

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

POSTBAH 26(2)
(257-515) (1980)

1980

tom 26 nr 3

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

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

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

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

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

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

Postępy Biochemii

KWARTALNIK

1980 TOM 26 ZESZYT 2

Wydane z pomocą finansową
Polskiej Akademii Nauk

Postbah 26(2)
255-51 (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. Gregorczyk (Szczecin), B. Grzelakowska-Sztabert (Warszawa) D. Hulanicka (Warszawa), W. Jachymczyk (Warszawa), J. Kwiatkowska (Wrocław), S. Lewak (Warszawa), W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław), A. Legocki (Poznań), A. Morawiecki (Wrocław), J. Pawełekiewicz (Poznań), K. Raczyńska-Bojanowska (Warszawa), Z. Zielińska (Warszawa)

REDAKTOR NACZELNY

Z. Zielińska

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO

D. Hulanicka

SEKRETARZ REDAKCJI

M. Balińska

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

W opracowaniu zeszytu wzięł udział
Andrzej Wieraszko

Adres Redakcji

Polskie Towarzystwo Biochemiczne
ul. Freta 16, 00-227 Warszawa

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — WARSZAWA 1980

Nakład 2340

Ark. wyd. 20,75, ark. druk. 16,25

Pap. druk. offs. kl. V, 71 g, 70×100

Zam. 745/12/80

Oddano do składania 17.V.1980 r.

Podpisano do druku w listopadzie 1980 r.

Druk ukończono w listopadzie 1980 r.

Cena zł 20,—

Drukarnia im. Rewolucji Październikowej, Warszawa

PROFESOR DR IRENA MOCHNACKA

1905-1979



Dnia 1 listopada 1979 roku zmarła w Warszawie Prof. dr Irena Mochnacka, wieloletni Kierownik Zakładu Biochemii Akademii Medycznej, człowiek dużej woli i ogromnej pracowitości. Prof. Mochnacka była uczennicą Jakuba Parnasa, pod którego kierownictwem rozpoczęła pracę doświadczalną w rodzinnym Lwowie. Następnie działalność naukową i dydaktyczną kontynuowała we Wrocławiu i Warszawie. Pod Jej kierunkiem wykonano i ogłoszono drukiem 200 prac eksperymentalnych. Była promotorem 18 przewodów doktorskich oraz opiekunem 6-ciu przewodów habilitacyjnych.

Podczas 22-letniej pracy w Warszawskiej Akademii Medycznej przekazywała profesor Mochnacka wiedzę biochemiczną ponad 10-cio tysięcy rzeszy studentów. W uznaniu zasług otrzymała tytuł honorowy „Zasłużony Nauczyciel P.R.L.”. Była odznaczona: „Krzyżem Kawalerskim Orderu Odrodzenia Polski”, „Odznaką 1000-lecia Państwa Polskiego”, oraz „Odznaką za Wzorową Pracę w Służbie Zdrowia”.

Oprócz wymagającej ogromnego trudu pracy naukowo-badawczej, dydaktycznej i wychowawczej w Uczelni, z zaangażowaniem i prawdziwym oddaniem zajmowała się Profesor Mochnacka redakcją czasopisma *Acta Biochimica Polonica*. Była członkiem założycielem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. W uznaniu wybitnych zasług dla rozwoju polskiej biochemii Polskie Towarzystwo Biochemiczne nadało Jej godność członka honorowego.

Profesor Mochnacka żyła 74 lat. Skromność, umiar i poczucie obowiązku nie opuszczały Jej nigdy. Pozostanie w pracach naszych anonimowy wkład Jej wiedzy, życzliwej rady i krytyki, a w sercach pamięć o Niej.

POLSKIE TOWARZYSTWO BIOCHEMICZNE

opracowała: T. Szymczyk

W. OSTROWSKI

Molekularne właściwości czynnika przeciwanemicznego

w 50-lecie rozpoczęcia badań

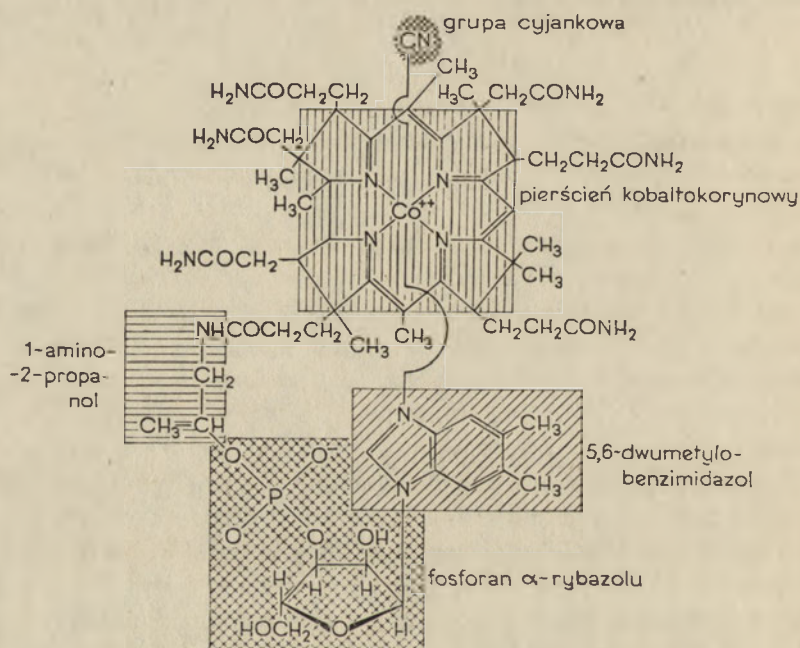
Anemia złośliwa jest schorzeniem chronicznym manifestującym się anemią megaloblastyczną oraz zaburzeniami neurologicznymi. Jakkolwiek znane od przeszło 100 lat schorzenie to uważano jako nieuleczalne do roku 1926, kiedy to G. R. Minot i W. P. Murphy (1) uzyskali znaczną remisję choroby po podawaniu choremu dużych ilości wątroby zwierzęcej. Jednak bardziej racjonalne podejście do wyjaśnienia mechanizmu i sposobu leczenia anemii złośliwej datuje się od 1929 roku, kiedy to W. B. Castle (2) stwierdził, że anemia złośliwa ma związek z brakiem sekrecji żołądkowej, czyli achylią. Systematyczne studia w tym kierunku naprowadziły Castle'a na koncepcję, że w soku żołądkowym istnieje substancja, tzw. czynnik wewnętrzny (*intrinsic factor*), która aktywuje czynnik dietetyczny obecny m.in. w wątrobie, czyli czynnik zewnętrzny (*extrinsic factor*) — dając aktywny czynnik przeciwanemiczny (3). Powyższe obserwacje Castle'a, poczynione 50 lat temu, wyzwoliły w licznych laboratoriach intensywne badania, również i w naszym kraju, które pod koniec lat 40-tych doprowadziły do wyizolowania czynnika zewnętrznego charakteryzującego się działaniem przeciwko anemii złośliwej i jego identyfikacji jako witaminy B-12, w latach 60-tych zaś do oczyszczenia i poznania właściwości fizykochemicznych czynnika wewnętrznego obecnego w soku żołądkowym.

Witamina B-12 — czynnik zewnętrzny

Witaminę B-12 w postaci czerwono zabarwionych kryształów wyizolowano w 1948 r. równocześnie w dwóch laboratoriach: Folkersa w Merck Research Laboratories, New Jersey w USA (4) oraz Smitha w Glaxo Laboratories w Anglii (5). Poszukiwany czynnik izolowano z rozrąbanej wątroby adsorbując go najpierw najczęściej na aktywowanym

węgłu a następnie wmywano fenolem, pirydyną lub wodnym roztworem etanolu. Ekstrat poddawano chromatografii rozdzielczej i adsorbcyjnej na żelu krzemianowym lub na tlenku glinu i w końcu wmywano butanolem, fenolem lub krezolem. Witamina B-12 krystalizowała z wodnych roztworów acetonu w postaci intensywnie różowo zabarwionych regularnych pryzm zawierających znaczną ilość wody krystalizacyjnej.

Przez chemiczną degradację oraz za pomocą metody ugięcia promieniowania rentgenowskiego (6) w 1955 r. ustalono strukturę witaminy B-12, która mając sumaryczny wzór: $C_{63}H_{88}N_{14}O_{14}PCo$ i ciężar cząsteczkowy, 1355 okazała się cyjankiem α -5,6-dwumetylobenzimidazylo/-kobamidu, czyli inaczej cyjanokobalaminą (Ryc. 1).



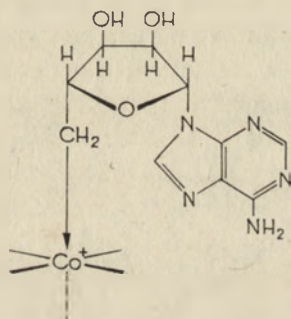
Ryc. 1

Stosując różne metody kwaśnej hydrolizy, z krystalicznej witaminy B-12 otrzymano 5 różnych składników: grupę cyjankową, 5,6-dwumetylobenzimidazol, fosforan α -rybazolu, Dg-1-amino-2-propanol oraz układ tzw. kobaltokorynowy. Fragment dwumetylobenzimidazyloowy jest ustawiony niemal prostopadle w stosunku do planarnej struktury układu makropierścieniowego, a pierścień furanozowy α -rybazolu leży prawie równolegle w stosunku do części kobaltokorynowej. Atom kobaltu, na trzecim stopniu utlenienia, znajduje się centralnie w pierścieniu korynowym i łączy się z nim poprzez 6 wiązań koordynacyjnych.

W czasie wielu lat późniejszych badań okazało się, że w witaminie B-12 w miejsce grupy cyjankowej mogą występować inne ugrupowania,

jak np.: H_2O , Cl , NO_2 , CNB , a w miejsce fragmentu 5,6-dwumetylobenzimidazolowego może występować inny układ zawierający lub niezawierający azotu, jak np.: adenina, guanina, GTP, 2-metylooadenina, 2-metylomerkaptoadenina, 2-metylohypoksantyna, 5-hydroksybenzimidazol, 5-metylobenzimidazol, benzimidazol, 6-metylobenzimidazol, naftyloimidazol *p*-krezol i fenol (7). Powyższe pochodne, wyizolowane ze zwierzęcych odchodów, osadów ściekowych i różnych drobnoustrojów nie wykazują na ogół aktywności hematologicznej cyjanokobalaminy, ale działają na niektóre bakterie i jako czynniki wzrostowe, można je oznaczać i izolować w czystym stanie pod kontrolą testów mikrobiologicznych. W badaniach nad izolowaniem pochodnych B-12 istotny wkład wniósł w Polsce Jerzy Pawełkiewicz wraz ze swymi współpracownikami (8).

Największym osiągnięciem w tym zakresie było jednak wykrycie fotoczułej pochodnej cyjanokobalaminy, zwanej koenzymem B-12 oraz adenozylokobalaminy (5'-dezoksyadenozylo-kobalamina) (9). 5'-Dezoksyadenozylna przyłączona jest do atomu kobaltu w miejsce grupy cyjanokowej cyjanokobalaminy (Ryc. 2).



Ryc. 2

Ta forma witaminy B-12 i niektóre jej pochodne są kofaktorami enzymów katalizujących izomeryzację glutaminianu do β -metyloasparagianu, metylomanolylo-CoA do bursztynianu-CoA, eliminację cząsteczki wody (dehydratazy) przy utlenianiu dioli, amoniaku, przy utlenianiu etanolaminy oraz reduktazy rybonukleotydów. Znalaziono również inną światłoczułą pochodną witaminy B-12 — metylokobalaminę, w której w miejsce adenozylny występuje grupa metylowa. Koenzym CH_3-B_{12} aktywuje syntetazę metioninową zależną od B-12 (10).

Czynnik wewnętrzny (IF) i białka transportujące B-12

W organizmach wyższych zwierząt i ludzi istnieją swoiste mechanizmy odpowiedzialne za absorpcję witaminy B-12 z przewodu pokarmowego oraz za jego transport do komórek poszczególnych tkanek. W pierw-

szym przypadku główną rolę pełni swoisty glikoproteid, nazwany przez Castle'a czynnikiem wewnętrznym, natomiast funkcję transportującą spełniają odpowiednie białka krwi i niektórych komórek zwane transkobalaminami (11).

Czynnik wewnętrzny ze śluzówki ludzkiego żołądka jest glikoproteiną o c.c.z. ok. 60 000, zawierającym kilkanaście procent cukrowców w postaci mannozy, galaktozy, fukozy, N-acetyloglukozaminy, galaktozaminy i kwasu N-acetylneuraminowego (12). Jeden mg białka wiąże ok. 30 μg B-12, co odpowiada 1 mol witaminy na 1 mol monomeru białka: stała dysocjacji kompleksu wynosi $1,5 \times 10^{-10}$ M. Częsteczka czynnika wewnętrznego posiada dwa aktywne centra: jedno wiążące witaminę B-12, a drugie receptorowe, posiadające powinowactwo do komórek epitelialnych mikrokosmków jelita grubego. Po wytworzeniu kompleksu IF-B-12 w żołądku lub dwunastnicy, wędruje on do jelita grubego, gdzie receptory komórek nabłonkowych mikrokosmków przejmują B-12 i przekazują go do krwioobiegu. Centrum receptorowe wymaga do swej aktywności obojętnego pH oraz jonów wapnia.

W surowicy krwi ludzkiej występuje szereg białek wiążących i transportujących witaminę B-12, które po raz pierwszy zostały wykryte i częściowo scharakteryzowane w Instytucie Biochemii Lekarskiej AM w Krakowie w 1954 r. (13) i równocześnie przez Pittneya i współpracowników w USA (14). Obecnie znane są cztery odrębne białka zwane transkobalaminami, które charakteryzują się różną zdolnością wiązania B-12, pochodzeniem, różną ruchliwością elektroforetyczną oraz ciężarem cząsteczkowym (15). Transkobalaminy TC-I, TC-II i TC-III występują w surowicy w stosunku ok. 1:7:2. Czwarte białko, twz. transkobalamina płodowa normalnie nie zawiera endogennego B-12, dopiero po dodaniu cyjanokobalaminy *in vitro* do surowicy obserwuje się dodatkową frakcję kompleksu B-12-białko. Wszystkie powyższe białka wiążące swoiście B-12 w surowicy krwi są glikoproteidami o masie 50—60 000 wiążącymi ok. 30 μg B-12 na mg białka.

Głównym białkiem transportującym witaminę B-12 z krwi do komórek jest transkobalamina TC-II. Na podstawie licznych badań przeprowadzonych z różnymi komórkami ustalono, że kompleks TC-II-B-12 najpierw wiąże się na powierzchni membrany komórkowej skąd witamina jest przejmowana przez inne białko danej komórki. Wykazano, że takie czynniki jak puromycyna, aktynomycyna D, 2,4-dwunitrofenol, cyjanek, jodoacetamid i ditiotreitól silnie hamują hamowanie cyjanokobalaminy z kompleksu do komórek. W komórkach zachodzi adenozyllacja oraz metylacja w witaminie B-12, przez co staje się ona konezymem aktywnym w różnych reakcjach metabolicznych, a tym samym czynnikiem przeciwanemicznym.

PIŚMIENNICTWO

1. Minot G. R., Murphy W. P., (1926), *J. Am. Med. Ass.*, **87**, 470—475.
2. Castle W. B., (1929), *Am. J. Med. Sci.*, **178**, 748—764.
3. Castle W. B., Townsend W. C., (1929), *Am. J. Med. Sci.*, **178**, 764—777.
4. Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., (1948), *Science*, **107**, 396—397.
5. Smith E. L., Parker, L. F. J., (1948), *Biochem. J.*, **43**, VIII—IX.
6. Hodgkin D. C., Pickworth J., Robertson J. H., Trueblood K. N., Prösen R. J., White J. G., Bonnet R., Cannon J. R., Johnson A. W., Sutherland I., Todd A. R., Smith E. L., (1955), *Nature*, **176**, 325—328.
7. Von Friedrich W., (1975), *Vitamin B₁₂ und verwandte Corrinnoide*, G. Thieme Verlag, Stuttgart, str. 10—151.
8. Pawełekiewicz J., (1957), *Post. Biochem.*, **3**, 3—38.
9. Barker H. A., Weissbach H., Smyth R. D., (1958), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **44**, 1093—1097.
10. Taylor R., Weissbach H., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **123**, 109—126.
11. Hall C. A., Finkler A., (1962), *J. Lab. Clin. Med.*, **60**, 765—776.
12. Gräsbeck R., (1969), *Progr. Haematol.*, **6**, 233—260.
13. Ostrowski W., Skarżyński B., Zak Z., (1954), *Bull. Acad. Polon. Sci.*, C-II, **2**, 9—13.
14. Pitney W. R., Beard M. F., Van Loon E. J., (1954), *J. Biol. Chem.*, **207**, 143—153.
15. Hall C. A., Finkler A., (1971), w *Methods in Enzymology* (Mc Cormick D. B., Wright, L. D., wyd.). Acad. Press, New York, t. 18C, 108—133.

JACEK KUŹNICKI *, WITOLD DRABIKOWSKI **

Kalmodulina — aktywator procesów regulowanych przez jony wapnia

Calmodulin — Activator of Ca^{2+} — Regulated Processes

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Odkrycie kalmoduliny
- III. Identyfikacja kalmoduliny
- IV. Budowa i właściwości kalmoduliny
 - IV-1. Ciężar cząsteczkowy
 - IV-2. Struktura pierwszorzędowa
 - IV-3. Struktura drugorzędowa
 - IV-4. Wiązanie wapnia przez kalmodulinę
- V. Udział kalmoduliny w procesach enzymatycznych
 - V-1. Metabolizm cyklicznych nukleotydów
 - V-2. Metabolizm glikogenu
 - V-3. Regulacja skurczu mięśni gładkich
 - V-4. Kinazy lekkiego łańcucha miozyny mięśni szkieletowych, sercowych i komórek niemięśniowych
 - V-5. Kinazy białek błonowych (rola w transporcie wapnia i wydzielaniu neurotransmiterów)
 - V-6. Inne procesy enzymatyczne
- VI. Udział kalmoduliny w regulacji polimeryzacji tubuliny
- VII. Białka wiążące kalmodulinę
- VIII. Kalmodulina a troponina C

Contents

- I. Introduction
- II. Calmodulin discovery
- III. Identification of calmodulin
- IV. Structure and properties of calmodulin
 - IV-1. Molecular weight
 - IV-2. Primary structure
 - IV-3. Secondary structure
 - IV-4. Calcium binding

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

- V. Participation of calmodulin in enzymatic processes**
 - V-1. Cyclic nucleotide metabolism**
 - V-2. Glycogen metabolism**
 - V-3. Regulation of smooth muscle contraction**
 - V-4. Myosin light chain kinases of skeletal and cardiac muscle, and non-muscle cells**
 - V-5. Membrane protein kinases (involvement in calcium transport and neurotransmitter release)**
 - V-6. Other enzymatic processes**
- VI. Participation of calmodulin in regulation of tubulin polymerization**
- VII. Calmodulin binding proteins**
- VIII. Calmodulin and troponin C — comparison**

I. Wstęp

Wiele procesów komórkowych zachodzi w zakresie mikromolowych stężeń wapnia. W cytoplazmie komórek mięśniowych znajdujących się w stanie nieaktywnym (stan rozkurczu) stężenie jonów wapnia wynosi około 10^{-8} — 10^{-7} M. Pod wpływem odpowiedniego bodźca poziom tego kationu podnosi się do 10^{-6} — 10^{-5} M, a komórka osiąga stan aktywny odpowiadający skurczowi. Według Kretsingera (1) w podobny sposób zmienia się stężenie jonów wapnia w każdej komórce eukariotycznej. Zebrał on dane wskazujące na to, że w wielu komórkach obserwuje się niskie stężenie jonów wapnia (około 10^{-7} M) przed stymulacją nerwową lub hormonalną, a wysokie stężenie jonów wapnia (około 10^{-5} M) po stymulacji. Kretsinger uważa, że osiągnięcie stanu aktywnego przez komórki polega w pierwszym rzędzie na zwiększeniu stężenia jonów wapnia w cytoplazmie, które aktywują następnie procesy komórkowe. W ostatnich latach stwierdzono, że akceptorami wapnia, w przypadku procesów biochemicznych, aktywowanych przez te jony w stężeniu 10^{-6} — 10^{-5} M, są niskocząsteczkowe białka tworzące rodzinę, tzw. homologicznych białek specyficznie wiążących wapń. Mają one zbliżoną budowę, wiążą wapń z wysoką stałą powinowactwa i jak się przypuszcza pochodzą od wspólnego przodka. Oprócz kalmoduliny — białka będącego przedmiotem niniejszego artykułu — można wśród nich wyróżnić parwalbuminy, białka o nieznannej funkcji występujące w cytoplazmie mięśni oraz troponinę C — jedno z białek kompleksu regulującego cykl skurczowy mięśni poprzecznie prążkowanych kręgowców. (Budowa tych białek była przedmiotem artykułu opublikowanego w poprzednim zeszycie Postępów Biochemii).

Obecnie mamy coraz więcej dowodów na to, że istnieje ścisła współzależność między działaniem przekaźników drugiego rzędu, tj. cAMP i jonami wapnia (2). Stwierdzono mianowicie, że regulacja wielu procesów polega na fosforylacji białek przez dwa rodzaje kinaz: kinaz zależnych od cAMP (3) i kinaz zależnych od jonów wapnia. Dopiero połączone działa-

nie obu rodzajów enzymów powoduje aktywację lub inhibicję niektórych szlaków metabolicznych. Ponadto, jony wapnia regulują w niektórych tkankach poziom cAMP, co znów wskazuje na współzależność działania przekaźników drugiego rzędu. Obecnie wiadomo, że to kalmodulina po związaniu wapnia moduluje szereg enzymów, głównie enzymy metabolizmu cyklicznych nukleotydów i kinazy zależnie od jonów wapnia.

W artykule zebrano dane dotyczące występowania i właściwości kalmoduliny. Omówiono też znane do tej pory procesy regulowane przez zmiany stężenia jonów wapnia, w których bierze ona udział.

II. Odkrycie kalmoduliny

W 1970 roku niezależnie od siebie Kakiuchi i wsp. (4) oraz Cheung (5, 6) wykazali, że nieoczyszczona fosfodwuesteraza cyklicznych nukleotydów z mózgu ma wysoką aktywność w obecności wapnia, a niską w nieobecności tego kationu. Po oczyszczeniu zaś enzym wykazywał niską aktywność niezależnie od stężenia jonów wapnia. Autorzy ci wykazali, że spadek aktywności fosfodwuesterazy nie wynika z denaturacji enzymu, gdyż dodanie zagotowanego homogenatu mózgu do nieaktywnych preparatów fosfodwuesterazy przywracało jej aktywność i wrażliwość na jony wapnia. Następnie wykazali oni, że w homogenacie mózgu znajduje się termostabilne białko odpowiedzialne za wysoką aktywność fosfodwuesterazy w obecności wapnia. Teo i Wang (7) stwierdzili, że ma ono niski ciężar cząsteczkowy i że wiąże wapń z wysoką stałą powinowactwa. Początkowo nazwano je aktywatorem białkowym fosfodwuesterazy (*protein activator*), potem zaczęto stosować inne nazwy jak: białko modulujące (*modulator protein*), zależny od wapnia regulator (*calcium dependent regulator*) lub białko regulatorowe wiążące wapń (*calcium binding regulatory protein*). Ostatnio Cheung, ze względu na wielofunkcyjne, zależne od stężenia jonów wapnia, działanie tego białka zaproponował nazwać je kalmoduliną (*calmodulin*) i nazwa ta przyjęła się powszechnie.

