania poszczególnych sterydów. Zbadano proces indukowanej przez esterogeny syntezy i akumulacji owalbuminowego mRNA, a także organizację i strukturę genu dla owalbuminy.

Na uwagę zasługuje również praca przedstawiona przez Jensena i wsp. (*The immunoendocrinology of estrophilin*), której wyniki obrazują postęp, jaki dokonał się w dziedzinie badań nad receptorami. Oto kilkanaście zaledwie lat od sformułowania receptorowej hipotezy działania hormonów sterydowych nie tylko określono charakter chemiczny i cechy fizykochemiczne receptorów, prześledzono ich zachowanie w komórce po połączeniu z cząsteczką hormonu, wyizolowano i oczyszczono występujące w znikomych ilościach receptor estrogenowy — estrofilinę, ale również dokonano tym białkiem immunizacji kilku gatunków zwierząt, otrzymując swoiste dla estrofiliny przeciwciała. Przeprowadzona przez autorów praca reakcja tych przeciwciał zarówno z cytoplazmatycznym jak i jądrowym receptorem (z tym ostatnim wiąże się więcej przeciwciał) świadczy o immunochemicznym podobieństwie tych dwóch odmian estrofiliny i poważnie wspiera hipotezę, wg której receptor jądrowy wywodzi się z cytoplazmatycznego i jest jego dimerem. Znaczenie tej pracy polega również na tym, że otrzymane przez autorów przeciwciała będą cennym narzędziem w bardziej subtelnych badaniach nie do końca jeszcze poznanego

mechanizmu działania hormonów, pozwolą bowiem m.in. wykrywać białka receptorowe niezależnie od ich zdolności wiązania radioaktywnego sterydu. Przeciwciała te związane z Sepharozą lub innymi nośnikami, stanowią najbardziej swoiste narzędzia oczyszczania i izolowania estrofiliny. Wysoce swoista reakcja przeciwciał z estrofiliną komórek raka sutka, przy jednoczesnym braku reakcji z receptorami progesteronu i androgenów, stwarza możliwość wykorzystania jej do bardzo dokładnego oznaczania zawartości receptorów w celu wybrania najwłaściwszej terapii nowotworu.

Z tym ostatnim zagadnieniem, ważnym z lekarskiego punktu widzenia, wiąże się również dwie inne prace: „*Estrogen control of progesterone receptor induction in human breast cancer: role of nuclear estrogen receptor*” (Kathryne Horwitz i William McGuire) oraz „*Estrogen and antistrogen action: studies in reproductive target tissues and tumors*” (Benita Katzenellenbogen i wsp.). Związek raka sutka z układem dokrewnym odkrył 80 lat temu Beatson, wykazując, że usunięcie jajników pacjentkom cierpiącym na to schorzenie wywołuje regresję (zmniejszenie lub zanik) guza. W latach ostatnich, głównie dzięki badaniom McGuire i wsp., ustalono, że guzy wrażliwe na leczenie hormonalne zagęszczają estradiol w większym stopniu (a więc zawierają więcej miejsc receptorowych) niż komórki guzów nie podatnych na leczenie hormonalne. Ilościowe oznaczanie receptorów estradiolu i progesteronu w tkance guza pozwala w znacznej mierze przewidywać wyniki terapii hormonalnej: wzrost guzów z dużą zawartością białek receptorowych można zahamować za pomocą leczenia estrogenami i progestagenami, natomiast guzy zbudowane z komórek ubogich w ten białka nie poddają się leczeniu hormonalnemu i wymagają stosowania silnie działających środków farmakologicznych.

Rekapitulując, jest to bardzo cenna monografia, stanowiąca w zasadzie pełny przegląd osiągnięć uzyskanych w ostatnim okresie przez ośrodki badawcze zajmujące się zagadnieniem recepcji hormonów sterydowych*). Przedstawione w niej wyniki zbliżają nas do zrozumienia zadziwiającej różnorodności biologicznych oddziaływań hormonów o strukturze sterydowej, problemu o kapitalnym znaczeniu biologicznym. Dlatego książka ta powinna zainteresować nie tylko endokrynologów, onkologów i biochemików ale również cytologów i fizjologów.

B. Szukalski

Struktur und Synthese von Immunglobulinen und die Bedeutung von Mediatoren bei Immunreaktionen

Red. R. Dargel, D. Dettmer

VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1979, stron 104, cena 12 M

Przedstawiona do oceny książka stanowi 33 tom seryjnego wydawnictwa „*Postępy Medycyny Doświadczalnej*” (*Ergebnisse der experimentellen Medizin*). Książka zawiera zbiór 10 artykułów opracowanych przez różnych Autorów: 1. Struktura przeciwciał i zagadnienia swoistości immunologicznej — J. Gergely, 2. Struktura

*) Na odbywający się w tym samym okresie w New Delhi V Międzynarodowy Kongres poświęcony hormonom sterydowym zgłoszono tylko ok. 10 prac o tematyce receptorowej. Dodajmy, że materiały tego Kongresu, obejmujące 149 prac i referatów, zostały opublikowane w *The Journal of Steroid Biochemistry*, tom 11, Nr 1, części A, B, C (1979).