Odkrywczy kalmoduliny stosowali do oczyszczenia fosfodwuesterazy roztwory zawierające związki chelatujące wapń, w których stężenie jonów wapnia wynosiło poniżej 10^{-6} M. W tych warunkach aktywny kompleks enzymu ulegał rozpadowi, przy czym uwalniała się kalmodulina i białko zawierające centrum aktywne fosfodwuesterazy. To tłumaczy utratę aktywności enzymu w czasie jego oczyszczania.

Jeszcze w 1976 roku badania kalmoduliny prowadzono tylko w kilku laboratoriach na świecie. Obecnie niewiele jest laboratoriów, w których by się nią nie interesowano. Kalmodulina obudziła zrozumiałe zainteresowanie badaczy zajmujących się wieloma dziedzinami fizjologii, far-

makologii i biologii komórki, wyrazem czego jest wzrastająca z roku na rok liczba prac na jej temat. Kariera kalmoduliny przypomina karierę cAMP...

III. Identyfikacja kalmoduliny

Oczyszczoną fosfodwuesterazę wykorzystuje się do badania nieznanego materiału pod kątem obecności kalmoduliny. Polega to na oznaczeniu aktywacji fosfodwuesterazy pozbawionej endogennej kalmoduliny pod wpływem badanego materiału. Wynik pozytywny, tj. aktywacja enzymu wskazuje na obecność kalmoduliny oraz umożliwia oznaczenie jej zawartości (8). W doświadczeniach tych wykorzystuje się dwa fakty: jednakową zdolność do aktywacji fosfodwuesterazy przez kalmoduliny niezależnie od ich pochodzenia (8—12) oraz ich termostabilność. Ta ostatnia cecha umożliwia identyfikację kalmoduliny w materiale zawierającym endogenną fosfodwuesterazę. Zagotowanie roztworu powoduje bowiem denaturację endogennej fosfodwuesterazy, ale nie wpływa na zdolność kalmoduliny do aktywacji enzymu.

Drugą metodą identyfikacji i wydzielenia kalmoduliny jest elektroforeza badanego materiału w żelu poliakryloamidowym w obecności mocznika, w słabo alkalicznym środowisku. W takich warunkach, w nieobecności jonów wapnia, kalmodulina praktycznie oddysocjowuje od każdego z białek, z którym była związana *in vivo* i migruje w żelu szybciej niż one (13—19); jedynie troponina C wykazuje podobne właściwości elektroforetyczne (13—15).

Stosując elektroforezę na skalę preparatywną można wyizolować troponinę C i kalmodulinę, a następnie przeprowadzić ich dalszą identyfikację. W obecności wapnia w warunkach elektroforezy mocznikowej oba białka tworzą z troponiną I kompleksy o niejednakowej ruchliwości, co pozwala na ich rozróżnienie. Troponinę C i kalmodulinę można ostatecznie zidentyfikować badając zdolność do aktywacji fosfodwuesterazy. Troponina C w przeciwieństwie do kalmoduliny nie aktywuje bowiem tego enzymu.

Przy pomocy opisanych powyżej metod wykazano obecność kalmoduliny w następujących tkankach i narządach kręgowców: w mózgu (4—6, 8, 10, 13, 20—26), skórze (27), przysadce mózgowej (28), mięśniach sercowych (13, 26, 29, 30), szkieletowych (13) i gładkich (13, 29, 31), w płytkach krwi (8, 13, 18), erytrocytach (8, 32—36), w wątrobie (8, 26), nerce (8, 26), nadnerczach (8, 37), trzustce (25), jądrach (8, 38), plemnikach (39), w siatkówce i soczewce oka (40) oraz w hodowlach fibroblastów (41—43). Kalmodulinę wykryto ponadto w komórkach bezkręgowców (9, 44—47), w komórkach pierwotniaków i śluzowców (48, 49) oraz w komórkach roślin (50, 51).

Najwięcej kalmoduliny, tj. ponad 2% w przeliczeniu na całkowitą ilość białka znaleziono w narządzie elektrycznym węgorka elektrycznego (19). Spośród badanych tkanek ssaków najwięcej kalmoduliny występuje w jądrach (0,4% wg 8) i w mózgu (około 0,2% wg 21).

Zastosowanie wyżej wymienionych metod pozwoliło na stwierdzenie, że białko uważane dotąd za troponinę C mięśni gładkich i komórek mięśniowych kręgowców jest w rzeczywistości kalmoduliną. Porównawcze prace w naszym (13), a następnie w innym laboratorium (52) ugruntowały tezę o tym, że kalmodulina występuje we wszystkich komórkach eukariontów, natomiast troponina C wyłącznie w mięśniach szkieletowych i sercowych.

IV. Budowa i właściwości kalmoduliny

IV-1. Ciężar cząsteczkowy

Kalmoduliny izolowane z różnych komórek kręgowców i bezkręgowców mają bardzo podobny lub identyczny ciężar cząsteczkowy wynoszący około 17 000 (13, 18, 22, 49), co wyznaczono za pomocą takich metod jak ultrawirowanie lub elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w obecności SDS. Masa cząsteczkowa kalmoduliny z mózgu wołu obliczona na podstawie sekwencji aminokwasowej wynosi 16 723 daltonów, co potwierdza wartości uzyskane innymi metodami. Wszystkie dane wskazują, że kalmodulina, jak inne homologiczne białka wiążące wapń, składa się z pojedynczego łańcucha polipeptydowego. Jednak jej ciężar cząsteczkowy wyznaczony metodą sączenia na sitach molekularnych wynosi od 25 000 do 35 000 (11, 35, 44), co sugeruje obecność dimeru tego białka. Ze względu na brak cysteiny w cząsteczce, ewentualny dimer musi powstać dzięki innym wiązaniom niż wiązanie dwusiarczkowe.

IV-2. Struktura pierwszorzędowa

Dotychczas oznaczono skład aminokwasowy kalmoduliny izolowanej z wielu źródeł, takich jak tkanki kręgowców (22, 25, 35, 37), jeżowca (46), dżdżownicy (47) i śluzowca *Physarum polycephalum* (Kuźnicki, Stępkowski i Drabikowski, niepublikowane) i stwierdzono, że skład ten jest taki jak skład aminokwasowy homologicznych białek wiążących wapń. Podobnie jak inne białka tej grupy, kalmoduliny do tej pory zbadane nie zawierały tryptofanu, zawierały wiele fenyloalaniny i niewiele tyrozyny (Tabela 1).

Tabela 1

Skład aminokwasowy kalmoduliny izolowanej z mózgu wołu (56)

Aminokwasy	Kod jednoliterowy	Liczba aminokwasów
Lizyna	K	7
Histydyna	H	1
Trójmetylolizyna	X	1
Arginina	R	6
Asparagina	N	23
Kwas asparaginowy	D	
Treonina	T	12
Seryna	S	4
Glutamina	Q	27
Kwas glutaminowy	E	
Prolina	P	2
Glicyna	G	11
Alanina	A	11
Cysteina	C	0
Walina	V	7
Metionina	M	9
Izoleucyna	I	8
Leucyna	L	9
Tyrozyna	Y	2
Fenylanina	F	8
Tryptofan	W	0
Suma wszystkich aminokwasów		148

Brak tryptofanu, niska zawartość tyrozyny oraz wysoka zawartość fenyloalaniny sprawiają, że kalmoduliny mają charakterystyczne właściwości spektralne. I tak, widmo absorpcji kalmodulin w zakresie ultrafioletu wykazuje pasma absorpcji między 250 a 270 nm (22, 35, 37, 53) charakterystyczne dla fenyloalaniny. W konsekwencji współczynnik molarowy absorpcji przy 280 nm jest niski (54), a widmo fluorescencji typowe dla fluorescencji tyrozyny (szczyt emisji w 305 nm przy wzbudzeniu w 280 nm) (17). Cząsteczkę kalmoduliny wyróżnia spośród innych białek wiążących wapń obecność jednej reszty nietypowego aminokwasu, trójmetylolizyny (22, 55).

Ponad 30% aminokwasów kalmoduliny to kwas asparaginowy i kwas glutaminowy lub ich pochodne amidowe, a tylko 10% to lizyna i arginina. Taki stosunek ilościowy aminokwasów kwaśnych i zasadowych powoduje, że kalmodulina ma niski punkt izoelektryczny wynoszący około 4,0.

W ostatnich latach opublikowano pełną sekwencję aminokwasów w cząsteczce kalmoduliny z mózgu cielęcego (Tabela 2) (56), macicy królika (57) i z jąder szczura (58). Różnice między nimi są zadziwiająco małe

Struktura pierwszorzędowa kalmoduliny i tropnin C.

Domeny wapniowe	ramię	pętla wapniowa	ramię
1. (1—51) mDdi t kaAveQLTEEQknEFKAAFDI F		v i g AE d G J S T K E	L G k V M R M L G Q N
2. I (1—42)	abQLZEEQI AEFKe AFSLF	D k D G B G T I T T K E	L G T V M R s L G Q N
3. (1—49) D t q q e A r s y L S E E m I A E F K A A F D M F		D a D G g G D I S V K E	L G T V M R M L G Q T
1. (52—91)	P T p E E L Q G M I D E V	D E D G S G T V D F D E	F L V M M V R c M K D N S K G
2. II (43—80)	P T e a E L Z B M I N E V	D a D G B G T I D F p E	F L t M M A R k M K D t d
3. (50—89)	P T k E E L D a I E E V	D E D G S G T I D E E E	E L V M M V R q M K E D A K G
1. (92—127)	K S E E E L S D I F R M F	D K N A D G Y I D I E E	L K I M L q A T G E I
2. III (81—115)	S E E E I r E a F R V F	D K D G N G Y I S A a E	L R h V M t b i D E x
3. (90—125)	K S E E E L A E c F R I F	D R N A D G Y I D A E E	L a e I F r A S G E H
1. (128—161)	I T E D D I E E L M K D G	D K N N D G R I D Y D E	F L E F M k G V E
2. IV (116—148)	L T D E E V D E M I R E A	N I D G D G Z V B Y Z Z	F V Q M M t A k
3. (126—159)	V T D E E I E s L M K D G	D K N N D G R I D F D E	F L k M M e G V Q

1. troponina C z mięśni serca wołu

2. kalmodulina z mózgu wołu

3. troponina C z mięśni szybkich królika

Oznaczenia aminokwasów w kodzie jednoliterowym podano w tabeli 1; z wyjątkiem B — Asx i Z — Glx.

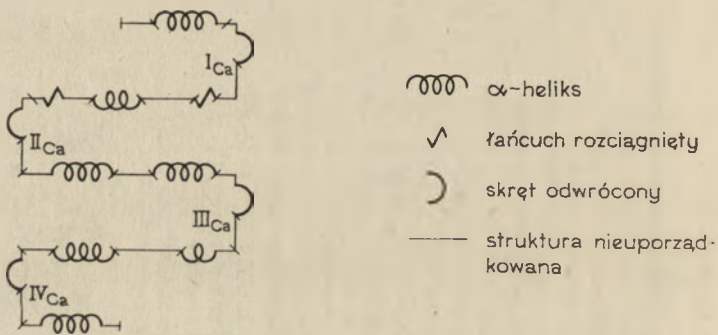
Podkreślono aminokwasów dostarczające ligandy koordynujące jon wapnia.

Wielką literą zaznaczono te miejsca w łańcuchach polipeptydowych porównywanych białek, które są zajęte przez identyczne lub podobne aminokwasy (zamiany konserwatywne); małą literą przez inne aminokwasy (zamiany niekonserwatywne).

i dotyczą podstawienia grup karboksylowych resztami amidowymi. Na przykład kalmodulina z jąder ma w pozycji 3, 42, 53, 111 i 143 reszty kwasu asparaginowego i glutaminowego, podczas gdy w białkach z mózgu i macicy pozycje te zajmują pochodne amidowe tych aminokwasów. Podobnie, w kalmodulinie z macicy miejsca 24 i 97 zajmuje kwas asparaginowy, a w kalmodulinie z mózgu asparagina. Wydaje się, że rozstrzygnięcie czy rzeczywiście poszczególne kalmoduliny różnią się stopniem amidacji aminokwasów kwaśnych, biorąc pod uwagę znaczne trudności przy analizie pochodnych amidowych, będzie możliwe tylko w wyniku porównawczych badań przeprowadzonych w jednym laboratorium.

IV-3. Struktura drugorzędowa

Kalmodulina, tak jak troponina C, składa się z czterech podobnych elementów strukturalnych zwanych domenami. Każda z nich zbudowana jest z dwóch ramion α -spirali oraz zawartej między nimi pętli, w której znajdują się aminokwasy koordynacyjnie wiążące jon wapnia (por. Tabela 2) (Ryc. 1).



Ryc. 1. Struktura drugorzędowa kalmoduliny izolowanej z mózgu wołu (59)

Związanie jonów wapnia usztywnia strukturę domeny, natomiast dysocjacja tych jonów rozluźnia całą strukturę. W związku z tym, podatność kalmoduliny na proteolizę zmienia się w zależności od obecności jonów wapnia w cząsteczce. Po usunięciu jonów wapnia z kalmoduliny trawienie trypsyną zachodzi szybko i prowadzi do powstania wielu fragmentów o niskim ciężarze cząsteczkowym (17, 60). W obecności jonów wapnia trypsyna trawi kalmodulinę wyłącznie w części łańcucha łączącej drugą i trzecią domenę (por. Tabela 2 i Ryc. 1), gdyż nie ma dostępu do znajdujących się wewnątrz domeny innych potencjalnych miejsc trawienia, jakimi są wiązania lizyny lub argininy z innymi aminokwasami. Efektem działania trypsyny na kalmodulinę zawierającą związany wapń

są więc głównie dwa fragmenty odporne na dalsze trawienie (17, 60).

Wyrazem zmian struktury drugorzędowej, zachodzących po usunięciu wapnia jest również spadek zawartości α -spiralii, co wynika z pomiarów dichroizmu kołowego. Stosunek zawartości α -heliksu otrzymanej w obecności wapnia do wartości znajdowanej w nieobecności wapnia wynosi około 1,3 (54, 61, 62).

W cząsteczce kalmoduliny izolowanej z mózgu wołu obie reszty tyrozyny usytuowane są w pętlach wiążących wapń. Usunięcie wapnia powoduje 2,5-krotne zmniejszenie intensywności fluorescencji tyrozyny, przy czym zmiany te są odwracalne (17, 61).

Podatność poszczególnych aminokwasów w cząsteczce kalmoduliny na chemiczną modyfikację zależy również od struktury drugorzędowej, a więc w pierwszym rzędzie od obecności jonów wapnia w cząsteczce. Na ogół, reszty aminokwasowe kalmoduliny zawierającej jony wapnia są niedostępne dla czynników modyfikujących. Natomiast w obecności chelatorów wapnia, reszty lizyny i tyrozyny oraz grupy karboksylowe wykazują zwiększoną reaktywność ze związkami modyfikującymi (63—66). Podobnie, zmiany podatności na proteolizę i zmiany fluorescencji świadczą o częściowym rozfałdowaniu łańcucha polipeptydowego kalmoduliny pozbawionej wapnia i o ekspozycji ukrytych dotąd aminokwasów.

IV-4. Wiązanie wapnia przez kalmodulinę

Oznaczenia ilości wapnia związanego przez kalmodulinę wykazały, że — zgodnie z proponowaną strukturą — wiąże ona cztery jony wapnia, tak jak troponina C z mięśni szkieletowych królika. W przypadku troponiny C uważa się, że dwa pierwsze miejsca wiązania są specyficzne wobec wapnia, a trzecie i czwarte mogą wiązać jony magnezu. Miejsca specyficzne wobec wapnia mają w troponinie C niższą stałą wiązania (około $10^5 M^{-1}$), niż miejsca wapniowo-magnezowe (stała wiązania wapnia w nieobecności magnezu wynosi około $10^7 M^{-1}$, a w obecności — około $10^6 M^{-1}$).

Dane dotyczące miejsc wiążących wapń w cząsteczce kalmoduliny są częściowo rozbieżne, bowiem różni autorzy stosując nawet te same metody, jak dializę wyrównawczą i analizę danych według Scatcharda uzyskali nieidentyczne wyniki (21, 22, 61, 67). Wszyscy autorzy zgadzają się, że cząsteczka kalmoduliny z mózgu wołu wiąże cztery jony wapnia i ma dwie klasy miejsc wiążących wapń, różniące się stałą wiązania wapnia. Rozbieżności natomiast dotyczą liczby miejsc wiążących wapń należących do poszczególnych klas oraz ich specyficzności wobec kationów dwuwartościowych. Jedna grupa autorów przedstawiła wyniki wskazujące, że

dwa jony wapnia są wiązane specyficznie z niską stałą wiązania, natomiast pozostałe dwa jony są wiązane niespecyficznie z wyższą stałą wiązania (22, 67, 68). Druga grupa badaczy twierdzi natomiast, że w cząsteczce kalmoduliny z mózgu wyróżnić można trzy miejsca o wysokiej stałej wiązania i jedno miejsce o niskiej stałej wiązania (21, 61). Wszystkie cztery miejsca, według tych autorów, mogły wiązać magnez (61). W tabeli 3 zebrano podawane przez różnych autorów stałe wiązania wapnia kalmoduliny izolowanej z mózgu.

Tabela 3

Wiązanie wapnia przez kalmodulinę z mózgu

Mole wapnia na mol cząsteczki	Stała dysocjacja μM w nieobecności Mg^{2+}	Piśmiennictwo
2 2	1 860	22
2 2	0,2 400	67
2 2	4 12	68
3 1	3,5 18	21
3 1	0,2 1	61

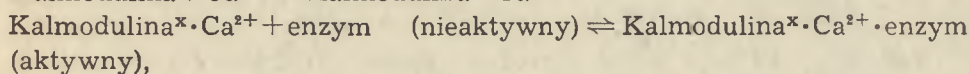
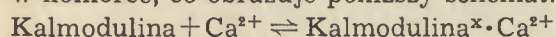
Według Dedmana i wsp. (54) kalmodulina izolowana z jąder szczura wiąże również specyficznie cztery jony wapnia, ale z jednakową stałą wiązania. Chociaż autorzy ci twierdzili, że magnez nie jest wiązany przez to białko, wyników tych nie potwierdzili Wolff i Bröstrom (69). Wykazali oni, że kalmodulina z jąder szczura podobnie jak kalmodulina z mózgu wiąże jony magnezu.

V. Udział kalmoduliny w procesach enzymatycznych

Już w pierwszych pracach nad kalmoduliną zwrócono uwagę na fakt, że jej stężenie w tkankach nie jest skorelowane ze stężeniem fosfodwuesterazy aktywowanej przez to białko (8, 12, 23, 26) i przewyższa je wielokrotnie. Sugerowało to, iż kalmodulina bierze również udział w innych procesach niż aktywacja rozkładu cyklicznych nukleotydów. Te sugestie zostały w ostatnich latach potwierdzone w szeregu pracach, a lista enzy-

mów których aktywność zależy od obecności kalmoduliny stale wzrasta. Wśród nich można wyróżnić dwie charakterystyczne grupy: enzymy biorące udział w metabolizmie cyklicznych nukleotydów oraz najróżniejsze kinazy, których aktywność zależy od stężenia jonów wapnia. Do procesów, w których działanie tych kinaz zostało najlepiej poznane należy metabolizm glikogenu oraz regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich.

Kalmodulina aktywuje enzymy tylko po związaniu wapnia; struktura, którą przyjmuje w takich warunkach jest więc strukturą aktywną biologicznie. Istnienie dwóch stanów konformacyjnych kalmoduliny: aktywnego i nieaktywnego (bez wapnia) jest podstawą jej działania w komórce, co obrazuje poniższy schemat:



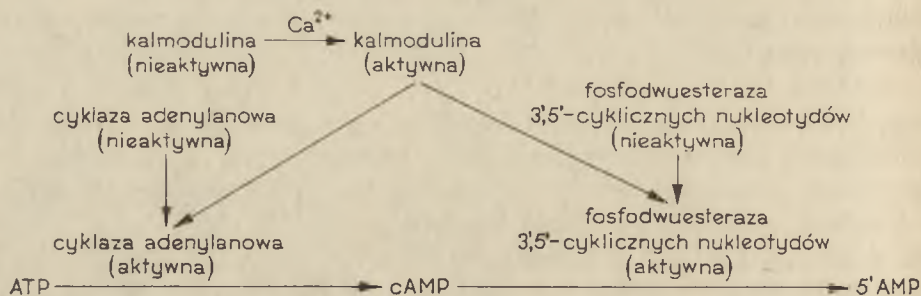
gdzie x oznacza zmianę konformacji.

V-1. Metabolizm cyklicznych nukleotydów

W komórkach kręgowców występują przynajmniej trzy rodzaje fosfodwuesteraz katalizujących rozkład 3',5'-cyklicznych nukleotydów (21). Tylko jedna z nich jest aktywowana przez wapń za pośrednictwem kalmoduliny (25, 29, 40, 70—72). Fosfodwuesterazę zależną od stężenia jonów wapnia można oddzielić od pozostałych fosfodwuesteraz przez sączenie na sitach molekularnych lub chromatografię na jonowymieniaczach (4—7, 21, 22). Stosując roztwory o określonym stężeniu wolnych jonów wapnia, czyli tzw. bufory wapniowe stwierdzono, że fosfodwuesteraza z serca wołu wykazuje maksymalną aktywację już przy stężeniu 10^{-5} M Ca^{2+} , a poniżej 10^{-7} M jest nieaktywna. 50% maksymalnej aktywacji enzymu ma miejsce przy stężeniu $2,3 \times 10^{-6}$ M (7).

Najnowsze prace wskazują, że aktywny kompleks fosfodwuesterazy z mózgu wołu składa się oprócz kalmoduliny z trzech białek o ciężarach cząsteczkowych 61 000, 59 000 i 15 000 (66, 73). Z innych badań wiadomo, że w mózgu występuje również białko będące inhibitorem fosfodwuesterazy składające się z dwóch podjednostek o ciężarze 61 000 i 15 000, które wiąże kalmodulinę w obecności wapnia (73—76). Klee i wsp. uważają (66), że inhibitor ten jest podjednostką regulatorową enzymu hamującą w nieobecności kalmoduliny centrum aktywne podjednostki o ciężarze 59 000. Przyłączenie związanej z wapniem kalmoduliny może odblokowywać to hamowanie. Taka budowa fosfodwuesterazy i rola poszczególnych jej składników nie została jeszcze potwierdzona przez badania innych autorów.