i genetyka markerów antygenowych w immunoglobulinach — M. W. Turner i J. B. Natvig, 3. Struktura IgA — J. Brock, 4. Immunoglobuliny klasy IgM — G. Zimmerman, 5. Łańcuch J w polimerycznych immunoglobulinach: właściwości i funkcje, 6. Regulacja syntezy przeciwciał — H. Ambrosius, 7. Oddziaływania makrofagów z komórkami T w czasie pierwotnej odpowiedzi immunologicznej, *in vitro*, przeciwciał w hodowlach komórkowych, 8. Procesy indukcji w czasie powstawania przeciwciał, B. Fahlbusch, I. Schumann, 10. Preparacja, charakteryzacja i terapeutyczne stosowanie „czynnika przenoszącego” („*transfer-factor*”). Każdy z artykułów stanowi krótkie, monograficzne opracowanie omawianych zagadnień i zawiera spis cytowanej literatury. Immunologia stanowi bardzo szybko rozwijającą się gałąź nauki i opracowania typu przedstawionego w omawianej książce powinny być zapoatrzone w możliwie najświeższe odnośniki literaturowe, czego nie obserwuje się w wielu rozdziałach tej książki. Zagadnienia omawiane w książce przedstawione są w sposób jasny i pokrywają dużą część immunologii. Zawarte informacje są interesujące dla immunologów jak również mogą być wykorzystane przez biochemików.

J. Lisowski

Homeostasis of Phosphate and other Minerals

red. S. G. Massry, E. Ritz i A. Rapado

Plenum Press, 1978, New York, London, str. 352, \$ 59.40

Recenzowana monografia stanowi 103 tom z serii *Advances in Experimental Medicine and Biology* i zawiera prace naukowe przedstawione na III Międzynarodowej Konferencji na temat przemiany fosforanów i innych minerałów, odbytej w lipcu 1977 r. w Madrycie.

Monografia zawiera 54 prace naukowe autorów z 15 uczestniczących w konferencji krajów. Pod względem tematycznym wydzielić można w książce 7 części, z których każda stanowi odrębność tematyczną.

W części I, dotyczącej mechanizmów nerkowego transportu fosforanów wapnia i magnezu większość prac ma charakter doświadczalny i koncentruje się przede wszystkim na czynności cewek nerek oraz wpływu parathormonu, metabolitów wit. D oraz zależności fosforanów od hipofosfatemii i operacyjnego usunięcia tarczycy i przytarczyc. Część II omawia badania jelitowego transportu fosforanów w warunkach fizjologicznych i doświadczalnej hiperkalcemii. Prace rozważane w części III dotyczące głównie przemiany fosforanów i innych minerałów w stanach chorobowych. Na podkreślenie zasługują te prace, które dotyczą niedoczynności przytarczyc, kamicy wapniowej i samoistnej hiperkalourii. W części IV omówiono metaboliczne konsekwencje ustrojowego niedoboru fosforanów. Na szczególną uwagę wśród tych prac zasługuje omówienie S. G. Massry'ego, klinicznych zespołów niedoboru fosforanów. Część V dotyczy układu kostnego, ze szczególnie obszernym omówieniem roli fosforanów oraz parathormonu w patogenezie osteodystrofii nerkowej. W części VI przedstawiono współczesne poglądy na temat wpływu metabolicznie czynnych analogów witaminy D na nerkowe mechanizmy transportu fosforanów w aspekcie działania fizjologicznego, farmakologicznego oraz terapeutycznego. Część VII zawiera prace omawiające działanie parathormonu na przemiany fosforanów. Na wyróżnie-

nie zasługuje praca dotycząca metabolizmu parathormonu u ludzi zdrowych i chorych z niedoczynnością nerek.

Monografia zawiera prace bardzo cenne tematycznie zarówno dla badaczy zajmujących się doświadczalnie przemianą fosforanów, jak też dla klinicystów, w których praktyce leczenie niewydolności nerek stanowi pierwszoplanowe zagadnienie.

Książka zawiera 111 rycin, 10 tabel, 19 schematów oraz 21 zdjęć fotograficznych.

A. Sliwowski

M. Shamma, J. L. Moniot

Isoquinoline Alkaloids Research 1972—1977

Plenum Press, 1978, New York, London, stron 442, cena 47.40 \$

Książka „Badania nad Alkaloidami izochinolinowymi 1972—1977”, zawiera szeroki materiał dotyczący ostatnich badań nad strukturą i syntezą alkaloidów izochinolinowych. W pewnym sensie jest to dalszy ciąg książki M. Shamma „The Isoquinoline Alkaloids—Chemistry and Pharmacology” wydanej przez Academic Press i Verlag Chemie GmbH w 1972 roku.

Recenzowana książka zawiera ogromny materiał eksperymentalny opublikowany w podanych latach. Przegląd ten nie opisuje wszystkich nowych alkaloidów izochinolinowych wyizolowanych w wymienionym okresie. Autorzy koncentrują się raczej na dyskusji wybranych alkaloidów w celu pokazania ciekawych przykładów i metod.