Kalmodulina aktywuje nie tylko fosfodwuesterazę, lecz również zależną od jonów wapnia cyklazę adenylanową, izolowaną z mózgu (11, 77—80). To samo białko zatem — kalmodulina — aktywować może dwa przeciwstawnie działające enzymy (Ryc. 2).



Ryc. 2. Udział kalmoduliny w regulacji poziomu cyklicznych nukleotydów

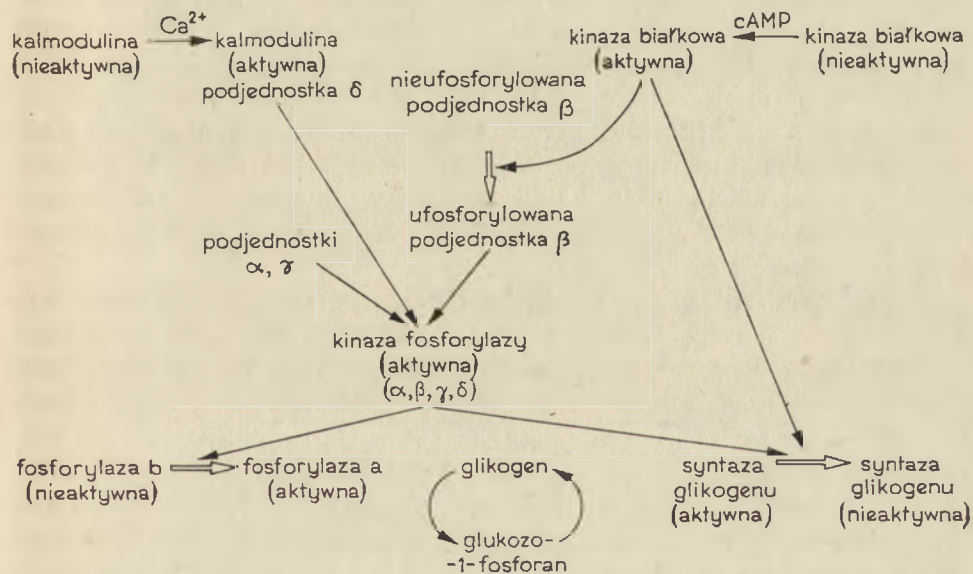
Najprostszym wytłumaczeniem tego zjawiska jest różna lokalizacja obu enzymów: fosfodwuesterazy w cytoplazmie, a cyklazy w błonach komórkowych.

Z kolei, niektórzy autorzy sądzą, że wyniki badań kinetycznych fosfodwuesterazy (około 20 razy większe K_m cAMP i 3 razy większe V_{max} niż w przypadku cGMP) wskazują, że enzym *in vivo* hydrolizuje wyłącznie cGMP, a nie hydrolizuje cAMP (81—84). Inni autorzy jednak, biorąc pod uwagę znaczny nadmiar cAMP w stosunku do cGMP w komórce (około 10—100-krotny) są zdania, że *in situ* fosfodwuesteraza rozkłada oba cykliczne nukleotydy (69). A zatem, po zwiększeniu stężenia jonów wapnia w komórce kalmodulina może regulować poziom cyklicznych nukleotydów zarówno poprzez aktywację syntezy cAMP, jak i aktywację hydrolizy cAMP i cGMP. Należy pamiętać jednak, że to działanie wapnia dotyczy tylko jednego z rodzajów fosfodwuesterazy i nie jest jedyną formą regulacji metabolizmu cyklicznych nukleotydów.

V-2. Metabolizm glikogenu

Już szereg lat temu stwierdzono, że aktywność kinazy fosforylazy, kluczowego enzymu glikogenolizy, zależy od obecności wapnia oraz od ufosforylowania przez kinazę białkową aktywowaną przez cAMP. Dopiero jednak ostatnie prace Cohena i wsp. (53, 85), jak również innych autorów (86—88) pozwoliły pełniej zrozumieć mechanizm regulacji metabolizmu glikogenu i określić w nim rolę kalmoduliny. Przez jakiś czas wydawało się, że fosforylację dwóch enzymów biorących udział w metabolizmie glikogenu: nieaktywnej fosforylazy b i aktywnej syntazy katalizują dwa różne enzymy zależne od stężenia jonów wapnia

i kalmoduliny: kinaza fosforylaza i kinaza syntazy — 2 (53, 85). Ostatnio jednak przedstawiono dane wskazujące, że jest to jeden i ten sam enzym znany wcześniej jako kinaza fosforylaza (89, 90). Wykazano, że ten enzym składa się z czterech, a nie trzech, jak sądzono dotychczas, podjednostek nazwanych α , β , γ , δ , z których δ , odkryta ostatnio to kalmodulina. Kinaza fosforylaza jest tetramerem $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ i wykazuje aktywność tylko w obecności wapnia i po fosforylacji podjednostki β przez kinazę zależną od cAMP. Kinaza fosforylaza różni się nieco od innych enzymów zależnych od kalmoduliny tym, że cząsteczki kalmoduliny wchodzące w skład tetramery są związane bardzo mocno, niezależnie od stężenia jonów wapnia i nie ulegają dysocjacji w nieobecności tego kationu. Przyłączenie dodatkowej (lub dodatkowych) cząsteczek kalmoduliny jedynie w obecności wapnia powoduje dalszy wzrost aktywności kinazy fosforylaza (53, 91). Cohen uważa, że trwale związane cząsteczki kalmoduliny uczulają kompleks enzymatyczny na jony wapnia, natomiast luźno związane modułują aktywność enzymu.



Ryc. 3. Udział kinaz zależnych od jonów wapnia — kalmodulina i cAMP w glikogenolizie

Grubą strzałką zaznaczono procesy fosforylacji

Na rycinie 3 przedstawiono schemat regulacji metabolizmu glikogenu i udział w niej kinaz zależnych zarówno od cAMP, jak i wapnia związanego z kalmoduliną. Kinaza zależna od cAMP katalizuje fosforylację kinazy fosforylaza. Po fosforylacji podjednostki β i związaniu wapnia przez podjednostkę δ (kalmodulinę) kinaza fosforylaza staje się aktywna. Fosforyluje ona wtedy dwa przeciwstawnie działające enzymy: fosforylazę glikogenu i syntazę glikogenu. W wyniku fosforylacji fosforylaza prze-

chodzi w formę aktywną, natomiast syntaza — w formę nieaktywną. Ponadto, syntaza glikogenu może być ufosforylowana przez kinazę zależną od cAMP i całkowite zahamowanie jej aktywności obserwuje się dopiero po fosforylacji przez obie kinazy (kinazę fosforylasy zależną od Ca^{2+} i kinazę zależną od cAMP) w dwóch różnych miejscach łańcucha polipeptydowego.

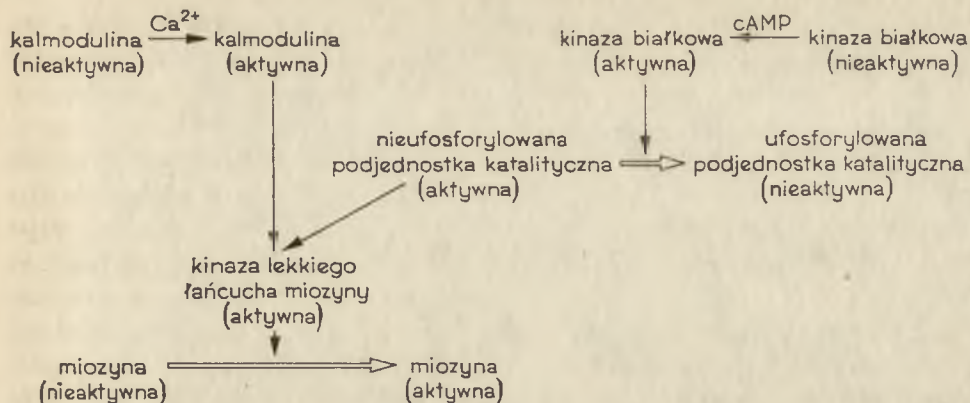
W sumie wzrost stężenia cAMP i jonów wapnia w mięśniach powoduje zwiększoną fosforolizę glikogenu. Przy tym samym stężeniu jonów wapnia zachodzi inicjacja skurczu mięśni, dzięki czemu oba procesy — skurcz i glikogenoliza — są ze sobą sprzężone.

V-3. Regulacja skurczu mięśni gładkich

Od kilku lat umacnia się pogląd, iż regulacja cyklu skurczowo-rokurczowego mięśni gładkich kręgowców ma bezpośredni związek z fosforylacją jednego z lekkich łańcuchów miozyny (92—94). Dopiero po fosforylacji tego łańcucha ATPaza miozynowa może ulec aktywacji przez aktynę. Kinaza fosforylująca lekki łańcuch miozyny jest aktywna tylko w obecności wapnia, natomiast fosfataza, obecna również w mięśniach, działa niezależnie od stężenia jonów wapnia. Tak więc w mięśniach gładkich lekki łańcuch miozyny jest ufosforylowany tylko przy stężeniu wapnia w cytoplazmie około 10^{-5} M, a więc w czasie skurczu. Przy stężeniu wapnia poniżej 10^{-7} M ulega on defosforylacji na skutek zahamowania działania kinazy i działającej w tych warunkach fosfatazy.

Dąbrowska i wsp. wykazali, że kinaza fosforylująca lekki łańcuch miozyny mięśni gładkich składa się z dwóch białek (95, 96). Ciężar cząsteczkowy jednego wynosi około 105 000, a drugiego około 17 000. Białko o większym ciężarze cząsteczkowym zawierało centrum katalityczne, natomiast białko niskocząsteczkowe okazało się identyczne z kalmoduliną (96).

Ostatnio wykazano, że w mięśniach gładkich nie tylko wapń i kalmodulina mają wpływ na aktywność kinazy, lecz również cAMP. Stwierdzono mianowicie, że katalityczna podjednostka kinazy — białko o ciężarze około 105 000 ulega fosforylacji katalizowanej przez kinazę zależną od cAMP (97, 98). Ta fosforylacja powoduje spadek aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny nawet w obecności wapnia i kalmoduliny. Dopiero defosforylacja podjednostki katalitycznej kinazy lekkiego łańcucha miozyny w nieobecności cAMP powoduje odblokowanie i wzrost aktywności enzymu. Sytuacja ta przypomina w pewnym stopniu hamowanie aktywności syntazy glikogenu po jej fosforylacji przez kinazę zależną od cAMP (por. V-2). Można założyć, że inicjujące skurcz mięśni gładkich jony wapnia związane z kalmoduliną mają dwie drogi działania: jedna polega na aktywacji nieufosforylowanej kinazy lekkiego łańcucha mio-



Ryc. 4. Udział kalmoduliny w regulacji cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni gładkich

Grubą strzałką zaznaczono procesy fosforylacji

zyny, a druga na aktywacji fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów. Wzrost aktywności tego ostatniego enzymu powodując zmniejszenie stężenia cAMP miałyby w konsekwencji hamować fosforylację podjednostki katalitycznej kinazy lekkiego łańcucha. W sumie za pośrednictwem jonów wapnia i kalmoduliny zwiększałby się stopień ufosforylowania lekkiego łańcucha miozyny, czego końcowym efektem byłaby wysoka aktywność ATPazy kompleksu aktomiozynowego i skurcz. Z kolei usunięcie jonów wapnia powodowałoby spadek aktywności kinazy lekkiego łańcucha i w konsekwencji jego defosforylację na skutek działania fosfatazy.

V-4. Kinazy lekkiego łańcucha miozyny mięśni szkieletowych i sercowych oraz komórek niemięśniowych

Fosforylacja lekkiego łańcucha miozyny zależna od jonów wapnia zachodzi również w mięśniach szkieletowych i w mięśniu sercowym, chociaż regulacja skurczu tych mięśni polega na działaniu innych białek, tj. troponiny i tropomiozyny (art. przeglądowy 99). Do tej pory nie wykazano przekonywująco, aby w mięśniach poprzecznie prążkowanych fosforylacja lekkiego łańcucha miała jakiś wpływ na aktywność ATPazy aktomiozynowej (99).

Równoległe z badaniami dotyczącymi mięśni gładkich szereg autorów wykryło, że kinaza z mięśni szkieletowych (100—103) i mięśni serca (104) zawiera również kalmodulinę.

W ostatnich latach uzyskano szereg danych wskazujących na obecność aktyny i miozyny w komórkach niemięśniowych. Mimo wysiłku badaczy nie udało się jednak jednoznacznie określić mechanizmów regulujących ruchliwość komórek niemięśniowych (ang. *cell motility*), a więc zjawisk, w których pierwszorzędne znaczenie ma interakcja aktyny z mio-

zyną (105). Pozostaje między innymi sprawą niewyjaśnioną do końca, na co wskazują najnowsze prace, czy w komórkach niemięśniowych kinazy spełniają podobną rolę do kinazy lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich.

Z niektórych komórek niemięśniowych jak mózg, fibroblasty, płytki krwi wyizolowano zależną od wapnia kinazę, która była zdolna do fosforylacji lekkiego łańcucha miozyny mięśni gładkich w obecności wapnia (106). Już wcześniej było wiadomo, że miozyna płytek krwi reaguje z aktyną tylko po fosforylacji lekkiego łańcucha (92, 107), a ostatnio wyizolowano z tych komórek kinazę zależną od wapnia, która w obecności kalmoduliny katalizowała tę reakcję (108). Wykazano przy tym ścisłą korelację stopnia ufosforylowania lekkiego łańcucha ze wzrostem aktywności ATPazy aktomiozynowej.

Podobne wyniki uzyskano badając fibroblasty (109) oraz makrofagi (110). Kinaza izolowana z tych komórek wpływała na zdolność miozyny do interakcji z aktyną tylko w obecności wapnia i kalmoduliny. Ostatnio pojawiło się doniesienie o zależności aktywności ATPazy aktomiozynowej od endogennej fosforylacji w komórkach grasicy (111). Kinaza, która katalizowała tę reakcję miała podobną budowę do kinazy izolowanej z mięśni gładkich i komórek niemięśniowych.

Na gruncie tych obserwacji coraz bardziej ustala się pogląd, iż przynajmniej w niektórych komórkach niemięśniowych, podobnie jak w mięśniach gładkich, kalmodulina jest za pośrednictwem kinazy włączona w układ regulujący ATPazę aktomiozynową.

V-5. Kinazy białek błonowych (rola w transporcie kationów przez błony i przy wydzielaniu neurotransmiterów)

W ostatnich latach znaleziono inne kinazy białkowe o podobnej zależności od jonów wapnia i kalmoduliny. Katz i Remtulla (112) zaobserwowali, że transport wapnia przez błony sarkoplazmatycznego retikulum z serca zależy od kalmoduliny. Dalsze badania wykazały jednak, że kalmodulina i w tym przypadku aktywuje kinazę fosforylującą białko specyficzne dla tego typu sarkoplazmatycznego retikulum (113) i nazwane uprzednio fosfolamban (114). Fosforylacja tego białka powoduje aktywację transportu jonów wapnia przez błony sarkoplazmatycznego retikulum (113—115). Ostatnie prace wskazują, że fosfolamban zbudowany jest z dwóch podjednostek o ciężarze cząsteczkowym około 11 000. Każda podjednostka ma dwa miejsca ulegające fosforylacji. Na jedno z nich działa kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny, na drugie zaś kinaza zależna od cAMP. Fosfolamban powoduje zwiększenie transportu jonów wapnia dopiero po fosforylacji przez obie kinazy. W ten sposób kalmodulina włącza się w regulację transportu jonów wapnia przez błony sar-

koplazmatycznego retikulum mięśnia sercowego, który to transport, jak uprzednio sądzono, regulował jedynie cAMP.

Ostatnio wykazano, że ATPaza transportująca wapń przez błony erytrocytów jest również aktywowana przez kalmodulinę (32—35, 116), ale nie poznano jeszcze jej mechanizmu aktywacji. Można jednak spekulować, że aktywacja ATPazy opiera się na podobnym mechanizmie, który wykryto w mięśniach sercowych.

Schulman i Greengard (117) wykazali, że aktywność kinazy fosforylującej białka błonowe mózgu o ciężarze cząsteczkowym 51 000 i 62 000 zależy od stężenia jonów wapnia i kalmoduliny. Autorzy ci stwierdzili, że podobne kinazy występują również w innych tkankach fosforylując różne białka błonowe (118). Wyizolowana następnie przez Waismana i wsp. kinaza (119) jest prawdopodobnie identyczna z kinazą badaną przez Schulmana i Greengarda (117).

Ostatnio wykazano obecność ATPazy aktywowanej przez kalmodulinę w błonach synaptosomalnych mózgu (120, 121). Charakter oddziaływań kalmoduliny z enzymem oraz mechanizm aktywacji pozostaje niewyjaśniony. Niewykluczone, że może on polegać, tak jak w przypadku ATPazy sarkoplazmatycznego retikulum serca, na fosforylacji jakiegoś białka błonowego będącego aktywatorem ATPazy. Fosforylację taką mogłaby katalizować kinaza opisana przez Schulmana i Greengarda (117).

Grab i wsp. znaleźli kalmodulinę i kinazę zależną od kalmoduliny w błonach postsynaptycznych mózgu (122) i stwierdzili, że w obecności wapnia fosforylacji ulegało białko tych błon o ciężarze 51 000 (123). DeLorenzo i wsp. (124), wykorzystując preparaty pęcherzyków synaptosomalnych wykazali, że wapń za pośrednictwem kalmoduliny aktywuje fosforylację określonych białek synaptosomalnych oraz równoległe stymuluje uwalnianie noradrenaliny z tych pęcherzyków. Fosforylacji ulegały białka o tym samym ciężarze cząsteczkowym, które fosforylowała kinaza opisana przez Schulmana i Greengarda (117). DeLorenzo i wsp. uważają (124), że kalmodulina wpływa nie tylko na uwalnianie noradrenaliny, lecz również na uwalnianie innych neurotransmiterów mózgu, takich jak acetylocholina i dopamina. Opierając się na nieopublikowanych jeszcze wynikach sugerują oni, że kalmodulina w podobny sposób jak w pęcherzykach synaptosomalnych mózgu, moduluje procesy wydzielnicze zależne od jonów wapnia w przysadce mózgowej i nadnerczach (124).

Nie sposób obecnie ustalić dokładniej związku między poszczególnymi reakcjami zależnymi od kalmoduliny i innymi procesami zachodzącymi w mózgu. Możliwe, że najbliższe lata przyniosą wyjaśnienie, które z tych reakcji współdziałają ze sobą w układach odpowiedzialnych za aktywność komórek mózgowych, tym bardziej, że przed takimi badaniami otwierają się nowe możliwości. Okazało się mianowicie, że niektóre leki

psychotropowe, będące pochodnymi fenotiazyny, hamują zależną od wapnia fosforylację białek synaptosomalnych i hamują uwalnianie noradrenaliny (124). Ponadto stwierdzono, że leki te hamują aktywność fosfodwuesterazy cyklicznych nukleotydów, zależnej od kalmoduliny, gdyż w obecności wapnia inaktywują kalmodulinę (69, 125). Pochodne fenotiazyny są więc selektywnymi inhibitorami procesów zależnych od kalmoduliny. Specyficzność ich działania polega na tym, że w niskich stężeniach wiążą się wyłącznie z kalmoduliną oraz, że wiązanie to zachodzi tylko w obecności wapnia (125). Pochodne fenotiazyny stanowią więc idealny instrument badawczy przy badaniach nad mechanizmem działania kalmoduliny *in vivo*.

V-6. Inne procesy enzymatyczne

W ostatnim czasie ukazały się doniesienia o innych enzymach zależnych od kalmoduliny. Jednym z nich jest kinaza fosforylująca NAD do NADP izolowana z nasion grochu (50). Jej aktywność zależy od stężenia jonów wapnia w tym samym zakresie stężeń, w którym zachodzi aktywacja zależnych od kalmoduliny enzymów izolowanych z komórek zwierzęcych.

Ponadto kinaza zależna od jonów wapnia i kalmoduliny katalizuje fosforylację oksygenazy tryptofanu (126), która dopiero wtedy osiąga wysoką aktywność. Według najnowszych prac kalmodulina aktywuje również fosfolipazę A_2 (127). Możliwe więc, że i w tym przypadku mechanizm aktywacji polega na fosforylacji, a nie na bezpośrednim oddziaływaniu kalmoduliny z fosfolipazą A_2 . Zestawiona w Tabeli 4 lista enzymów i procesów, których aktywność regulują jony wapnia za pośrednictwem kalmoduliny nie wydaje się jeszcze zamknięta. Być może większość procesów modulowanych przez jony wapnia w stężeniu około 10^{-5} M zależy od kalmoduliny. Niewykluczone, że w procesach tych kalmodulina działa wyłącznie jako aktywator kinaz, które fosforylują odpowiednie enzymy i zmieniają w ten sposób ich aktywność.

Na uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich reakcjach, w których bierze udział kalmodulina wykazuje ona brak specyficzności. Na przykład kalmodulina z mózgu, a nawet z *Physarum polycephalum* (48, 49) aktywuje w takim samym stopniu jak endogenna kalmodulina kinazę lekkiego łańcucha miozyny z mięśni. Nawet kalmodulina izolowana z roślin (50, 51) aktywuje fosfodwuesterazę z mózgu wołu, podobnie jak kalmodulina endogenna. Jest to możliwe dzięki minimalnym jedynie zmianom w składzie i sekwencji aminokwasowej jakie zachodziły w cząsteczce kalmoduliny w toku ewolucji.

Tabela 4

Udział kalmoduliny w procesach regulowanych przez Ca^{2+}

Enzym	Substrat	Piśmiennictwo
1. Enzymy metabolizmu cyklicznych nukleotydów: fosfodwuesteraza 3, 5' —cyklicznych nukleotydów cyklaza adenylanowa	cAMP, cGMP ATP	4, 7, 21, 22, 25, 29, 40, 70—72 11, 77—80
2. Kinazy	fosforylaza glikogenu } Syntaza glikogenu } białka błonowe NAD lekkie łańcuchy miozyny oksydaza tryptofanu	53, 85—91 112—115 50 95, 96, 100—104 106—111 126
3. Inne enzymy: ATPazy błonowe fosfolipaza A_2	ATP fosfoglicerydy	32—35, 119—121 127
4. Inne procesy: hamowanie polimeryzacji tubuliny stymulacja uwalniania neurotransmitterów		129—132 124

VI. Udział kalmoduliny w regulacji polimeryzacji tubuliny

Sukbomórkową lokalizację kalmoduliny w komórkach hodowanych *in vitro* badano stosując metodę pośredniej immunofluorescencji i wykonywając monospecyficzne przeciwciała przeciwko kalmodulinie. Wyniki otrzymane niezależnie w trzech laboratoriach (41, 42, 128) są w dużym stopniu zgodne. W interfacie obserwowano nieznaczną i równomierną fluorescencję cytoplazmy, chociaż wg *Welsh*a i wsp. (42) barwieniu ulegały również struktury zbudowane z pęczków filamentów aktyny (ang. *stress fibers*). Natomiast już w prometafazie zaobserwowano intensywną fluorescencję w rejonie skondensowanych chromosomów. Od tego momentu kalmodulina była związana z aparatem mitotycznym, jej występowanie jednakże nie pokrywało się z występowaniem tubuliny lub aktyny. W późniejszych etapach podziału komórkowego fluorescencję obserwowano głównie w rejonie mostków międzykomórkowych. Dane osiągnięte dzięki badaniom immunofluorescencyjnym dają podstawę do stwierdzenia, że kalmodulina jest związana w jakiś sposób z ruchem chromosomów, prawdopodobnie poprzez regulację polimeryzacji tubuliny (41, 42 oraz 69, 129). W równoległe prowadzonych badaniach *in vitro* stwier-

dzono, że kalmodulina hamuje polimeryzację tubuliny po związaniu wapnia (130—132). Jej działanie sprowadza się prawdopodobnie do wiązania dimeru tubuliny, a nie do oddziaływań z jakimś enzymem. W kompleksie z kalmoduliną tubulina nie może polimeryzować i pozostaje w postaci dimeru. Stwierdzono, że zdolność kalmoduliny do aktywacji fosfodwuesterazy nie zmienia się po jej związaniu z tubuliną. W tej sytuacji tubulinę można łatwo rozróżnić od innych białek wiążących w obecności wapnia kalmodulinę, gdyż hamują one aktywność fosfodwuesterazy (por. 73—76).

VII. Białka wiążące kalmodulinę

Równoległe z pracami nad funkcją kalmoduliny badano jej subkomórkową lokalizację. Już pierwsze prace wykazały, że ilość tego białka w supernatancie 100 000 g homogenatów mózgu zależy od stężenia wolnych jonów wapnia w buforze użytym do ekstrakcji (13, 17, 26). Gdy w próbie podczas homogenizacji był obecny wapń, znajdowano około 58% kalmoduliny w supernatancie. Natomiast gdy dodano EGTA lub EDTA do homogenatu, ilość kalmoduliny w supernatancie wzrastała do 77% (26). Sugerowało to, że oprócz zależnego od stężenia jonów wapnia wiązania kalmoduliny z białkami cytoplazmatycznymi (np. z fosfodwuesterazą) część jej była podobnie związana w nierozpuszczalnych frakcjach komórkowych. W osadzie otrzymanym po wirowaniu homogenatów mózgu przy 100 000 g około 23% kalmoduliny pozostawało jednakże związane nawet w nieobecności jonów wapnia i dopiero użycie detergentów lub trypsyny uwalniało tę kalmodulinę (26). Nieznane są inne właściwości miejsc wiążących kalmodulinę niezależnie od stężenia jonów wapnia.

W cytoplazmie, jak i w błonach komórkowych mózgu znaleziono kilka białek o nieznannej funkcji wiążących specyficznie kalmodulinę w obecności wapnia (73—76, 133—136). Niektóre z tych białek wiązały kalmodulinę nawet mimo dodania mocznika w wysokim stężeniu (137). W mózgu wołu wykryto cztery takie białka o ciężarze cząsteczkowym 140 000, 77 000, 61 000 i 22 000 (137). Szczególnie interesujące jest białko o ciężarze 22 000. Ma ono podobny ciężar cząsteczkowy do troponiny I z mięśni szkieletowych królika, wysoki punkt izoelektryczny oraz podobny skład aminokwasowy. Te właściwości, a w szczególności sposób wiązania kalmoduliny sprawiają, że niektórzy autorzy uważają to białko za funkcjonalny odpowiednik troponiny I z mięśni szkieletowych i sercowych charakterystyczny dla tkanek niemięśniowych (137). Brak jest jednak jakichkolwiek danych doświadczalnych na temat wpływu białka 22 000 daltonów na aktywność ATPazy aktomiozynowej, zarówno mięśni jak i komórek niemięśniowych. Wiadomo, że białko to hamuje aktywność

fosfodwuesterazy i dopiero kalmodulina zawierająca wapń odblokowuje to hamowanie. Białko 22 000 daltonów nie hamuje jednak, co dziwniejsze, aktywności kinazy lekkiego łańcucha miozyny (137).

Białka wiążące kalmodulinę mogą stanowić podjednostki enzymów aktywowanych przez kalmodulinę (por. V-1 na przykładzie fosfodwuesterazy), a także mogą regulować poziom kalmoduliny w komórce. Należy mieć nadzieję, iż w najbliższym czasie rola białka wiążących kalmodulinę zostanie lepiej wyjaśniona, a tym samym obraz działania kalmoduliny w komórce zostanie uzupełniony.

VIII. Kalmodulina a troponina C

Ze wszystkich homologicznych białek wiążących wapń kalmodulina wykazuje największe podobieństwo do troponiny C. Tak na przykład kalmodulina izolowana z mózgu wołu i troponina C z mięśni szybkich królika wykazują 77% homologii (por. tabela 2). Innymi słowy około $\frac{3}{4}$ miejsc w łańcuchu polipeptydowym obu białek zajmują aminokwasy identyczne lub zmiany jakie powstały są konserwatywne, tzn. obejmują zamianę na podobny aminokwas. Między troponiną C z mięśni szybkich królika, a troponiną C z mięśni sercowych wołu istnieje niewiele więcej, bo tylko 82% homologii (por. Tabela 2). Tak duże podobieństwo między troponiną C a kalmoduliną sugeruje, że oba białka mają również bardzo zbliżone właściwości biologiczne. Istotnie, kalmodulina może w pewnych warunkach zastępować działanie troponiny C *in vitro* (14, 15). W rekonstruowanym układzie składającym się z aktomiozyny i tropomiozyny z mięśni szkieletowych królika aktywność ATPazy aktomiozynowej jest hamowana w nieobecności wapnia przez dodanie pozostałych składników kompleksu troponiny — troponiny I i troponiny T. W obecności wapnia troponina C znosi to hamowanie dzięki specyficznej interakcji z troponiną I. Za tę interakcję wydaje się być odpowiedzialny odcinek α -heliksu w trzeciej domenie troponiny C, poprzedzający pętlę wiążącą wapń (por. Ryc. 1 i Tabela 2). Na krótkim odcinku dziesięciu aminokwasów, aż cztery to reszty kwasu glutaminowego. Homologiczny odcinek w cząsteczce kalmoduliny jest prawie identyczny, nic więc dziwnego, że białko to działa podobnie jak troponina C i odblokowuje hamujące działanie troponiny I. Są jednak pewne różnice w działaniu obu białek. W mięśniach, jak również w badaniach *in vitro*, troponina C wymaga obecności troponiny T, podczas gdy kalmodulina działa również w jego nieobecności.

W przeciwieństwie do wielofunkcyjnego charakteru kalmoduliny, jedyną poznaną funkcją troponiny C jest regulacja cyklu skurczowo-rozkurczowego mięśni poprzecznie prążkowanych. Nie udało się do tej pory wykazać aktywacji jakiegokolwiek enzymu zależnego od kalmoduliny przez troponinę C, dodaną w takim samym stężeniu. Niektórzy autorzy

sądzą, że ma to związek z brakiem w troponinie C trójmetylolizyny, aminokwasu znajdującego się w cząsteczce kalmoduliny. Przyszłość pokaże, czy ten fakt ma rzeczywiście jakieś znaczenie i, na ile charakterystyczne i wspólne dla wszystkich kalmodulin, niezależnie od pochodzenia, drobne odcinki łańcucha polipeptydowego przekazywane skrupulatnie w zapisie genetycznym przez miliony lat są tak istotne dla funkcji tego białka.

Zaakceptowano 28.3.1980

PIŚMIENNICTWO

1. Kretsinger R. H., (1979), *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **11**, 1—26.
2. Burrige M. J., (1979), w *Cyclic Nucleotides and Protein Phosphorylation in Cell Regulation*, red. Krause E.-G., Pinna L., Wollenberger A., t. 54, str. 91—100, Pergamon Press, Oxford.
3. Greengard P., (1978), *Science*, **199**, 146—152.
4. Kakiuchi S., Yamazaki R., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1104—1110.
5. Cheung W. Y., (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 533—538.
6. Cheung W. Y., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 2859—2869.
7. Teo T. S., Wang J. H., (1973), *J. Biol. Chem.*, **248**, 5950—5955.
8. Smoake J. A., Song S. Y., Cheung W. Y., (1974), *Biochim. Biophys. Acta*, **341**, 402—411.
9. Waisman D., Stevens F. C., Wang J. H., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 975—982.
10. Vanaman T. C., Sharief F., Awramik J. L., Mendel P. A., Watterson D. M., (1976), w *Contractile Systems in Non-Muscle Tissues*, red. Perry S. V., Margreth A., Adelstein R. S., str. 165—176, Biochemical Press, Elsevier, North Holland.
11. Cheung W. Y., Bradham L. S., Lynch T. S., Lin Y. M., Tallant E. A., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 1055—1062.
12. Singer A. L., Dunn A., Appleman M. M., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 406—413.
13. Drabikowski W., Kuźnicki J., Grabarek Z., (1978), *Comp. Biochem. Physiol.*, **60C**, 1—6.
14. Dedman J. R., Potter J. D., Means A. R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2437—2440.
15. Amphlett G. W., Vanaman T. C., Perry S. V., (1976), *FEBS Letters*, **72**, 163—168.
16. Kobayashi R., Field J. B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **539**, 411—419.
17. Drabikowski W., Kuźnicki J., Grabarek Z., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 124—133.
18. Muszbek L., Kuźnicki J., Szabo T., Drabikowski W., (1977), *FEBS Letters*, **80**, 308—312.
19. Childers S. R., Siegel F. L., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **405**, 99—108.
20. Watterson D. M., Eldik L. J., Smith R. E., Vanaman T. C., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2711—2715.
21. Lin Y. M., Liu Y. P., Cheung W. Y., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4943—4954.
22. Watterson D. M., Harrelson W. G., Keller P. M., Sharief F., Vanaman T. C., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 4501—4513.

23. Egrie J. C., Campbell J. A., Fiangas A. L., Siegel F. L., (1977), *J. Neurochem.*, **28**, 1207—1213.
24. Wolff D. J., Brostrom C. O., (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 349—358.
25. Vandermeers A., Vandermeers-Piret M., Rathe J., Kutzner R., Delforge A., Christophe J., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **81**, 379—386.
26. Kakiuchi S., Yamazaki R., Teshima Y., Uenishi K., Yasuda S., Kashiba A., Sobue Y., Ohshima M., Nakajima T., (1978), *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **9**, 253—263.
27. Murray A. W., Rogers A., (1978), *Biochem. J.*, **176**, 727—732.
28. Russel Y. T., Thorn N. A., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **491**, 398—408.
29. Donnelly T. E., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **542**, 245—252.
30. Nasu S., Shioji K., Ueda J., Tanigawa Y., Shimoyama M., (1978), *J. Biochem.*, **83**, 1449—1458.
31. Kuo J. F., Malveaux E. J., Patrick J. G., Davis C. W., Kuo W.-N., Pruitt A. W., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 785—796.
32. Jarret H. W., Penniston J. T., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1210—1216.
33. Luthra M. G., Au K. S., Hanahan D. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 678—686.
34. Gopinath R. M., Vincenzi F. F., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1203—1209.
35. Jarret H. W., Penniston J. T., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 4676—4682.
36. Hanahan D. J., Taverna R. D., Flynn D. D., Ekholm J. E., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1009—1015.
37. Kuo I. C. Y., Coffee C. J., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6315—6319.
38. Dedman J. R., Potter J. D., Means A. R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2437—2440.
39. Jones H. P., Bradford M. M., McRorie R. A., Cormier M. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1264—1272.
40. Lin Y. P., Schwartz H. S., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 186—193.
41. Dedman J. R., Welsh M. J., Means A. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 7515—7521.
42. Andersen B., Osborn M., Weber K., (1978), *Cytobiologie*, **17**, 354—364.
43. Burgess W. H., Howlett A. C., Kretsinger R. H., Gilman A. G., (1978), *J. Cycl. Nucl. Res.*, **4**, 175—181.
44. Jones H. P., Mathews J. C., Cormier M. J., (1979), *Biochemistry*, **18**, 55—60.
45. Gomes S. L., Mennucci L., Costa Maia J. C., (1979), *FEBS Letters*, **99**, 39—42.
46. Head J. S., Mader S., Kaminer B., (1979), *J. Cell Biol.*, **80**, 211—218.
47. Waisman D. M., Stevens F. C., Wang J. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1106—1113.
48. Kuźnicki J., Kuźnicki L., Drabikowski W., (1979), *Cell Biol. Inter. Rep.*, **3**, 17—23.
49. Kuźnicki J., Drabikowski W., (1979), w *Publications of the University of Innsbruck*, red. W. Sachsenmaier, t. 120, str. 99—105, Innsbruck.
50. Anderson J. M., Cormier M. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 595—602.
51. Charbonneau H., Cormier M. J., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1039—1047.
52. Grand R. J. A., Perry S. V., Weeks R. A., (1979), *Biochem. J.*, **177**, 521—529.

53. Cohen P., Burchell A., Foulkes J. G., Cohen P. T. W., Vanaman T. C., Nairn A. C., (1978), *FEBS Letters*, **92**, 287—293.
54. Dedman J. R., Potter J. D., Jackson R. L., Johnson J. D., Means A. R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 8415—8422.
55. Miyake M., Kakiuchi S., (1978), *Brain Res.*, **139**, 378—380.
56. Vanaman T. C., Sharief F., Watterson D. M., (1977), w *Calcium Binding Proteins and Calcium Function*, red. Wasserman R. H. i wsp., str. 107—116, Elsevier, North Holland, Amsterdam.
57. Grand R. J. A., Perry S. V., (1978), *FEBS Letters*, **92**, 137—142.
58. Dedman J. R., Jackson R. L., Schreiber W. E., Means A. R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 343—346.
59. Kłoczewiak M., Grabarek Z., Boguta G., Stępkowski D., Drabikowski W., (1980) XVII Zjazd P.T. Bioch. 118, Warszawa.
60. Walsh M., Stevens F. C., Kuźnicki J., Drabikowski W., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7440—7443.
61. Wolff D. J., Poirier P. G., Brostrom Ch. O., Brostrom M. A., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4108—4117.
62. Drabikowski W., Brzeska H., Venjaminov S., (1980), w *Proc. of 13th FEBS Meeting*, Jeruzalem, Izrael, 118.
63. Richman R. G., Klee C. B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 928—935.
64. Walsh M., Stevens F. C., (1977), *Biochemistry*, **16**, 2742—2749.
65. Richman P. G., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3001—3005.
66. Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H., (1979), *Biochemistry*, **18**, 722—729.
67. Walsh M., Stevens F. C., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3924—3930.
68. Klee C. B., (1977), *Biochemistry*, **16**, 1017—1024.
69. Wolff D. J., Brostrom Ch. O., (1979), *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, **11**, 26—88.
70. Donnelly T. E., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 964—970.
71. Egrie J. C., Siegel F. L., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 348—366.
72. Dumler I. L., Etingof R. N., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 474—484.
73. Klee C. B., Krinks M. H., (1978), *Biochemistry*, **17**, 120—126.
74. Richman P. G., Klee C. B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6323—6326.
75. Wallace R. W., Lynch T. Y., Tallant E. A., Cheung W. Y., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 328—334.
76. Wang J. H., Desai R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 4175—4184.
77. Bröstrom C. O., Huang Y.-C., Breckenridge B. Mcl., Wolff D. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 64—68.
78. Bröstrom M. A., Bröstrom C. O., Breckenridge B. Mcl., Wolff D. J., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 64—68.
79. Lynch T. J., Tallant A., Cheung W. Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 616—625.
80. Vandermeers A., Robberecht P., Vandermeers-Piret M.-C., Rathe J., Christophe J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1076—1081.
81. Kakiuchi S., Yamazaki R., Teshima Y., Uenishi K., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3526—3530.
82. Ho H. C., Teo T. S., Desai R., Wang J. H., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 461—473.
83. Bröstrom C. O., Wolff D. J., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 301—311.
84. Uzunov P., Lehne R., Revuelta A. V., Gnegy M. E., Costa E., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **422**, 326—334.

85. Rylatt D. B., Embi N., Cohen P., (1979), *FEBS Letters*, **98**, 76—80.
86. Srivastava A. K., Waisman D. M., Bröstrom Ch. O., Soderling T. R., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 583—586.
87. DePaoli-Roach A.A., Gibbs J.B., Roach P. J., (1979), *FEBS Letters*, **105**, 321—324.
88. Kishimoto A., Takai Y., Nishizuka Y., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7449—7452.
89. Soderling T. R., Sheoran V. S., Ericsson L. H., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 181—185.
90. Roach P. J., DePaoli-Roach A. A., Larner J., (1978), *J. Cycl. Nucl. Res.*, **4**, 245—247.
91. Cohen P., Picton C., Klee C. B., (1979), *FEBS Letters*, **104**, 25—30.
92. Adelstein R. S., (1977), *Trends in Biochem. Sci.*, **3**, 27—30.
93. Small J. V., Sobieszek A., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **76**, 521—530.
94. Dąbrowska R., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J., (1979), w *Motility and Cell Function. Proc. of the First John M. Marshall Symposium in Cell Biology*, str. 147—160, Academic Press, Inc.
95. Dąbrowska R., Aromatorio D., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1263—1272.
96. Dąbrowska R., Sherry J. M., Aromatorio D. K., Hartshorne D. J., (1978), *Biochemistry*, **17**, 253—258.
97. Silver P. J., DiSalvo J., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 9951—9954.
98. Adelstein R. S., Conti M. A., Hathaway D. R., Klee C. B., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8347—8350.
99. Perry S. V., (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, **7**, 593—617.
100. Yazawa M., Yagi K., (1977), *J. Biochem.*, **82**, 287—289.
101. Yagi K., Yazawa M., Kakiuchi S., Ohshima M., Uenishi K., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 1338—1340.
102. Baryłko B., Kuźnicki J., Drabikowski W., (1978), *FEBS Letters*, **90**, 301—304.
103. Nairn A. C., Perry S. V., (1979), *Biochem. J.*, **179**, 89—97.
104. Walsh M. P., Vallet B., Austrie F., Demaille I. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 12136—12144.
105. Hitchcock S., (1977), *J. Cell Biol.*, **74**, 1—15.
106. Dąbrowska R., Hartshorne D. J., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1352—1359.
107. Adelstein R. S., Conti M. A., (1975), *Nature*, (London), **256**, 597—598.
108. Hathaway D. R., Adelstein R. S., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1653—1657.
109. Yerna M.-Y., Dąbrowska R., Hartshorne D. J., Goldman R. D., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 184—188.
110. Trotter J. A., Adelstein R. S., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 8781—8785.
111. Scholey J. M., Kendrick-Jones J., (1979), w *Proc. 8th European Conference on Muscle and Motility*, Heidelberg, Abstract 60.
112. Katz S., Remtulla M. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1373—1379.
113. LePeuch Ch. J., Haiech J., Demaille J. G., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5150—5157.
114. Wollenberger A., Will H., (1978), *Life Sciences*, **22**, 1159—1178.
115. Will H., Wollenberger A., Levchenko T. S., Levitsky D. O., (1979), w *Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation in Cell Regulation*, red. Krauze E.-G., Pinna L., Wollenberger, t. 54, 135—146, Pergamon Press, Oxford.

116. Au K. S., Lee C. M., (1978), *Inter. J. Biochem.*, 9, 339—341.
117. Schulman H., Greengard P., (1978), *Nature*, 271, 478—479.
118. Schulman H., Greengard P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 5432—5436.
119. Waisman D. M., Singh T. Y., Wang J. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 3387—3391.
120. Sobue K., Ichida S., Yoshida H., Yamazaki R., Kakiuchi S., (1979), *FEBS Letters*, 99, 199—202.
121. Kuo G.-H., Ichida S., Matsuda T., Kakiuchi S., Yoshida H., (1979), *Life Sciences*, 25, 235—240.
122. Grab D. J., Berzins K., Cohen R. S., Siekevitz P., (1979), *J. Biol. Chem.*, 254, 8690—8696.
123. Grab D. J., Siekevitz P., (1979), *J. Cell Biol.*, 83, 131a.
124. DeLorenzo R. J., Freedman S. D., Yohe W. B., Maurer S. C., (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 1838—1842.
125. Levin R. M., Weiss B., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, 540, 197—204.
126. Yamauchi T., Fujisawa H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 28—35.
127. Wong P. Y.-K., Cheung W. Y., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 90, 473—480.
128. Jockusch B. M., Kuźnicki J., (1979), niepublikowane.
129. Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R., (1979), *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, 11, 131—174.
130. Marcum J. M., Dedman J. R., Brinkley B. R., Means A. R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 3771—3775.
131. Nishida E., Kumagai H., Ohtsuki I., Sakai H., (1979), *J. Biochem.*, 85, 1257—1266.
132. Kumagai H., Nishida E., (1979), *J. Biochem.*, 85, 1267—1274.
133. Wang J. H., Desai R., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 926—932.
134. Sharma R. K., Desai R., Thompson T. R., Wang J. H., (1978), *Canad. J. Biochem.*, 56, 598—604.
135. Sharma R. K., Wirch E., Wang J. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 3575—3581.
136. Gnegy M. E., Nathanson J. A., Uzunov P., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, 497, 75—85.
137. Grand R. J. A., Perry S. V., (1979), *Biochem J.*, 183, 285—295.

RYSZARD FARBISZEWSKI *, HALINA GABRYEL **

Znaczenie reszt arginylowych dla funkcji biologicznej peptydów i białek

Role of Arginine Residues in the Biological Function of Peptides and Proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Odczynniki stosowane do modyfikacji reszt arginylowych
- III. Reszty arginylowe jako reaktywne grupy enzymów
- IV. Reszty arginylowe jako grupy aktywne hormonów peptydowych i białkowych
- V. Reszty arginylowe jako miejsca kontaktowe wiążące ligandy anionowe
- VI. Reszty arginylowe białek o różnych właściwościach biologicznych
- VII. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Reagents used for modification of arginine residues
- III. Arginine residues as reactive groups of enzymes
- IV. Arginine residues as active groups of some peptide and protein hormones
- V. Arginine residues as contact sites binding the anionic ligands
- VI. Arginine residues in proteins of various biological properties
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Większość poznanych enzymów działa na ujemnie naładowane substraty lub wymaga anionowych kofaktorów. Fakt ten skierował uwagę badaczy na reszty aminokwasów zasadowych: arginylowe, lizylowe i histydylowe, które mogą odgrywać ważną rolę w katalizie enzymatycznej. Zastosowanie odczynników dwukarbonylowych do chemicznej modyfikacji

* Doc. dr hab., ** mgr chem., Zakład Chemii Nieorganicznej Instytutu Chemii i Biofizyki Akademii Medycznej w Białymstoku.

reszt arginylowych w enzymach pozwoliło wykazać, że pełnią one w centrum aktywnym rolę miejsc rozpoznających ujemnie naładowane substraty lub kofaktory*.