Każdy rozdział (jest ich 34) zaczyna się dyskusją nad ustaleniem struktury poszczególnych alkaloidów lub całej grupy, następnie podana jest synteza tych związków, charakterystyczne reakcje, farmakologia i biogeneza.

Na zakończenie każdego rozdziału opublikowana jest interpretacja widm IR, NMR, spektrometria masowa i UV poszczególnych alkaloidów.

Trudno jest streszczać tak bogato przedstawiony materiał doświadczalny. Podany jest on w sposób przejrzysty i zwięzły uwzględniający nowe reakcje i odczynniki. Większość reakcji przedstawiona jest w postaci schematów i rycin z uwzględnieniem warunków reakcji. Tak bogaty materiał uzupełniony jest ogromną bibliografią, co pozwala książkę tę traktować, jako bardzo dobry podręcznik dla osób zajmujących się alkaloidami, nie tylko dla chemików, ale także dla biochemików i farmakologów.

J. Wróbel

Spis treści

H. Wehr — Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i komórek	139
K. Ślaska — Specyficzne wiązanie polimerazy RNA z DNA jako najwcześniejszy etap transkrypcji u <i>Prokaryota</i>	161
J. Pulikowska, T. Twardowski — Poglądy na strukturę i funkcję czynnika elongacyjnego 1 (EF1) u <i>Eucaryota</i>	183
Z. Grabarek, J. Kuźnicki — Homologiczne białka wiążące wapń	209
D. Kosk-Kosicka — Receptor acetylocholiny w mięśniu szkieletowym	225
Sprawozdanie z III Krajowego Konwersatorium — Analiza Biopolimerów (K. Nowak)	243
Recenzje książek:	
How to Write and Publish a Scientific Paper	245
Abriss der Pathologischen Biochemie	247
Basic and Applied Dental Biochemistry	249
Steroid Hormone Receptor Systems	250
Struktur und Synthese von Immunglobulinen und Bedeutung von Mediatoren bei Immunreaktionen	252
Homeostasis of Phosphate and other Minerals	253
Isoquinoline Alkaloids Research 1972—1977	254

POSTĘPY BIOCHEMII

June 1980

ARTICLES IN POLISH

Volume 26

Number 2

H. Wehr — Some Aspects of the Metabolic Interrelationship between Plasma Lipoproteins and Cells (Dept. Genetics, Psychoneurological Inst., Warszawa)	139
K. Ślaska — Specific Binding of RNA Polymerase to DNA as the Earliest Step of Transcription in <i>Prokaryota</i> (Dept. Gen. Chemistry, Inst. Physiol. and Biochem, Academy of Medicine, Łódź)	161
J. Pulikowska, T. Twardowski — Views on Structure and Function of Elongation Factor 1 (EF1) from <i>Eucaryotes</i> (Dept. Stereochemistry of Natural Products, Inst. Organic Chemistry, Pol. Acad. Sci, Poznań)	183
Z. Grabarek, J. Kuźnicki — Homologous Calcium Binding Proteins (Dept. Nervous System and Muscle, Nencki Inst. of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci, Warszawa)	209
D. Kosk-Kosicka — Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle (Dept. Nervous System and Muscle, Nencki Inst. of Experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	225
Meeting Report	243
Book reviews	245

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 stronę cytowanej publikacji, nazwę wydawnictwa oraz miejsce wydania, np.

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

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

Załączniki: każdy załącznik należy sporządzić w 2 egz. na oddzielnych kartkach i opatrzyć kolejnym numerem odpowiadającym numerowi użytemu w tekście, oraz oznaczyć (na górze strony cyfrowym) 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 „górną” i „dół” (ołówkiem). Decyzję o stopniu zmniejszenia ryciny podejmuje wydawca.

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

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

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

Spis treści

H. Wehr — Niektóre aspekty współzależności metabolicznej lipoprotein osocza i komórek	139
K. Ślaska — Specyficzne wiązanie polimerazy RNA z DNA jako najwcześniejszy etap transkrypcji u <i>Prokaryota</i>	161
J. Pulikowska, T. Twardowski — Poglądy na strukturę i funkcje czynnika elongacyjnego 1 (EF1) u <i>Eucaryota</i>	183
Z. Grabarek, J. Kuźnicki — Homologiczne białka wiążące wapń	209
D. Kosk-Kosicka — Receptor acetylocholino w mięśniu szkieletowym	225
Sprawozdanie z III Krajowego Konwersatorium — Analiza Biopolimerów K. Nowak	243
Recenzje książek	
How to Write and Publish a Scientific Paper	245
Abriss der Pathologischen Biochemie	247
Basic and Applied Dental Biochemistry	249
Steroid Hormone Receptor Systems	250
Struktur und Synthese von Immunglobulinen und Bedeutung von Mediatoren bei Immunreaktionen	252
Homeostasis of Phosphate and other Minerals	253
Isoquinoline Alkaloids Research 1972—1977	254