Ponadto można sądzić, że reszty arginyłowe stanowią grupy czynne niektórych hormonów peptydowych i białkowych, bowiem zablokowanie grup guanidynowych swoistymi odczynnikami powoduje utratę lub znaczny spadek czynności biologicznej.

Powyższe spostrzeżenia skłoniły autorów do przedstawienia Czytelnikowi wszystkich poznanych dotychczas enzymów, w których reszty arginyłowe znajdują się w centrum aktywnym i pełnią w nim rolę aminokwasów kontaktowych, pomocniczych lub stabilizujących strukturę przestrzenną. Podano też zestawienie hormonów peptydowych i białkowych, których rola zależy od obecności w nich reszt arginylowych. Dalej omówiono białka krwi, w których grupy guanidynowe arginyliny są miejscami wiążącymi ligandy anionowe. Ostatni podrozdział artykułu poświęcono omówieniu roli reszt arginylowych w białkach o różnych właściwościach biologicznych.

II. Odczynniki stosowane do modyfikacji reszt arginylowych

Swoiste odczynniki modyfikujące reszty arginyłowe w peptydach i białkach reagują z grupami guanidynowymi. Aby wykazać rolę reszt arginylowych w strukturze centrum aktywnego enzymu, czy białka o czynności hormonalnej blokuje się grupy guanidynowe wybiórczo reagującymi odczynnikami, a następnie bada się zależności między liczbą zmodyfikowanych reszt arginylowych a zmianą aktywności enzymu lub czynności hormonalnej. Stopień modyfikacji peptydu lub białka określa się poprzez analizę składu aminokwasowego lub spektrofotometrycznie (1).

Do chemicznej modyfikacji reszt arginylowych w białkach stosowane są najczęściej odczynniki o niskim ciężarze cząsteczkowym zawierające ugrupowania α, α' -dwukarbonyłowe: gliksal (2—5) i jego podstawione pochodne: metylogliksal i fenylogliksal (6—9) oraz α, α' -dwuketony: butanodion-2,3 (10—14), cykloheksanodion-1,2 (15—22). Mogą być również stosowane związki zawierające ugrupowania dwukarbonyłowe w pozycji 1,3 lub 2,4.

Ujemną właściwością odczynników zawierających grupy α, α' -dwukarbonyłowe jest ich zdolność reagowania również z grupami ϵ -aminowymi lizyny. Należy także pamiętać, że całkowita lub częściowa inaktywacja białka może nastąpić w wyniku zniszczenia struktury trzeciorzędowej.

* Znaczenie reszt arginylowych jako grup reaktywnych w kilku wybranych enzymach zostało omówione krótko w podrozdziale pracy przeglądowej G. Myszynskiej w „Postęпах Biochemii” (1978, 24, 481—493).

dowej na skutek zastosowania zbyt drastycznych warunków reakcji, pomimo, że ważna dla czynności biologicznej grupa guanidynowa nie ulega modyfikacji. Warunki modyfikacji muszą więc być tak dobrane, aby wspomniane uboczne reakcje nie zachodziły i aby modyfikacja dotyczyła wyłącznie reszt arginylowych.

O liczbie zmodyfikowanych reszt arginylowych decyduje w znacznym stopniu pH środowiska, powodującego określony stan jonizacji aminokwasów i wpływającego na konformację cząsteczek białka i ich podjednostek. Istotny wpływ na stopień modyfikacji ma także stężenie i rodzaj buforu oraz stężenie odczynnika reagującego.

Na podstawie badań porównawczych wymienionych odczynników przyjmuje się, że fenylglioksal wykazuje najwyższą wybiórczość w stosunku do grup guanidynowych argininy, a zatem i największą przydatność do modyfikacji reszt arginylowych peptydów i białek (6, 23, 24).

Dokładne dane o reakcjach grup guanidynowych argininy z podanymi odczynnikami oraz o warunkach przeprowadzenia tych reakcji może znaleźć Czytelnik w artykule przeglądowym opublikowanym w *Wiadomościach Chemicznych* (25).

III. Reszty arginylowe jako grupy reaktywne enzymów *

Protonowane grupy guanidynowe reszt arginylowych wielu enzymów spełniają rolę miejsc wiążących anionowe substraty lub kofaktory zarówno kowalencyjnie jak i siłami kulombowskimi. Reszty arginylowe mają szczególne znaczenie dla centrum aktywnego tych enzymów, których substraty posiadają ujemnie naładowane reszty fosforanowe lub reszty karboksylowe (22, 26—29) oraz w centrum aktywnym enzymów, działających przy udziale wysokoenergetycznych produktów pośrednich (26, 30—32).

W tabeli 1 zestawiono poznane dotychczas enzymy, w których metodą modyfikacji chemicznej stwierdzono istotne znaczenie reszt arginylowych w czynności enzymatycznej. Podano w niej również liczbę reszt odpowiedzialnych za wiązanie ujemnie naładowanych substratów lub kofaktorów oraz ich położenie w cząsteczce białka. Ponadto w Tabeli 1 podano rodzaj odczynnika chemicznego, zastosowanego do modyfikacji.

Należy podkreślić, że odczynniki modyfikujące reszty arginylowe enzymów powodują ich inaktywację tylko w przypadku, gdy reszty te oddziałują bezpośrednio z cząsteczką substratu. Na przykład w wyizolowanej z *Escherichia coli* fosfatazie alkalicznej (EC 3.1.3.1) w wyniku reakcji z butanodionem-2,3 w obecności fosforanu modyfikacji ulega 13

* Ostatnio ukazała się praca G. T. Jamesa udawniająca istotne znaczenie dwóch spośród 20 reszt arginylowych w podjednostce enzymu arylosulfatazy A (EC 3.1.6.1.) dla jego aktywności (*Arch. Biochem. Biophys.* (1979), 197, 57—62).

Enzymy, których aktywność uzależniona jest od reszt arginylowych

Lp.	Enzym	Odczynnik modyfikujący	Rola, liczba i położenie reszt arginylowych w cząsteczce enzymu	Piśmiennictwo
1	2	3	4	5
1	Dehydrogenaza alkoholowa (oksydoreduktaza alkohol: NAD) [EC 1.1.1.1] wyizolowana z wątroby ludzkiej, wątroby konia i z drożdży	butanodion-2,3 lub fenyloglioksal	Reszty arginylowe są składnikiem obszaru wiążącego NADH	(33)
2	Dehydrogenaza mleczanowa (oksydoreduktaza L-mleczan: NAD) [EC 1.1.1.27] wyizolowana a) z serca i mięśni świni b) z serca wołu	fenyloglioksal butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa na podjednostkę bierze udział w wiązaniu substratu i jest modyfikowana przez fenyloglioksal Trzy reszty arginylowe na podjednostkę decydują o aktywności enzymatycznej	(34)
3	Dehydrogenaza jabłczanowa (oksydoreduktaza L-jabłczan: NAD/[EC 1.1.1.37] wyizolowana z cytoplazmy serca świni	butanodion-2,3	Dwie spośród czterech modyfikowanych reszt w cząsteczce enzymu odgrywa zasadniczą rolę w aktywności enzymatycznej	(36)
4	Dehydrogenaza aldehydowa (NADP) (oksydoreduktaza aldehyd: NADP) [EC 1.2.1.4] wyizolowana z nerki świni	butanodion-2,3, fenyloglioksal, metyloglioksal, cykloheksanodion-1,2	Jedna reszta arginylowa bierze udział w wiązaniu kofaktora	(37)
5	Dehydrogenaza fosfogliceraldehydowa (oksydoreduktaza aldehyd 3-fosfo-D-glicerynowy: NADP) [EC 1.2.1.9] wyizolowana z mięśni szkieletowych szczura	butanodion-2,3	Dwie reszty arginylowe na podjednostkę enzymu (tetrameru) są modyfikowane, jedna z nich jest niezbędna dla aktywności enzymatycznej	(38)
6	Dehydrogenaza acyloCoA [EC 1.3.99.3] wyizolowana z wątroby szczura	butanodion-2,3 lub cykloheksanodion-1,2	Dwie reszty arginylowe modyfikowane powodują utratę 75% aktywności enzymatycznej	(39)

1	2	3	4	5
7	Dehydrogenaza glutaminianowa (oksydoreduktaza L-glutaminian: NAD) wyizolowana a) z wątroby wołowej [EC 1.4.1.2] b) z <i>Neurospora</i> [EC 1.4.1.4]	cykloheksanodion-1,2	1. Modyfikacja dwóch reszt arginylowych na podjednostkę całkowicie inaktywuje enzym. Prawdopodobnie jedna reszta arginylowa występuje w miejscu wiążącym NADP lub w jego pobliżu	(40)
8	Oksydoreduktaza fotosyntetyczna. Zredukowany NADP-ferrodoxyna [EC 1.6.7.1] wyizolowana z glonu <i>Bumilleriopsis filiformis</i>	butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa spośród dwóch modyfikowanych odpowiada za wiązanie nukleotydu pirymidynowego w aktywnym centrum	(41, 42)
9	Syntetaza tymidylowa [EC 2.1.1.45] wyizolowana z <i>Lactobacillus casei</i>	butanodion-2,3	Reszty arginylowe uczestniczą w wiązaniu dUMP poprzez interakcję z cząsteczką fosforanową lub przez interakcję elektrostatyczną grupy guanidynowej z grupami karboksylowymi (+)-CH ₂ FH ₄	(43)
10	Karbamoilotransferaza asparaginianowa (karbamoilotransferaza karbamoilofosoran: L-asparaginian) [EC 2.1.3.2] wyizolowana z <i>E. coli</i>	fenyloglioksal	Jedna reszta arginylowa spośród 24 modyfikowanych w cząsteczce odgrywa rolę w centrum aktywnym enzymu, 2 reszty w centrum allosterycznym	(23, 28)
11	Aminotransferaza asparaginianowa (aminotransferaza L-asparaginian: 2-oksoglutaran) [EC 2.6.1.1] wyizolowana z cytosolu serca kurczęcia	cykloheksanodion-1,2	Jedna reszta arginylowa spośród dwóch modyfikowanych na jednostkę enzymu bierze udział w budowie centrum aktywnego	(44)
12	Heksokinaza (6-fosfotransferaza ATP: D-heksoza) [EC 2.7.1.1.] wyizolowana z drożdży	fenyloglioksal	Jedna reszta arginylowa modyfikowana na podjednostkę enzymu odpowiada za wiązanie kofaktora	(45, 46)
13	Kimaza białkowa (fosfotransferaza ATP: białko) [EC 2.7.1.37] wyizolowana z mięśni szkieletowych królika	fenyloglioksal	Reszta arginylowa, położona w pobliżu centrum aktywnego enzymu służy jako miejsce rozpoznawcze substratu, dzięki interakcji z resztą arginylową jednostki peptydowej i+3 w cząsteczce substratu utrzymywana jest odpowiednia konformacja przestrzenna centrum aktywnego umożliwiająca fosforylację reszty serynowej substratu	(47)

Tabela 1. c.d.

1	2	3	4	5
14	Kinaza pirogronianowa (fosfotransferaza ATP: pirogronian) [EC 2.7.1.40] wyizolowana a) z serca świni b) z mięśni królika c) z mięśni królika	fenylogliksal butanodion-2,3	Sześć reszt arginylnych (po 3 na podjednostkę) odpowiada za aktywność enzymatyczną. Jedna reszta arginylna modyfikowana na podjednostkę inaktywuje całkowicie enzym. Reszta ta jest zlokalizowana w pobliżu miejsca wiążącego fosforan z fosfoenolpirogronianu.	(48) (49)
15	Kinaza fosfoglicerynianowa (1-fosfotransferaza ATP: 3-fosfo-D-glicerynian) [EC 2.7.2.3] wyizolowana z drożdży	butanodion-2,3 butanodion-2,3 lub cykloheksanodion-1,2	Co najmniej jedna reszta arginylna modyfikowana na cząsteczkę enzymu odpowiada za wiązanie ko-faktora	(50) (51)
16	Syntetaza karbamiofosforanowa (fosfotransferaza ATP: karbaminian (defosforylująca) [EC 2.7.2.9] wyizolowana z <i>E. coli</i>	fenylogliksal	Reszty arginylnowe biorą udział w wiązaniu ATP	(26)
17	Kinaza kreatynowa (fosfotransferaza ATP: kreatyna) [EC 2.7.3.2] wyizolowana z mięśni królika	butanodion-2,3 lub fenylogliksal	Jedna reszta arginylna na podjednostkę dimerycznego enzymu jest miejscem rozpoznawczym dla ujemnie naładowanych grup oligofosforanowych nukleotydu	(30)
18	Kinaza adenylowa (fosfotransferaza ATP: AMP) [EC 2.7.4.3] wyizolowana a) z serca świni b) z mięśni szkieletowych królika	fenylogliksal fenylogliksal	Jedna reszta arginylna modyfikowana w pozycji 97, spośród 11 zawartych w cząsteczce enzymu, spełnia funkcję katalityczną	(9) (52)
19	Fosfogliceromutaza (fosfotransferaza 2,3-dwufosfo-D-glicerynian: 2-fosfo-D-glicerynian) [EC 2.7.5.3] wyizolowana a) z mięśni królika b) z drożdży	butanodion-2,3 cykloheksanodion-1,2	Cztery reszty arginylnowe (po jednej na podjednostkę enzymu (tetramer) biorą udział w wiązaniu substratu	(53) (54)

Tabela 1. c. d.

1	2	3	4	5
20	Nukleotydylotransferaza DNA (deoksynukleotydylotransferaza deoksynukleozydytrójforan: DNA) [EC 2.7.7.7] wyizolowana z wirusów typu C RNA	butanodion-2,3	Reszty arginylowe odgrywiają rolę w wiązaniu matrycy RNA z centrum aktywnym enzymu	(55)
21	Siarkotransferaza tiosiarczanaowa (siarkotransferaza tiosiarczana: cyjanek) [EC 2.8.1.1] wyizolowana z wątroby wółu	fenyloglioksal	Jedna reszta arginylowa w pozycji 186 łańcucha peptydowego odgrywa rolę w wiązaniu substratu	(56)
22	Fosfataza alkaliczna (fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych [EC 3.1.3.1] wyizolowana z <i>E. coli</i> a) z <i>E. coli</i> b) z nerki świni	fenyloglioksal fenyloglioksal i butanodion-2,3	Dwie reszty arginylowe, spośród 56 zawartych w dimerycznej cząsteczce enzymu, biorą udział w wiązaniu NADH	(24) (57)
23	Fosfataza kwaśna (fosfohydrolaza monoestrów ortofosforanowych) [EC 3.1.3.2] wyizolowana z gruczołu krokowego ludzi	butanodion-2,3 lub cykloheksanodion-1,2	Co najmniej dwie reszty arginylowe w dimerycznej cząsteczce odgrywiają rolę w aktywności enzymatycznej	(15)
24	Heksozodwufosfataza (fosfohydrolaza D-fruktozo-1,6-dwufosforanowa) [EC 3.1.3.11] wyizolowana z nerki świni	butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa w każdej podjednostce tetramerycznej cząsteczki odgrywa istotną rolę w aktywacji enzymu przez jednowartościowe kationy	(58)
25	Rybonukleaza T ₁ [EC 3.1.4.8] wyizolowana z <i>Aspergillus oryzae</i> (oligonukleotydohydrolaza 3'-guanylo-rybonukleinanu)	fenyloglioksal i glioksal	Jedna reszta arginylowa, położona w centrum aktywnym enzymu lub w pobliżu niego, jest miejscem wiążącym substrat (lub bierze udział w tworzeniu konformacji przestirzanej centrum aktywnego)	(7)

Tabela 1. c.d.

1	2	3	4	5
26	Rybonukleaza A [EC 3.1.4.22] wyizolowana z trzustki wołu (oligonukleotydohydrolaza 3'-pirymidynorybonukleinianu)	cykloheksanodion-1,2	Modyfikacji ulegają 3 reszty arginylowe: w pozycji 39, 85 i 10, z czego dwie: Arg-39, Arg-85 odgrywiają zasadniczą rolę w tworzeniu centrum aktywnego	(1,22)
27	Lizozym (N-acetylmuramyl-hydrolaza mukopeptydu) [EC 3.2.1.17] wyizolowany z białka jaja kurzego	pentanodion-2,4 cykloheksanodion-1,2	Dwie reszty arginylowe w pozycji 5 i 14 spośród jedenastu modyfikowanych odgrywają rolę w tworzeniu struktury α -helikalnej enzymu	(1) (22)
28	Karboksypeptydaza A (hydrolaza peptydylol-L-aminokwasu) [EC 3.4.12.2] z trzustki wołu	butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa modyfikowana obniża znacznie aktywność peptydazową przy 3-krotnym wzroście aktywności esterazowej	(12,59)
29	ATP-aza (fosfohydrolaza ATP) [EC 3.6.1.3] wyizolowana a) z chromosomów <i>Rhodospirillum rubrum</i> b) z retikulum sarkoplazmatycznego królika	fenyloglioksal lub butanodion-2,3 butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa bierze udział w interakcji centrum aktywnego enzymu — substrat	(32) (31)
30	Dekarboksylaza glutaminianowa (1-karboksyliaza L-glutaminianu) [EC 4.1.1.15] wyizolowana z mózgu myszy i z <i>E. coli</i>	fenyloglioksal	Reszty arginylowe odgrywają rolę w wiązaniu substratu, o dwóch grupach karboksylowych	(60)
31	Karboksylaza fosfopirogranianowa (karboksyliaza ortofosforan:szczawiooctan) [EC 4.1.1.37] wyizolowana z <i>E. coli</i>	butanodion-2,3	Modyfikacja 7 z 49 reszt arginylowych powoduje całkowitą inaktywację enzymu. Jedna reszta arginylowa jest niezbędna dla aktywności katalitycznej, a dwie są konieczne do regulacyjnego oddziaływania z fruktozo-1,6-dwufosforanem	(61)

Tabela 1. c.d.

1	2	3	4	5
32	Karboksyłaza rybulozodwufosforanowa (karboksylaza 3-fosfo-D-glicerynianu [EC 4.1.1.39] wyizolowana a) z <i>Nicotiana tabacum</i> b) z <i>Pseudomonas oxalaticus</i> c) ze szpinaku	butanodion-2,3 butanodion-2,3 fenylogliksal	Reszty arginyłowe biorą udział w budowie centrum aktywnego enzymu i wiążą fosforylowany substrat	(62) (63) (64)
33	Aldolaza fruktוזodwufosforanowa (D-gliceraldehydo-3-fosforanoliaza fruktozo-1,6-dwufosforanu) [EC 4.1.2.13] wyizolowana z mięśni królika	fenylogliksal butanodion-2,3	Jedna reszta arginyłowa, z 13 zawartych w podjednostce enzymu, w położeniu C-1, bierze udział w wiązaniu substratu. Reszty arginyłowe położone są w miejscu wiążącym inhibitor allosteryczny, adenozynomonofosforan.	(8) (27)
34	Hydrataza fosfopirogronianowa (hydroliaza 2-fosfo-D-glicerynianu) [EC 4.2.1.11] wyizolowana z drożdży	butanodion-2,3	Jedna reszta arginyłowa, na podjednostkę enzymu, zlokalizowana w pobliżu miejsca wiążącego substrat, jest niezbędna do aktywności enzymatycznej. Całkowitej inaktywacji enzymu towarzyszy modyfikacja 2 reszt arginyłowych na podjednostkę	(65), (66)
35	Dehydrataza D-serynowa (hydroliaza D-seryny) (dezasminująca) [EC 4.2.1.14] wyizolowana z <i>E. coli</i>	butanodion-2,3 lub fenylogliksal	Jedna reszta arginyłowa modyfikowana odpowiada za wiązanie koenzymu: fosforanu pirydoksalu	(67)
36	Desulphydraza cysteinowa (siarkowodoroliaza L-cysteiny) (dezasminująca) EC 4.4.1.1] wyizolowana z wątroby szczura	butanodion-2,3	Reszty arginyłowe, położone w punkcie 1' miejsca C ₃ i 1' miejsca C ₄ są istotne w aktywności enzymatycznej	(68)

Tabela 1. c.d.

1	2	3	4	5
37	Syntetaza glutaminowa (ligaza D-glutaminian: amoniak (ADP) [EC 6.3.1.2] wyizolowana z mózgu owcy	fenyloglioksal	Reszty arginylowe biorą udział w wiązaniu ATP	(26)
38	Czynnik elongacyjny T ₄ wyizolowany z <i>E. coli</i>	butanodion-2,3	Jedna reszta arginylowa jest odpowiedzialna za aktywność enzymu	(69)

reszt arginylowych bez utraty aktywności enzymu; w nieobecności fosforanu z butanodionem-2,3 reaguje 15 reszt arginylowych, powodując prawie całkowitą inaktywację (24). Utrata właściwości katalitycznych ma zatem związek z modyfikacją 2 reszt arginylowych w cząsteczce enzymu o strukturze dimerycznej. Reszty te warunkują równocześnie aktywność hydrolityczną i transferazową fosfatazy alkalicznej. Analogi substratów chronią fosfatazę przed inaktywacją zapobiegając modyfikacji zapewne tych samych dwóch reszt arginylowych w cząsteczce enzymu (24).

Stwierdzono, że w przypadku modyfikacji chemicznej enzymów wykazujących aktywność w stosunku do różnych substratów utrata zdolności katalizowania jednego typu reakcji nie ogranicza zdolności katalizowania drugiego (70). Na przykład po zablokowaniu w karboksypeptydazie A jednej reszty arginylowej butanodionem-2,3 w środowisku buforu boranowego o pH 8,6 dochodzi do znacznego spadku aktywności peptydazowej przy prawie trzykrotnym wzroście aktywności esterazowej. Wskazuje to na różny mechanizm działania dwu form molekularnych enzymu różniących się konformacją (70). Dodatkowo ładunki reszt arginylowych stanowią wyłącznie miejsce rozpoznające peptyd, zaś inne ugrupowania w cząsteczce decydują o aktywności esterazowej.

IV. Reszty arginyłowe jako grupy czynne niektórych hormonów peptydowych i białkowych

Wiele prac wskazuje na ważną rolę reszt arginylowych w strukturze i funkcji hormonów. Stwierdzono, że owczy hormon luteinizujący (LH lub ICSH) wytwarzany przez przedni płat przysadki mózgowej (71, 72) zawiera 11 grup guanidynowych argininy (3 w podjednostce α , 8 w podjednostce β) z których kilka, zlokalizowanych w jednej podjednostce, decyduje o funkcji hormonu. Reakcja hormonu z cykloheksanodionem nie niszczy jego struktury czwartorzędowej. Modyfikacja pierwszej grupy guanidynowej powoduje 50%ową utratę czynności, zaś modyfikacja dalszych 7—8 reszt arginylowych prowadzi do utraty 85% czynności hormonalnej (71).

Stwierdzono również, że w otrzymanym drogą syntezy hormonie stymulującym uwalnianie hormonu luteinizującego dodatkowo naładowana reszta arginyłowa w pozycji 8 łańcucha peptydowego uczestniczy w wiązaniu hormonu przez specyficzne receptory komórek gruczołu przysadkowego (73, 74). Tabela 2 zawiera zestawienie hormonów, których czynność uzależniona jest od reszt arginylowych, oraz przegląd piśmiennictwa na ten temat.

Tabela 2

Hormony peptydowe i białkowe, których reszty arginyłowe odgrywają istotną rolę w funkcji biologicznej

Lp.	Hormon	Odczynnik modyfikujący	Ilość i położenie reszt arginyłowych decydujących o funkcji hormonu	Piśmiennictwo
1	Insulina wyizolowana z kaszalota	fenyloglioksal	Jedna reszta arginyłowa w pozycji 22 łańcucha „B”	(75)
2	Hormon luteinizujący wyizolowany z przysadki mózgowej owiec (LH lub ICSH)	cykloheksanodion-1,2	7—8 reszt arginyłowych w jednym łańcuchu hormonu	(72) (71)
3	Hormon stymulujący pęcherzyki Graffa (FSH), wyizolowany z przysadki mózgowej ludzi	fenyloglioksal	3 reszty arginyłowe w łańcuchu β i 2 w łańcuchu α hormonu	(76)
4	Syntetyczny hormon stymulujący uwalnianie hormonu luteinizującego (LH—RH)	cykloheksanodion-1,2	Jedna reszta arginyłowa w pozycji 8 łańcucha peptydowego	(73)

V. Reszty arginyłowe białek jako miejsca wiążące ligandy anionowe

Spośród białek krwi szczególną uwagę wielu autorów zwraca albumina, która ma największą zdolność wiązania ligandów anionowych (77, 78). Należy podkreślić, że cząsteczki albuminy posiadają powinowactwo wobec ligandów nawet w środowisku o wartościach pH, w których same wykazują charakter anionowy (78).

Stwierdzono, że w I-rzędowej strukturze cząsteczki albuminy wołowej (zawierającej 22 reszty arginyłowe, na 96 reszt aminokwasów zasadowych przy masie cząsteczkowej albuminy 65.000 daltonów) występują pewne obszary silnie hydrofobowe, w obrębie których reszty arginyłowe odpowiedzialne są za wiązanie kwasów tłuszczowych, detergentów anionowych i 1-anilinonaftaleno-8-sulfonianu (ANS) służącego do badań fluorescencji (78). Fluorescencja ANS związanego *in vitro* z albuminą surowicy wołowej w obecności alifatycznych kwasów tłuszczowych (kwasu palmitynowego i lauryłowego) jest mniejsza w porównaniu z fluorescencją samej albuminy. ANS konkuruje z kwasami tłuszczowymi o miejsca wiążące (79). Zjawisko to dotyczy również albuminy ludzkiej i króliczej.

Degradacja albuminy przez α -chymotrypsynę i następnie frakcjonowanie heterogennych peptydów pozwoliło bliżej scharakteryzować obszar wiążący ligandy anionowe. Jedna z frakcji stanowiąca blisko 20% masy cząsteczkowej albuminy, zawierająca głównie reszty arginyłowe oraz liczne reszty aminokwasów hydrofobowych (w tym 1 reszta tryptofanu) wykazywała znaczne powinowactwo do ANS (78). Modyfikacja reszt arginyłowych tej frakcji za pomocą gliksalu powodowała prawie całkowitą utratę zdolności wiązania ANS.

Wyniki innych badań również potwierdzają, że pewne obszary w cząsteczce albuminy, wiążące ligandy anionowe, m.in. jony tiocyjanianowe (SCN^-) zawierają silnie dodatnio naładowane grupy guanidynowe reszt arginyłowych (80).

Wykazano również, że w wiązaniu przez albuminę ludzką wielu związków chemicznych, w tym leków, biorą udział reszty arginyłowe. Mechanizmy takich wiązań od dawna są przedmiotem zainteresowania zarówno farmakologów, usiłujących wyjaśnić szybkość i siłę działania leku oraz jego rozmieszczenie w organizmie, jak i biochemików, którzy zjawiska te rozpatrują od strony natury oddziaływań białko-ligand. Niedawno stwierdzono, że zablokowanie 10 reszt arginyłowych w cząsteczce albuminy ludzkiej przez cykloheksanodion-1,2 powoduje całkowitą utratę zdolności wiązania diazepamu — pochodnej benzodwiazepiny o właściwościach psychotropowych, a znacznie zmniejsza oddziaływanie reszt arginyłowych z lekami o działaniu przeciwwzapalnym i przeciwbólowym: indometacyną — pochodną kwasu 2-metyloindolo-3-octowego oraz fenyllobutazonem (83).

W grupie białek wiążących metale, występujących w płynach ustrojowych kręgowców zwracają uwagę transferyny. Każda cząsteczka transferyny wiąże dwa jony Fe^{+3} w dwu prawie identycznych obszarach, tworząc mało stabilny kompleks o maksimum absorpcji przy 470 nm. Dla uzyskania stabilizacji kompleksu konieczne jest związanie anionu, najczęściej węglanowego lub dwuwęglanowego. Reszty arginyłowe w transferynach wiążą te aniony (84).

Szczególne dane dotyczące białek, w których reszty arginyłowe są miejscami wiążącymi ligandy anionowe przedstawiono w Tabeli 3.

VI. Reszty arginyłowe białek o różnych właściwościach biologicznych

W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień o znaczeniu grup guanidynowych argininy dla czynności biologicznej wielu białek, występujących w komórkach i tkankach. Na przykład lipoproteiny osocza ludzkiego o niskim ciężarze cząsteczkowym (LDL, $d = 1,02-1,05$) wiążą poprzez reszty arginyłowe białka receptorowe występujące na powierzchni ludzkich fibroblastów i na powierzchni komórek mięśni gładkich tętnic psów (85). Podobnie zachowują się lipoproteiny osocza psów (HDL, HDL_c) wobec fibroblastów ludzkich. Szczególnie silne wiązanie z białkami receptorowymi tworzą wyizolowane z osocza psów po diecie bogatej w cholesterol lipoproteiny HDL_c, których apoproteid jest bogaty w argininę. Modyfikacja reszt arginyłowych cykloheksanodionem-1,2, znacznie zmniejsza to powinowactwo. Po usunięciu z części białkowej odczynnika modyfikującego lipoproteiny odzyskują w 80% zdolność oddziaływania z fibroblastami.

Badania nad interakcją między F aktyną a tropomiozyną mięśni poprzecznie prążkowanych wykazały że w procesie tym uczestniczy jedna reszta arginyłowa monomeru aktyny. Stwierdzono, że modyfikacji cykloheksanodionem-1,2 ulegają 3 reszty arginyłowe w cząsteczce białka, przy zachowaniu struktury II-rzędowej monomerów aktyny i ich zdolności aktywacji miozynowej Mg^{+2} -ATP-azy. Wyodrębnienie peptydów, otrzymanych w wyniku degradacji pepsyną takich cząsteczek aktyny oraz badanie ich składu aminokwasowego pozwoliło ustalić, że modyfikacji ulegają reszty arginyłowe: Arg-28, Arg-95 i Arg-147. Działanie cykloheksanodionem-1,2 na aktynę uprzednio związaną z tropomiozyną prowadziło do modyfikacji tylko dwóch reszt arginyłowych: Arg-28 i Arg-142. Przedstawione dane wskazują, że Arg-95 bierze bezpośredni udział w tworzeniu kompleksu F-aktyna-tropomiozyna (86).

Główny składnik tkanki łącznej — kolagen wzbudza wciąż zainteresowanie jako białko strukturalne, wykazujące wyjątkowe cechy budowy (87). Wiadomo, że niektóre preparaty kolagenu charakteryzują się zdolnością agregacji płytek krwi (88). Proces ten jest bardzo istotny w ho-

Tabela 3

Białka, w których reszty arginylowe są miejscami kontaktowymi, wiążącymi ligandy anionowe

Lp.	Białko	Metoda badania	Funkcje reszt arginylowych	Piśmiennictwo
1	Albumina	reakcja z glioksałem	Reszty arginylowe w obszarach hydrofobowych cząsteczki wiążą: 1) kwasy tłuszczowe 2) anionowe detergenty 3) 1-anilinaftaleno-8-sulfonian (ANS)	(78)
	a) surowicy wołowej	reakcja z O-metyloizomocznikiem (reakcja guanidylacji) reakcja z cykloheksanonidionem-1,2	Reszty arginylowe wiążą anion tiocyjanianowy (SCN ⁻) 10 reszty arginylowych w cząsteczce wiążą: 1) diazepam 2) fenylbutazon 3) indometacynę	(81)
	b) surowicy ludzkiej	badanie struktury metodą kwadrupolowego magnetycznego rezonansu jądrowego	Reszty arginylowe wiążą anion chlorkowy	(83)
2	Transferyna surowicy ludzkiej Owotransferyna kurcząt	reakcja z fenylglioksałem, cykloheksanonidionem-1,2 butanonidionem-2,3	Jedna reszta arginylowa w centrum wiążę anion CO ₃ ²⁻ , tworząc stabilny kompleks Fe ⁺³ — transferyna-CO ₃ ⁻²	(84)

mostazie, ma również duże znaczenie w patogenezie wielu chorób (89). Niedawno badania W a n g a i wsp. wykazały, że zarówno agregacja płytek krwi jak i uwalnianie z nich serotoniny zależą w jakiś sposób od obecności reszt arginylowych w kolagenie (90), ponieważ ich modyfikacja cykloheksanodionem-1,2 znosi jego zdolność agregacji płytek. Autorzy są zdania, że reszty arginyłowe polimeru trójpeptydu o składzie Gly—X—Y są wyłącznie odpowiedzialne za interakcję płytka-kolagen. Preparaty kolagenu monomerycznego nie wzbudzają agregacji płytek.

W wyniku zastosowania modyfikacji czynnych grup aminokwasów w białkach stwierdzono, jakie reszty odgrywają ważną rolę w reakcjach immunochemicznych. Okazało się, że wiele przeciwciał wytwarzanych przez króliki i skierowanych wobec anionowych haptenu zawiera dodatnio naładowane reszty arginyłowe w miejscach wiążących. Na przykład w przeciwciałach wobec 5-azoizoftalanu znaczną ilość reszt aminokwasowych stanowią reszty arginyłowe (91), podobnie — w przeciwciałach wobec 5-azoftalanu (92). Zawartość reszt lizylowych w wymienionych przeciwciałach jest niezmiernie mała.

Stwierdzono także, że w specyficznym białku globularnym występującym we krwi myszy, obarczonych szpiczakiem MOPC-315 i wyizolowanym z frakcji globulinowej przy użyciu specyficznego immunoadsorbentu, w wiązaniu ujemnie naładowanego haptenu: ϵ ,N-dwunitrofenyloaminokapronianu bierze udział reszta arginyłowa (5), a nie — jak dotychczas sądzono — reszta lizyłowa (93).

Wykazano, że związanie reszt arginylowych wspomnianej globuliny z krwi zwierząt obarczonych szpiczakiem przez haptenu zapobiega całkowicie ich modyfikacji przez glioksal (5).

Reszty arginyłowe w inhibitorach proteaz, zarówno niskocząsteczkowych (inhibitor Kunitza), jak i wysokocząsteczkowych, występujących w gruczołach ślimaka (*Helix pomatia*) są również grupami reagującymi z proteazami. Zablockowanie tych reszt cykloheksanodionem-1,2 uniemożliwia interakcję inhibitora z enzymem i w następstwie — powoduje utratę jego hamującego działania (94).

Reszty arginyłowe w białkach odgrywają kluczową rolę w tworzeniu ich struktury trzeciorzędowej, na przykład w parwalbuminie III, wyizolowanej z białek mięśni szczupaka (95). Autorzy sugerują, że zmiana struktury α -helikalnej, wynikająca z modyfikacji cykloheksanodionem-1,2 wykazana dichronizmem kołowym i optyczną dyspersją rotacyjną, związana jest z obszarem łańcucha zawierającego w pobliżu reszty arginyłowej Glu-81.

W Tabeli 4 zestawiono białka o różnych właściwościach biologicznych, w których zablockowanie reszt arginylowych przyczynia się do utraty ich funkcji.

Lp.	Białko	Odczynnik modyfikujący	Wpływ modyfikacji na funkcję białka	Piśmiennictwo
1	Lipoproteidy o niskim ciężarze cząsteczkowym (LDL, d = 1,02—1,05) osocza zdrowych ludzi	cykloheksanodion-1,2	Zmniejszenie powinowactwa do białek receptorowych na powierzchni ludzkich fibroblastów	(85)
2	Aktyna mięśni szkieletowych królika	cykloheksanodion-1,2	Utrata zdolności oddziaływania z tropomiozyna	(86)
3	Kolagen skóry cieląt	cykloheksanodion-1,2	Utrata zdolności agregacji płytek krwi u ludzi	(90)
4	γ -globuliny surowicy królika skierowane wobec anionowych haptenu	glioksal	Hamowanie zdolności wiązania a) 5-azozoflatau b) 5-azoflatau	(91) (92)
5	Białko 315 wyizolowane z surowicy myszy Balb(c) po transplantacji nowotworu szpiczaka	glioksal	Utrata zdolności wiązania haptenu: ϵ -N-dwunitrofenyloamino kapronianu	(5)
6	Mioglobina wyizolowana z kaszalota	cykloheksanodion-1,2	Reszta arginylowa w pozycji 118 cząsteczki metmioglobiny wpływa na aktywność immunologiczną i strukturę antygenową białka	(96)
7	Niskocząsteczkowy inhibitor tripsyny (Kunitza) z fasoli sojowej orzeszków ziemnych plazmy nastenia świń	cykloheksanodion-1,2	Spośród 6 reszt arginylowych zawartych w cząsteczce Arg 17 i Arg 39 odpowiada za interakcję inhibitora z tripsyną	(94)
8	Wysokocząsteczkowe inhibitory proteinaz z gruczołu ślimaka (<i>Helix pomatia</i>) HPGI — A HPGI — B HPGI — C HPGI — D	cykloheksanodion-1,2	Całkowicie uniemożliwienie interakcji inhibitorów z proteinazami	(94)
9	Parwalbumina III wyizolowana z mięśni szczupaka	cykloheksanodion-1,2	Spadek udziału struktury α -helikalnej białka, zmiana immunochemicznej aktywności białka, zmniejszenie zdolności wiązania Ca^{+2}	(95)

VII. Uwagi końcowe

Zastosowanie odczynników zawierających ugrupowania dwukarbonylowe i wybiórczo reagujących z grupami guanidynowymi argininy pozwoliło na stwierdzenie znaczenia reszt arginyłowych dla funkcji biologicznej wielu białek. Metoda blokowania lub modyfikacji czynnych reszt arginyłowych jest jednak tylko jedną z metod badania rodzaju grup reaktywnych, biorących udział w katalizie enzymatycznej; oprócz niej stosuje się metody kinetyczne i metody bezpośredniego znakowania centrum aktywnego. Dotychczas poznano około 40 enzymów, w których reszty arginyłowe są niezbędne dla ich aktywności katalitycznej. Wiążą one bezpośrednio ujemnie naładowane substraty lub kofaktory albo tworzą i stabilizują określoną strukturę przestrzenną centrum. Fragmentacja cząsteczki białka przez odpowiednio dobrane proteazy, rozdział peptydów drogą chromatografii oraz badanie sekwencji aminokwasów pozwoliło ponadto określić położenie reszt arginyłowych istotnych dla funkcji enzymu.

Zastosowanie odczynników dwukarbonyłowych pozwoliło również wykazać, że w niektórych hormonach peptydowych i białkowych reszty arginyłowe są odpowiedzialne za ich czynność biologiczną. Ponadto, stanowią one w wielu białkach transportowych krwi miejsca wiążące ligandy anionowe, w tym także związki chemiczne o działaniu leczniczym. Reszty arginyłowe białek uczestniczą również w oddziaływaniu z innymi białkami, biorą udział w procesie przylegania i agregacji płytek krwi do kolagenu oraz odgrywają ważną rolę w reakcjach immunochemicznych.

Zaakceptowano do druku 4.2.1980

Po akceptacji do druku powyższego artykułu ukazało się kilka nowych doniesień dotyczących omawianego tematu.

Transketolaza (Glikoloaldehydotransferaza sedoheptulo-7-fosforan: aldehyd D-3-fosfoglicerynowy) (EC 2.2.1.1), enzym cyklu pentozowego o budowie dimerycznej, posiada dwa centra aktywne, w każdym występuje jedna reszta arginyłowa, istotna w procesie katalizy enzymatycznej (Kremer A. B., Egan R. M., Sable H. Z., (1980), *J. Biol. Chem.*, **255**, 2405—2410).

W kompleksie enzymów syntetazy kwasów tłuszczowych, wyizolowanych z gruczołu okołoodbytniczego (*uropuyial*) gęsi, na który składa się 7 cząsteczek enzymatycznych, tylko cząsteczki odpowiedzialne za redukcję ketokwasów i enoli zawierają w centrum aktywnym po jednej reszcie arginyłowej, odpowiedzialnej za wiązanie 2'-fosforanu NADPH (Poulose A. J., Kolattukudy P. E., (1980), *Archiv. Biochem. Biophys.*, **199**, 457—464).

W podjednostce dysmutazy nadtlencowej, wyizolowanej z erytrocytów wołu, jedna reszta arginyłowa odpowiada za jej aktywność. Analiza fragmentów peptydowych po cyanobromowaniu wykazała, że reszta ta położona jest w pozycji 141 łańcucha peptydowego (Malinowski D. P., Fridovich I., (1979), *Biochemistry*, **18**, 5909—5917).

Stwierdzono ponadto, że rybosomy *Escherichia coli* traktowane fenylogliksalem

i butanodionem-2,3 hamują polimeryzację polipeptydów. Sugeruje się, że reszty arginyłowe kilku białek z podjednostki 30S odgrywają ważną rolę w ich wiązaniu się z mRNA (Hernandez F., Lopez-Rivas A., Pintor-Toro J. A., Vazquez D., Palacian E., (1980), *Eur. J. Biochem.*, **108**, 137—141).

PIŚMIENNICTWO

1. Gilbert H. F., O'Leary H., (1975), *Biochemistry*, **14**, 5194—5199.
2. Nakaya K., Horinishi H., Shibata K., (1967), *J. Biochem.*, (Tokyo) **61**, 345—351.
3. Kotaki A., Harada M., Yagi K., (1968), *J. Biochem.*, (Tokyo), **64**, 537—548.
4. Freedman M. H., Grossberg A. L., Pressman D., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6186—6195.
5. Klostegaard J., Krausz L. M., Grossberg A. L., Pressman D., (1977), *Immunochemistry*, **14**, 107—110.
6. Takahashi K., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 6171—6179.
7. Takahashi K., (1970), *J. Biochem.*, (Tokyo), **68**, 659—664.
8. Lobb R. R., Stokes A. M., Hill H. A. O., Riordan J. F., (1975), *FEBS Letters*, **54**, 70—72.
9. Berghäuser J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 370—376.
10. Grossberg A. L., Pressman D., (1968), *Biochemistry*, **7**, 272—279.
11. Davies R. C., Neuberger A., (1969), *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 306—317.
12. Riordan J. F., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3915—3923.
13. Yankeelov J. A. Jr., Mitschell C. D., Crawford T. H., (1968), *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 1664—1666.
14. Borders C. L. Jr., Riordan J. F., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4699—4704.
15. McTigue J. J., Van Etten R. L., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **523**, 422—429.
16. Liu W. H., Feinstein G., Osuga D. T., Haynes R., Feeney R. E., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2886—2892.
17. Atassi M. Z., Thomas A. V., (1968), *Biochemistry*, **8**, 3385—3394.
18. Haynes R., Feeney R. E., (1968), *Biochemistry*, **7**, 2879—2885.
19. Toi K., Bynum E., Norris E., Itano H. A., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1036—1043.
20. Toi K., Bynum E., Norris E., Itano H. A., (1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, PC3455.
21. Pathy L., Smith E. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 557—564.
22. Pathy L., Smith E. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 565—569.
23. Kantrowitz E. R., Lipscomb W. N., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 2688—2695.
24. Daemen F. J. M., Riordan J. F. (1974), *Biochemistry*, **13**, 2865—2871.
25. Farbiszewski R., Gabryel H., (1979), *Wiad. Chem.*, **33**, 393—404.
26. Powers S. G., Riordan J. P., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2616—2620.
27. Riordan J. F., McElvany K. D., Borders C. L. Jr., (1977), *Science*, **195**, 884—886.
28. Kantrowitz E. R., Lipscomb W. N., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 2873—2880.
29. Riordan J. F., Scandurra R., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 417—424.
30. Borders C. L., Riordan J. F., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4699—4704.
31. Murphy A. J., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 1048—1054.

32. Vallejos R. H., Lescano W. J. M., Lucerno H. A., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 578—584.
33. Lange L. G., Riordan J. P., Vellee B. L., (1974), *Biochemistry*, **13**, 4361—4370.
34. Berghäuser J., Falderbaum I., (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1189—1194.
35. Yang P. C., Schwert G. W., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2218—2224.
36. Bleile D. M., Foster M., Brady J. W., Harrison J. H., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6222—6227.
37. Davidson W. S., Flynn T. G., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 3724—3729.
38. Nagradowa N. K., Asryants R. A., Benkevich N. V., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 319—326.
39. Enoch H. G., Strittmatter P., (1978), *Biochemistry*, **17**, 4927—4932.
40. Blumenthal K., Smith E. L., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 6555—6559.
41. Bookjans G., Böger D., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 459—465.
42. Bookjans G., Böger D., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 387—393.
43. Cipollo K. L., Dunlap R. B., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1139—1144.
44. Azaryan A. V., Mekhanik M. L., Egorow T. A., Torchinski Y. M., (1978), *Biochimia*, (ZSRR), **43**, 686—695.
45. Borders C. L., Cipollo K. L., Jorkarsky J. F., Neet K. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 2654—2658.
46. Philips M., Pho D. B., Pradel L. A., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 296—304.
47. Matsuo M., Huang C. H., Huang L. C., (1978), *Biochem. J.*, (Tokyo), **173**, 441—447.
48. Berghäuser J., (1977), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1565—1572.
49. Cardenil E., Eyzaguirre J., (1979), *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 533—538.
50. Hjelmgren T., Strid L., Arvidsson L., (1976), *FEBS Letters*, **68**, 137—140.
51. Rogers K., Weber B. H., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **180**, 19—25.
52. Berghäuser J., Schirmer R. H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **537**, 428—435.
53. Borders C. L. Jr., Wilson B. A., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 978—984.
54. Sasaki R., Utsumi S., Chiba H., (1977), *J. Biochem.* (Tokyo), **82**, 1173—1175.
55. Borders C. L. Jr., Riordan J. F., Auld D. S., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 490—495.
56. Weng L., Heinrickson R. L., Westley J., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 8109—8119.
57. Woodroffe M. N., Butterworth P. J., (1979), *Biochem. J.*, **181**, 137—142.
58. Marcus F., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3916—3921.
59. Riordan J. F., (1970), *Fed. Proc.*, **29**, 462.
60. Tunnicliff G., Ngo T. T., (1978), *Experientia*, **34**, 989—990.
61. Kameshita I., Tokushige M., Katsuki H., (1978), *J. Biochem.*, **84**, 795—803.
62. Chollet R., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1267—1274.
63. Lawlis V. B., McFadden B. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80**, 580—585.
64. Schloss J. V., Norton I. L., Stringer C. D., Hartman F. C., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 1310.

65. Elliott J. I., Brewer J. M., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 351—357.
66. Borders C. L. Jr., Woodall M. L., George A. L. Jr., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 901—906.
67. Kazarinoff M. N., Snell E. E., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 6179—6182.
68. Chatagner F., Pierre Y., (1977), *FEBS Letters*, **81**, 335—338.
69. Marschel A. H., Bodley J. M., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 1816—1820.
70. Vallee B. L., Riordan J. F., Bethune J. L., Coombs T. L., Auld D. S., Sokolowsky M., (1968), *Biochemistry*, **7**, 3547—3556.
71. Sairam M. R., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 197—205.
72. Sairam M. R., Li C. H., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 534—539.
73. Hazum E., Koch Y., Meidan R., Koch Y., (1977), *FEBS Letters*, **76**, 187—190.
74. Yanaihara N., Yanaihara C., Hashimoto T., Kennuchi Y., Koneko T., Oka H., Suito S., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1280—1291.
75. Bünzli H. F., Bosshard H. R., (1971), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 1180—1182.
76. Rathnam P., Saxena B. B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 81—87.
77. Foster J. F., (1960), w *The Plasma Proteins*, red. Putnam F. W., t. 5, str. 179—239: Academic Press. New York.
78. Jonas A., Weber G., (1971), *Biochemistry*, **10**, 1335—1339.
79. Santos E. C., Spector A. A., (1972), *Biochemistry*, **11**, 2299—2302.
80. McMenemy R. H., Madja M., Watson F., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2328—2336.
81. Pande C. S., McMenemy R. H., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 260—267.
82. Halle B., Lindman B., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3774—3781.
83. Roosdorp N., Wänn B., Sjöholm I., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 3876—3880.
84. Rogers T. B., Börresen T., Feeney R. E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 1105—1109.
85. Mahley R. W., Innerarity T. L., Pitas R. E., Weisgraber K. H., Brown J. H., Gross E., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7279—7287.
86. Johnson P., Blazyk J. M., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1013—1018.
87. Bańkowski E., Gałasiński W., (1974), *Post. Biochem.*, **20**, 481—502.
88. Spaet T. D., Zucker M. B., (1964), *Am. J. Physiol.*, **206**, 1267—1274.
89. Spaet T. D., Erichson R. B., (1966), *Thrombos. Diathes. Haemorrh.*, **21**, 67—86.
90. Wang C. L., Miyata T., Weksler B., Rubin A. L., Stenzel K. H., (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 555—567.
91. Mayers G. L., Grossberg A. L., Pressman G., (1972), *Immunochemistry*, **9**, 169—178.
92. Mayers G. L., Grossberg A. L., Pressman D., (1973), *Immunochemistry*, **10**, 37—41.
93. Haimowich J., Givol D., Eisen H. N., (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**, 1656—1661.
94. Dietl T., Tschesche H., (1976), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 657—665.
95. Gosselin-Rey C., Bernard N., Gerday C., (1973), *Biochim. Biophys. Acta*, **303**, 90—104.
96. Atassi M. Z., Thomas A. V., (1969), *Biochemistry*, **8**, 3385—3394.

ZDZISŁAW ŻAK *

Rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze i funkcji białek

Disulphide Bounds in the Structure and Function of Proteins

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Wiązania dwusiarczkowe w białkach pozakomórkowych
- II-1. Redukcja i reoksydacja wiązań dwusiarczkowych
- II-2. Wiązania dwusiarczkowe w immunoglobulinach
- II-3. Wiązania dwusiarczkowe w białkach transportujących
- II-4. Oksydacyjno-redukcyjna funkcja wiązań dwusiarczkowych
- II-5. Wiązania dwusiarczkowe w histonie H—3
- II-6. Wiązania dwusiarczkowe w toksynach bakteryjnych
- II-7. Wiązania dwusiarczkowe w hormonach peptydowych
- II-8. Bufor oksydacyjno-redukcyjny i jego rola w regulacji metabolizmu
- III. Procesy enzymatycznej regulacji ułożenia dwusiarczków w białkach
- III-1. Izomeraza wiązań dwusiarczkowych białek
- III-2. Polimeryzacja immunoglobulin klasy A i M
- IV. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Disulphide bonds in extracellular proteins
- II-1. Reduction and reoxidation of disulphide bonds
- II-2. Disulphide bonds in immunoglobulins
- II-3. Disulphide bonds in transfer proteins
- II-4. Oxido-reduction function of disulphide bonds
- II-5. Disulphide bonds in the histon H-3
- II-6. Disulphide bonds in bacterial toxins
- II-7. Disulphide bonds in peptide hormones

* Doc. dr hab., Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Grodzka 53, 31-001 Kraków.

Wykaz stosowanych skrótów: L — łańcuch lekki w immunoglobulinach, H — łańcuch ciężki w immunoglobulinach, GSH — zredukowany glutation, GSSG — utleniony glutation, H—S—S—G — mieszany dwusiarczek łańcucha ciężkiego z glutationem.

II-8. Oxido-reduction buffer and its function in regulation of metabolism**III. Enzymatic regulation of disulphide content and localization in protein structure****III-1. Isomerase of disulphide bonds in proteins****III-2. Polymerization of the A and M classes of immunoglobulin****IV. Concluding remarks****I. Wstęp**

Wiązania dwusiarczkowe w strukturze peptydów i białek nie tylko przyczyniają się do utrzymania budowy przestrzennej, lecz także spełniają bezpośrednie funkcje katalityczne i regulacyjne w procesach biochemicznych zachodzących w komórkach i w przestrzeniach międzykomórkowych. Wyróżnia się wiązania dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe i międzylańcuchowe. Wiązania wewnątrzłańcuchowe mogą łączyć odległe części łańcucha polipeptydowego i w ten sposób tworzyć pętlę o ustabilizowanej strukturze. Międzylańcuchowe wiązania dwusiarczkowe łączą ze sobą poszczególne łańcuchy polipeptydowe.

Funkcje wiązań dwusiarczkowych w białkach są różnorodne. W białkach enzymatycznych wiązania dwusiarczkowe utrzymują taką konformację cząsteczki, która umożliwia wiązanie substratu w centrum katalitycznym. Wiązania dwusiarczkowe w immunoglobulinach niezbędne są dla utrzymania właściwej struktury tych białek podczas reakcji z antygenami i komórkami układu odpornościowego. W procesach oksydacyjno-redukcyjnych wykazano udział dwusiarczków oraz ich znaczenie w utrzymaniu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej zarówno wewnątrz komórek jak i w płynach pozakomórkowych. Stwierdzono także, że związki zawierające wiązania dwusiarczkowe biorą udział w regulacji procesów metabolicznych i prawdopodobnie w regulacji ekspresji genów.

Mostki dwusiarczkowe tworzą się w procesie posttranslacyjnym. Uczestniczą w nim enzymy typu oksydoreduktaz i izomeraz, które mogą kontrolować poprawność położenia wiązań dwusiarczkowych.

II. Wiązania dwusiarczkowe w białkach pozakomórkowych

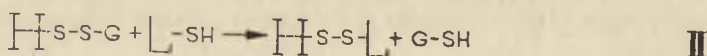
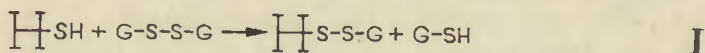
Białka wydzielane przez komórki do przestrzeni międzykomórkowej bardzo często zawierają liczne wiązania dwusiarczkowe. Natomiast białka występujące wewnątrz komórek mają znacznie mniejszą liczbę wiązań dwusiarczkowych. Białka wewnątrzkomórkowe są otoczone innymi cząsteczkami, które oddziałują stabilizująco na strukturę. Można więc przypuszczać, że stabilizacja struktury tych białek przez wiązanie dwusiarczkowe jest w dużym stopniu zbędna.

II-1. Redukcja i reoksydacja wiązań dwusiarczkowych

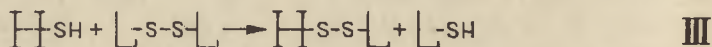
Białka zawierające liczne wiązania dwusiarczkowe, między innymi lizozym, wykazują znaczną stabilność struktury w warunkach sprzyjających denaturacji. Rozbicie wiązań dwusiarczkowych przez redukcję lub utlenienie (1, 2, 3) ułatwia denaturację danego białka. Wykazano to przez selektywne rozerwanie pojedynczych wiązań w natywnych białkach (4, 5, 6, 7, 8, 9). Na przykład borowodorek sodu redukuje w trypsynie bydłczej tylko jedno wiązanie dwusiarczkowe spośród sześciu w całej części cząsteczki (6). To reaktywne wiązanie występuje od strony zewnętrznej „kieszeni” wiążącej substrat, między resztami Cys 179—203 (191—220). Chociaż mostek dwusiarczkowy 179—203 (191—220) nie jest składową miejsca aktywnego, to zamyka poblizze tego obszaru (1). Wykazano, że rozkład tego dwusiarczku powoduje zmianę orientacji grupy Asp 177 (189) i wskutek tego dalsze zmiany w geometrii „kieszeni” wiążącej substrat. Dwusiarczek Cys 179—203 (191—220) jest niezmienny w sekwencji wszystkich proteaz chymotrypsyno-podobnych (10). Takie ułożenie wiązania dwusiarczkowego zachowało się w ewolucji proteaz serynowych od mikroorganizmów do ssaków.

II-2. Wiązanie dwusiarczkowe w immunoglobulinach

Immunoglobuliny są białkami, których struktura jest utrzymywana przez liczne wiązania dwusiarczkowe. Wyróżnia się pięć klas immunoglobulin: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (11, 12). Struktura cząsteczek jest quasi-symetryczna, zbudowana z dwu łańcuchów lekkich (L) i dwu łańcuchów ciężkich (H). Wyróżnia się dwa rodzaje łańcuchów lekkich κ i λ , oraz cztery rodzaje łańcuchów ciężkich α , μ , δ i ϵ . W strukturze IgM i IgA wykazano obecność łańcucha J (13). We wszystkich immunoglobulinach łańcuchy ciężkie i lekkie są połączone międzyłańcuchowymi mostkami dwusiarczkowymi. Wiązania dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe tworzą w łańcuchu polipeptydowym pętlę o stabilnej strukturze. Przemiany tiol-dwusiarczek białka są istotne w reakcji tworzenia wiązań dwusiarczkowych międzyłańcuchowych. Bierze w niej udział glutation. Sugeruje się, że monomery L i H łańcuchów w stanie zredukowanym łączą utleniony glutation tworząc przejściowo dwusiarczek (Reakcja I i II).



Ponieważ wiele komórek syntetyzuje więcej łańcuchów L niż H i nadmiar łańcuchów L pojawia się jako dimer L—S—S—L, reakcja jest możliwa jako prosta wewnętrzna przemiana tiol-dwusiarczek białka (Reakcja III).



IgA polimeryzuje do struktury $(\text{H}_2\text{L}_2)_n$ — odpowiada to strukturze $(\alpha_2\alpha_2)_n$ lub $(\lambda_2\alpha_2)_n$. Natomiast IgM polimeryzuje do struktury $(\text{H}_2\text{L}_2)_5$ — odpowiada to strukturze $(\alpha_2\mu_2)_5$ lub $(\lambda_2\mu_2)_5$. Pentamer IgM ma strukturę pierścieniową. W obu przypadkach polimery powstają przez łączenie się cząsteczek monomerów za pomocą wiązań dwusiarczkowych.

Wieloznaczność strukturalna immunoglobulin w stosunku do antygenów pozwala snuć przypuszczenia, że w tej funkcji dużą rolę spełniają wiązania dwusiarczkowe. Rola ta wiąże się z geometrią wiązań dwusiarczkowych i ich otoczenia.

II-3. Wiązania dwusiarczkowe w białkach transportujących

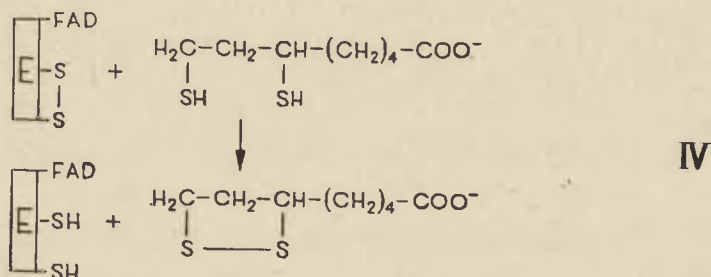
Struktura białek uczestniczących w transporcie hormonów i witamin jest bardzo często stabilizowana wiązaniami dwusiarczkowymi. Na przykład neurofizyny przenoszące oksytocynę i wasopresynę (14) są białkami bogatymi w wiązania dwusiarczkowe. Neurofizyna bydłęca w cząsteczce o masie 10 000 daltonów ma siedem mostków dwusiarczkowych. Tylko dwa z nich są dostępne dla redukcji i łatwo jej ulegają. Po reoksydacji uzyskano neurofizynę o niepełnej zdolności do wiązania oksytocyny i wasopresyny. Metodą dichroizmu kołowego w bliskim ultrafiolecie wykazano, że zredukowana neurofizyna tylko częściowo wraca do konformacji odpowiadającej natywnemu białku (14).

Ryboflawinowy flawoproteid z jaj kurzych (15, 16, 17) ma masę cząsteczkową 36 000 daltonów i jest zbudowany z dwu łańcuchów polipeptydowych spiętych mostkami dwusiarczkowymi. Cała cząsteczka zawiera osiem wiązań dwusiarczkowych między- i wewnątrzłańcuchowych. Białko to spełnia w jaju ptaków funkcję transportującą i magazynującą ryboflawinę dla rozwijającego się zarodka. Badania spektropolarymetryczne wykazały, że wiązanie ryboflawiny przez to białko wywołuje zmiany w geometrii wiązań dwusiarczkowych (18). Wykazano również, że odpowiednia geometria ich w cząsteczce białka wiążącego ryboflawinę jest niezbędna aby białko miało pełną aktywność wiązania witaminy B₂ (19, 20). Można sądzić, że zmiany w obrębie wiązań dwusiarczkowych odgrywają rolę w regulacji transportu ryboflawiny dla rozwijającego się zarodka.

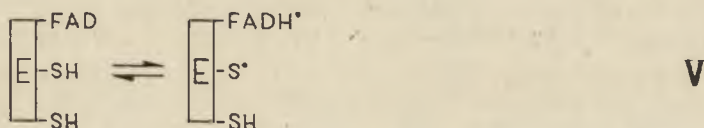
II-4. Oksydacyjno-redukcyjna funkcja wiązań dwusiarczkowych

Do enzymów o strukturze flawoproteidów należy grupa, której aktywność katalityczna jest związana z obecnością wiązań dwusiarczkowych spełniających funkcję oksydacyjno-redukcyjną. Są to dehydrogenaza liponianu, reduktaza glutationu i reduktaza tioredoksyny.

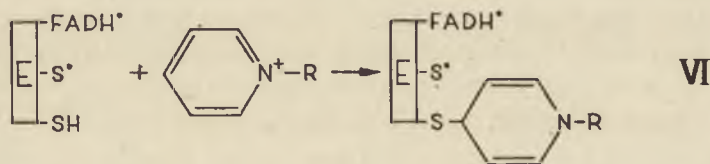
Zredukowany liponian jest utleniany kosztem redukcji wiązań dwusiarczkowych dehydrogenazy liponianu (21, 22, 23, 24). W miejscu aktywnym enzymu obok związanej cząsteczki FAD znajduje się wiązanie dwusiarczkowe spełniające funkcję oksydacyjno-redukcyjną. Cząsteczka zredukowanego liponianu redukuje wiązanie dwusiarczkowe enzymu (Reakcja IV).



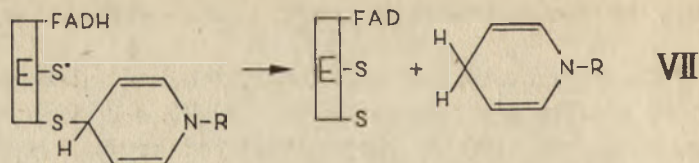
Następnie zachodzi jednoelektronowa redukcja pierścienia izoalloksazyny w FAD; powstaje semichinonowa postać FAD. W rezultacie tworzy się układ dwurodnikowy S[•] i FAD[•] (Reakcja V).



Enzym w tym stanie wykazuje zdolność do przyłączenia cząsteczki nukleotydu nikotynowego, przez wytworzenie wiązania między atomem siarki enzymu a pierścieniem nikotynowym (Reakcja VI).

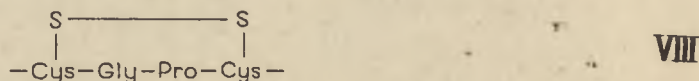


Następuje redukcja nukleotydu nikotynowego przez odebranie równoważników redukcyjnych z atomu siarki. Zredukowany nukleotyd nikotynowy odłącza się, czemu towarzyszy odtworzenie dwusiarczku (Reakcja VII).



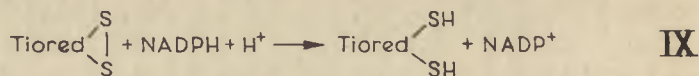
Reduktaza glutationu (22, 23, 24) przenosi równoważniki redukcyjne z NADPH na glutation. Zredukowany nukleotyd nikotynowy wykorzystuje dwusiarczki do pośredniczenia w redukcji flawin i do utworzenia przejściowego połączenia z enzymem. Redukcja FAD zachodzi dwuetapowo poprzez stadium semichinonu, który kolejno redukuje dwa atomy siarki utlenionego glutationu.

Redukcja rybonukleotydów do dezoksyrybonukleotydów zachodzi przy udziale układu tioredoksyny. W skład tego enzymatycznego układu w *E. coli* wchodzi tioredoksyna, reduktaza tioredoksyny i NADPH (25). Tioredoksyna ma masę 12 000 daltonów i zawiera jedno wiązanie dwusiarczkowe o aktywności oksydacyjno-redukcyjnej (26). Sekwencja aminokwasów w obrębie wiązania dwusiarczkowego (27) jest następująca:



Należy zaznaczyć, że tioredoksyna jest rozpowszechniona zarówno u bakterii jak i u eukariontów z ssakami włącznie. Zredukowana postać tioredoksyny

(Tiored $\begin{pmatrix} \text{SH} \\ | \\ \text{SH} \end{pmatrix}$) pośredniczy w redukcji reduktazy dwufosforybonukleotydów, jako donator równoważników redukcyjnych (28). Proces redukcji tioredoksyny (26) zachodzi pod wpływem reduktazy tioredoksyny w/g reakcji IX.



Reduktaza tioredoksyny (EC. 1.6.4.5) z *E. coli* (29) jest dimerem o masie 66 000 daltonów i jest zbudowana z identycznych podjednostek. Każda z podjednostek przyłącza jedną cząsteczkę FAD. Wykazano, że reduktaza ta ma wysoką swoistość względem tioredoksyny z *E. coli* i nie reaguje z tioredoksyną drożdży oraz z dwusiarczkami innych białek (30).

Redukcja wiązań dwusiarczkowych w białkach przez tioredoksynę zachodzi zgodnie z reakcją X:



Równowaga tej reakcji przesuwana się na prawo z powodu niskiego potencjału oksydacyjno-redukcyjnego tioredoksyny, który wynosi $E_0 = -0,260 \text{ V}$ (w $\text{pH} = 7,0$ i w temp. 25°) (31). W obecności reduktazy

tioredoksyne i nadmiaru NADPH zachodzi szybka redukcja wiązań dwusiarczkowych (por. reakcje IX i X). W tych warunkach niski potencjał oksydacyjno-redukcyjny NADPH przyspiesza redukcję wiązań dwusiarczkowych w różnych białkach.

Tioredoksynę i reduktazę tioredoksyne wykazaną w komórkach ssaków porównywano z układem redukcyjnym rybonukleotydów z *E. coli*. Otrzymano częściowo oczyszczoną reduktazę tioredoksyne z wątroby szczura (32), oraz tioredoksynę wraz z reduktazą tioredoksyne z wątroby cieląt (34). Cielęca tioredoksyna jest bardzo podobna do otrzymanej z *E. coli*. Ma masę 12 000 daltonów i identyczną sekwencję aminokwasów w obszarze reaktywnego mostka dwusiarczkowego. Reduktaza tioredoksyne otrzymana z wątroby cieląt jest różna od enzymu z *E. coli*. Katalizuje ona redukcję wiązań dwusiarczkowych w różnych białkach, wymaga obecności tioredoksyne i NADPH. Enzym ten jest oksydoreduktazą NADPH: dwusiarczek białka (EC 1.6.6.4).

Udział tioredoksyne wykazano też w regulacji aktywności światłozależnych kluczowych enzymów uczestniczących w przyswajaniu CO₂ w chloroplastach. Tioredoksyna ulega fotochemicznej redukcji przez ferodoksynę i reduktazę ferodoksyne — tioredoksyna. Zredukowana tioredoksyna aktywuje enzymy fosfatazę 1,6-dwufosfofruktozy i fosfatazę 1,7-dwufosfosedoheptulozy. W ciemności enzymy te są reoksydowane i ulegają inaktywacji (35).

II-5. Wiązanie dwusiarczkowe w histonie H-3

Bardzo interesujące są białka, w których na cząsteczkę przypada jedno wiązanie dwusiarczkowe. Badania funkcji takiego pojedynczego wiązania pozwalają wyciągnąć jednoznaczne wnioski. Z taką sytuacją mamy do czynienia w histonach. Otóż w komórkach eukariontów wykazano obecność histonu H-3, który różni się od innych między innymi obecnością jednej lub dwu reszt cysteiny (36, 37). *In vitro* histon H-3 może tworzyć dimery poprzez wiązania dwusiarczkowe w komórkach HeLa. Liczba wiązań dwusiarczkowych w dimerach histonu H-3 wzrasta podczas podziałów mitotycznych (38). Wyniki te sugerowały, że za proces kondensacji chromosomów mitotycznych odpowiedzialne są wiązania dwusiarczkowe dimeru histonu H-3.

Jak wiadomo, chromatyna jest zbudowana z nukleosomów (39, 40). Nukleosomy składają się z DNA i oktamerów histonów zawierających po dwie cząsteczki każdego rodzaju histonu tj. H-2A, H-2B, H-3 i H-4 (41, 42). Tylko histon H-3 zawiera reszty cysteiny z wolnymi grupami SH, które w natywnej chromatynie położone są blisko siebie. Ponadto wykazano *in vitro*, że cząsteczki histonu H-3, łączą się łatwo w dimery przez utworzenie wiązania dwusiarczkowego (41, 43). Przypuszczano więc, że

między- i wewnątrz nukleosomowe wiązania dwusiarczkowe między cząsteczkami histonu H-3, odgrywają rolę w strukturze chromatyny; jednakże ich istnienie *in vivo* nie udało się udowodnić (44).

II-6. Wiązania dwusiarczkowe w toksynach bakteryjnych

Wśród toksyn bakteryjnych szczególną funkcję spełniają toksyny o budowie polipeptydów. Wykazano, że większość toksyn peptydowych składa się z dwu łańcuchów spiętych wiązaniami dwusiarczkowymi (45). Łańcuch A takiej toksyny jest aktywny w hamowaniu syntezy białek komórek eukariotycznych. Łańcuch B wykazuje powinowactwo do swoistego receptora na powierzchni komórki. Oddzielone łańcuchy są nieaktywne dla komórki. W homogenacie bezkomórkowym łańcuch A może katalitycznie hamować syntezę białka, a łańcuch B wiąże się ze swoistym receptorem na powierzchni komórki (46). Jednakże efekt toksyczny w stosunku do całej komórki wymaga cząsteczki zbudowanej z obu łańcuchów. Aktywność toksyczna wyraża się w trzech etapach: a) wiązanie toksyny od strony łańcucha B z powierzchnią komórki, b) wejście łańcucha A lub całej cząsteczki toksyny do wnętrza komórki, c) hamowanie syntezy białka gospodarza przez cząsteczkę łańcucha A (45).

Mechanizm działania łańcucha A lub całej toksyny jest prawie nieznanymi. Ostatnio (47, 48) badano toksynę błonicy, a także toksyny roślinne abrynę i rycynę, które w zachowaniu się odpowiadają powyższymi uogólnieniami.

Łańcuch B tych toksyn wiąże się z receptorami zawierającymi galaktozę. Łańcuch A rycyny i abryny inaktywuje rybosomy przez hamowanie GTP-azy w podjednostce rybosomu 60 S (47). Łańcuch A toksyny błonicy inaktywuje czynnik II elongacji (50).

Wiązania dwusiarczkowe w każdej z tych toksyn spełniają istotną rolę w przemianach posttranslacyjnych. Prawdopodobnie toksyna jest syntetyzowana w postaci jednołańcuchowego polipeptydu z odcinkiem blokującym jej aktywność. Mostek dwusiarczkowy ułatwia utrzymanie obu czynności toksyny po jej aktywacji przez procesy ograniczonej proteolizy posttranslacyjnej. Połączenie obu łańcuchów toksyny za pomocą wiązania dwusiarczkowego ma także znaczenie w utrzymaniu właściwej struktury tego białka podczas interakcji z błoną komórki docelowej.

II-7. Wiązania dwusiarczkowe w hormonach peptydowych

Do najdawniej poznanych hormonów o strukturze peptydowej należy insulina. Cząsteczka insuliny bydłowej (51, 52) składa się z dwu łańcuchów: łańcuch A zawiera 21 a łańcuch B 30 reszt aminokwasowych. Dwa

mostki dwusiarczkowe łączą reszty cysteiny 7 i 20 w łańcuchu A z resztami 7 i 19 w łańcuchu B. Łańcuch A posiada wewnątrzłańcuchowy mostek dwusiarczkowy między 6 i 11 resztą cysteiny. Prekursor insuliny — proinsulina — jest jednołańcuchowym polipeptydem zawierającym 81 reszt aminokwasowych i trzy mostki dwusiarczkowe wewnątrzłańcuchowe (53). Łańcuchy A i B insuliny zwierząt różnych gatunków różnią się nieznacznie. Zmienność ich jest podobna do zmienności cytochromu c lub hemoglobiny.

Dodatkowa część peptydowa zwana łańcuchem C proinsuliny ptaków i ssaków różnych gatunków wykazuje bardzo dużą zmienność.

Spośród 31 reszt aminokwasowych tylko pięć reszt powtarza się we wszystkich zbadanych cząsteczkach (53). Obecność peptydu C w proinsulinie jest niezbędna w utrzymaniu struktury czynnej hormonu i wytworzeniu odpowiednich warunków przestrzennych dla powstania mostków dwusiarczkowych w procesie przemian posttranslacyjnych.

Podobieństwo struktury przestrzennej łańcuchów A i B w insulinie i proinsulinie udowodniono zarówno w badaniach postaci rozpuszczonej jak też krystalicznej (54). Insulina krystalizuje z jonami cynku tworząc heksamery. Główną oś heksameru tworzą dwa jony Zn^{2+} , które wiążą się z resztami imidazolowymi histydyny (His-10) każdego łańcucha B. Proinsulina krystalizując w obecności Zn^{2+} tworzy także heksamery, w których łańcuchy C są rozmieszczone na powierzchni zewnętrznej. W mieszaninie insuliny i proinsuliny, przy niskich stężeniach proinsuliny krystalizacja przebiega podobnie jak w roztworze samej insuliny. Ta możliwość wspólnej krystalizacji jest ważna w tworzeniu się granul magazynujących insulinę w aparacie Golgi'ego komórek trzustki (55). Z powyższego wynika, że mostki dwusiarczkowe spełniają bardzo ważną rolę w zachowaniu stałości konformacji łańcucha polipeptydowego w proinsulinie, jak też struktury czynnej insuliny po proteolitycznym odszczepieniu peptydu C.

Przekształcenie proinsuliny w insulinę zachodzi przy udziale enzymów proteolitycznych. Enzym trypsyno-podobny (56) powoduje w proinsulinie bydłowej rozkład wiązań peptydowych Arg-32 i Glu-33 oraz Arg-60 i Glu-61. Powstaje insulina zawierająca dwie dodatkowe reszty argininy od końca C łańcucha B. Pełną aktywność insuliny uzyskuje się przez odszczepienie C-końcowych arginin pod wpływem karboksypeptydazy B. Oba procesy są ściśle regulowane a istotnym czynnikiem jest prawdopodobnie stabilizacja struktury białka przez wiązania dwusiarczkowe.

Drugim przykładem z grupy hormonów peptydowych jest relaksyna, jej struktura i funkcja jest także uzależniona od obecności mostków dwusiarczkowych w cząsteczce. Relaksyna występuje we krwi ssaków, w nasieniowodach i jajnikach. Wywołuje ona zmiękczenie tkanki łącznej spojenia łonowego oraz ma wpływ na ruchliwość i ułożenie macicy.

Cząsteczka relaksyny (57) zbudowana jest z dwu łańcuchów polipeptydowych. Łańcuch A składa się z 22 a łańcuch B z 26 reszt aminokwasowych. W łańcuchu A jest wewnątrzłańcuchowy mostek dwusiarczkowy między 8 i 13 resztą cysteiny. Dwa mostki dwusiarczkowe łączą cysteiny 9 i 22 łańcucha A z cysteinami 10 i 22 łańcucha B. Pomimo podobieństwa w rozłożeniu mostków dwusiarczkowych relaksyny i insuliny sekwencja aminokwasów jest różna. Podobny układ mostków dwusiarczkowych międzyłańcuchowych i wewnątrzłańcuchowych dowodzi, że pełnią one podobne funkcje w stabilizacji struktury tych białek w procesach posttranslacyjnych i w czasie aktywacji prohormonów do aktywnych hormonów oraz w reakcji z komórkami docelowymi.

II-8. Bufor oksydacyjno-redukcyjny i jego rola w regulacji metabolizmu

W wielu tkankach wykazano obecność glutationu utlenionego i zredukowanego, oraz stwierdzono że stosunek tych dwu postaci zmienia się w zależności od warunków oksydacyjno-redukcyjnych. Wewnątrz komórek wykazano obecność mieszanych dwusiarczków między białkami i glutationem lub cysteiną. W wielu tkankach szczurów stężenie mieszanych dwusiarczków białko—S—S—G sięga 25—50% zawartości rozpuszczalnych nisko- i wysokocząsteczkowych związków tiolowych (58). Zaobserwowano w wątrobie szczura wzrost stężenia mieszanych dwusiarczków białko—S—S—G w miarę wzrostu stężenia GSH. Stosunek tioli do dwusiarczków w komórkach odgrywa rolę w równowadze buforu oksydacyjno-redukcyjnego (59). Hodując szczury w atmosferze ozonu wykazano, że spada stężenie zredukowanego glutationu w płucach przy zachowaniu stałego stężenia wolnego G—S—S—G i wzroście mieszanego dwusiarczku białko—S—S—G (60). Poziom mieszanego dwusiarczku białko—S—S—G w wątrobie zmienia się w zależności od dziennych zmian poziomu cAMP. Gdy wzrasta stężenie cyklicznego AMP w wątrobie wzrasta też stosunek białko—S—S—G:GSH. Mieszane dwusiarczki białkowe są wprost redukowane przez GSH w reakcji oksydacyjno-redukcyjnej tiol:dwusiarczek (61), w której wymagany jest NADPH. Ponadto uczestniczy w niej reduktaza glutationu czyli oksydoreduktaza GSH:mieszany dwusiarczek.

Wykazano, że w wyniku tworzenia się mieszanych dwusiarczków zachodzi aktywacja enzymów metabolizujących węglowodany. Są to fosfataza 1,6-dwufosfofruktozy i fosfofruktokinaza (62). Jednym z przykładów działania regulacyjnego glutationowego buforu oksydacyjno-redukcyjnego jest wpływ na aktywność fosfatazy fosforylazy a, która inaktywuje enzym powodujący rozkład fosforylityczny glikogenu. Defosforyluje ona także inne fosfoproteiny jak ufosforylowaną postać syntetazy glikogenu (postać D), kinazę fosforylazy, histony i kazeinę (63, 64).

Wcześniejsze badania sugerowały udział inhibitorów białkowych w hamowaniu aktywności fosfatazy fosforylazy a (65). Równocześnie wykazano że niskocząsteczkowym inhibitorem tego enzymu jest dwusiarczek glutationu GSSG. Powoduje on przemianę fosfatazy fosforylazy a w postać o niskiej aktywności enzymatycznej. Całkowitą reaktywność fosfatazy uzyskuje się przez dodanie zredukowanego glutationu w obecności jonów Mn^{2+} . W badaniach *in vivo* przez wprowadzenie dożylnie królikowi dwusiarczku glutationu wywołuje się wzrost aktywności fosforylazy a w wątrobie (66).

Wiele danych wskazuje, iż inaktywacja fosfatazy fosforylazy a przez GSSG polega na modyfikacji kowalentnej enzymu, prawdopodobnie przez blokowanie grupy SH w centrum aktywnym enzymu. Tworzy się połączenie typu mieszanego dwusiarczku Enzym—S—S—G lub wiązanie dwusiarczkowe wewnątrzcząsteczkowe.

Zawartość GSSG w komórce ma wpływ na aktywność fosfatazy 1,6-dwufosfofruktozy (52) i syntetazy glikogenu (67). Regulacja aktywności fosfataz pośrednio wpływa na liczne procesy metaboliczne. Tym samym równowaga oksydacyjno-redukcyjnego buforu ma znaczenie w regulacji metabolicznej.

III. Procesy enzymatycznej regulacji ułożenia dwusiarczków w białkach

W równowadze między syntezą i rozkładem białek odgrywa istotną rolę obecność wiązań dwusiarczkowych wewnątrzłańcuchowych i międzylańcuchowych. Wiązania te utrzymując właściwą strukturę cząsteczki białka zapewniają odpowiednie warunki fizyczno-chemiczne do spełniania jego funkcji biologicznej. Ponadto stabilizująca rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze białka utrudnia proteolityczną degradację białek wewnątrz komórek. Coraz więcej jest danych w piśmiennictwie świadczących o obecności układu enzymatycznego regulującego syntezę i rozkład wiązań dwusiarczkowych w cząsteczkach białek. Do układu tego należą dwa enzymy związane ze strukturą błon mikrosomów: transhydrogenaza glutation: insulina (68, 69) i izomeraza wiązań dwusiarczkowych w białkach (70, 71). Białkowa izomeraza dwusiarczków katalizuje redukcję wiązań dwusiarczkowych insuliny przy przeniesieniu równoważników redukcyjnych ze zredukowanego glutationu. Enzym ten zaliczono do oksydoreduktaz glutation:wiązania dwusiarczkowe białek (EC 1.8.4.2.). Obecność tego enzymu wykazano w 13 tkankach szczura i innych ssaków. Wykazano także, że substratem tego enzymu mogą być inne białka, na przykład rybonukleaza i lizozym. Redukcja enzymatyczna dwusiarczkowych wiązań w insulinie jest pierwszym etapem degradacji tego hormonu. W wyniku reakcji zachodzącej przy udziale trans-

hydrogenazy glutation:insulina uwalniają się łańcuchy peptydowe A i B, które szybko ulegają degradacji proteolitycznej (69).

III-1. Izomeraza wiązań dwusiarczkowych białek

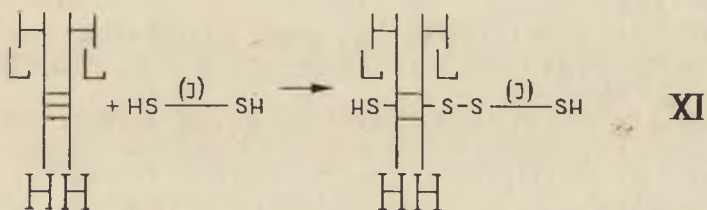
Redukcja wiązań dwusiarczkowych w natywnych białkach prowadzi do denaturacji; w białkach o własnościach enzymatycznych zwykle zanika ich zdolność katalityczna. Tak zdenaturowane białka ulegają częściowej renaturacji. Po usunięciu reduktora, reoksydacja zachodzi przy udziale tlenu atmosferycznego. Przy zachowaniu ściśle określonych warunków fizyczno-chemicznych uzyskuje się duży procent cząsteczek o własnościach natywnego białka. Proces reoksydacji może prowadzić do powstania połączeń za pomocą wiązań dwusiarczkowych między innymi resztami cysteiny niż to ma miejsce w natywnym białku.

Rybonukleaza jest łatwo zredukowana przez różne związki tiolowe. Enzym zainaktywowany przez redukcję można reoksydować tlenem atmosferycznym (70). Jego pierwotną aktywność enzymatyczną można odzyskać przy zastosowaniu ściśle określonych warunków. Opracowano także warunki reoksydacji insuliny (72), lizozymu (73), trypsyny (74), amylazy (75) i alkalicznej fosfatazy (70).

Ciepłochwiejny czynnik, który katalizuje reoksydację zredukowanej rybonukleazy znaleziono w trzustce kurcząt (70). W mikrosomach wątroby wołu (68), szczura i świni (76, 77) także wykazano obecność enzymu katalizującego reakcję „poprawiania” błędnie łączonych wiązań dwusiarczkowych i sprawdzono jego aktywność na następujących białkach: rybonukleazie, lizozymie (77), inhibitorze trypsyny z nasion soi i pepsynogonie (78). Enzym ten przegrupowuje w zmodyfikowanym białku nienaturalnie położone mostki dwusiarczkowe rozrywając je przez redukcję, następnie zachodzi „poprawianie” to jest takie jak w białku natywnym łączenie reszt cysteiny mostkami dwusiarczkowymi (79). Ten mechanizm katalizy usprawiedliwia stosowaną nazwę białkowej izomerazy dwusiarczków (EC. 5.3.4.1.). Białkowa izomeraza dwusiarczków otrzymana z mikrosomów wątroby wołu (79) ma masę 42 000 daltonów i w cząsteczce znajdują się 3 reszty cysteiny. Ich grupy SH biorą udział w procesie katalitycznej zmiany położenia nienaturalnie utworzonych wiązań dwusiarczkowych w zmodyfikowanym białku. Omawiane białkowe izomerazy dwusiarczków występują w miejscu syntezy białek zarówno u zwierząt jak i roślin (71). Sugeruje to, że ten enzym może katalizować *in vivo* właściwe łączenie reszt cysteiny wewnątrz łańcuchów polipeptydowych po ich utworzeniu w procesie translacji. Rola izomerazy prawdopodobnie sprowadza się do utworzenia wiązania dwusiarczkowego między określonymi resztami cysteiny a jednocześnie wpływa na geometrię samego wiązania dwusiarczkowego jak i jego otoczenia.

III-2. Polimeryzacja immunoglobulin klasy A i M

Obok wiązań dwusiarczkowych wewnątrzłańcuchowych występują w immunoglobulinach wiązania dwusiarczkowe międzylańcuchowe. Ostatnio ten problem był badany w doświadczeniach nad tworzeniem się polimerów immunoglobulin klasy A i M (80, 81). W układzie limfatycznym immunoglobuliny jak i inne glikoproteidy są syntetyzowane na łańcuchu polirybosomów i uwalniane do cystern retikulum endoplazmatycznego, skąd wydalone są na zewnątrz komórki przez aparat Golgi'ego. Immunoglobulina klasy A (IgA) (82) wydziela się głównie jako monomer o 7S, z których tworzą się oligomery 10,5S, 13S i 16S. Immunoglobulina M ssaków (IgM) wydziela się w postaci pentameru (81). Polimeryzacji IgA i IgM towarzyszy wbudowywanie fukozy i łańcucha J. *In vitro* polimeryzację IgM przeprowadzono przez redukcję monomerów, które następnie łączyły się w pentamery po usunięciu czynnika redukcyjnego. Dużą wydajność polimeryzacji uzyskiwano w ściśle określonych warunkach stężenia IgM i reduktora. Wydajność polimeryzacji *in vitro* była nie wyższa niż 70%. Obserwacje te dotyczyły zarówno IgA jak i IgM (83). Wykazano, że całkowitą polimeryzację można uzyskać przy udziale enzymu zmieniającego położenie mostków dwusiarczkowych w cząsteczce białka. Enzym ten katalizuje zarówno polimeryzację IgA jak i IgM (83) i jest izomerazą mikrosomową, która katalizuje przemianę wewnętrzną tiol: :dwusiarczek białka. Polimeryzacja IgM do pentameru o strukturze pierścienia (Ryc. 1) prawdopodobnie zachodzi następująco:



W reakcji XI ma istotne znaczenie czynny udział peptydu J (łańcucha J). Kompleks peptydu J z monomerem IgM jest pośrednikiem na drodze przemian prowadzących do powstania pentameru. Ponadto peptyd J spina końce pentameru tworząc strukturę pierścieniową (84, 85).

IV. Uwagi końcowe

Rola dwusiarczków nie sprowadza się tylko do stabilizacji struktury przestrzennej białek i utrzymania połączeń między podjednostkami. Jest dużo danych wskazujących na udział wiązań dwusiarczkowych w różnych funkcjach białek. Aby wyjaśnić istotę różnorodnych funkcji wią-

zań dwusiarczkowych w strukturze białek i peptydów wielu badaczy zwraca uwagę na geometrię samego wiązania dwusiarczkowego i jego otoczenia, dążąc między innymi do wyjaśnienia udziału wiązań dwusiarczkowych białek i peptydów w niektórych procesach katalitycznych i regulacyjnych zachodzących w organizmach żywych.

Zaakceptowano 28.2.1980

PIŚMIENNICTWO

1. Knights R. J., Light A., (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 222—228.
2. Tanford C., Kawahara K., Lapanje S., (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 729—736.
3. Stroud R. M., Kay L. M., Dickerson R. E., (1972) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 125—140.
4. Di Bella F. P., Liener I. E., (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2824—2829.
5. Shapira E., Arnon R., (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1026—1032.
6. Light A., Sinha N. K., (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 1358—1359.
7. Light A., Hardwick B. C., Hatfield L. M., Sondack D. L., (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 6289—6296.
8. Kress L. F., Laskowski M., Sr (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 4925—4929.
9. Cechová D., Bev E., (1974) *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **39**, 680—688.
10. Johnsan P., Smillie L. B., (1974) *FEBS Letters*, **47**, 1—6.
11. Edelman G. M., (1973) *Science*, **180**, 830—840.
12. Porter R. R., (1973) *Science*, **180**, 713—716.
13. Hauptman S. P., Tomasi T. P., (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 3891—3896.
14. Menendez-Botet C. J., Breslow E., (1975) *Biochemistry*, **14**, 3825—3835.
15. Żak Z., Ostrowski W., (1963) *Acta Biochim. Polon.*, **10**, 427—441.
16. Ostrowski W., Skarżyński B., Żak Z., (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, **59**, 515—517.
17. Rhodes M. B., Bennett N., Feeny R. E., (1959) *J. Biol. Chem.*, **234**, 2054—2060.
18. Żak Z., Ostrowski W., Steczko J., Weber M., Gizler M., Morawiecki A., (1972) *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 307—322.
19. Żak Z., Małkiewicz I., Pytasz G., (1977) w „Flavins and Flavoproteins, Physico-chemical properties and function”, red. Ostrowski W. str. 39—50, Polish Sci. Publ., Warszawa, Kraków.
20. Żak Z., (1978) *Zesz. Nauk UJ Prace Biol. Molek.* **5**, 33—43.
21. Massey V., Palmer G., Williams C. H. Jr., Swoboda B. E. P., Sands R. H., (1966) w „Flavins and Flavoproteins” red. E. C. Slater, str. 133—158, Elsevier, Amsterdam.
22. Massey V., Veeger C., (1961) *Biochem. Biophys. Acta*, **33**, 48—56.
23. Thelander L., (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6026—6029.
24. Jones E. T., Williams C. H. Jr., (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 3779—3784.
25. Moore E. C., Reichard P., Thelander L., (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 3445—3452.
26. Laurent T. C., Moore E. C., Reichard P., (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 3436—3444.
27. Eklund H., Brunden C. I., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2305—2309.

28. Reichard P., (1968) *Eur. J. Biochem.*, **3**, 259—266.
29. Thelander L., (1968) *Eur. J. Biochem.*, **4**, 407—422.
30. Hall D. E., Baldestein A., Holmgren A., Reichard P., (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 328—335.
31. Holmgren A., (1968) *Eur. J. Biochem.*, **6**, 475—484.
32. Larsson G., Larsson A., (1972) *Eur. J. Biochem.*, **26**, 119—124.
33. Engström N. E., Holmgren A., Larsson A., Söderhäll S., (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 205—210.
34. Holmgren A., (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4600—4606.
35. Holmgren A., Buchanan B. B., Wolosiuk R. A., (1977) *FEBS Letters*, **82**, 351—354.
36. Fambrough D. M., Bonner J., (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 4434—4439.
37. Hyde E., Walker J. O., (1974) *Nucleic Acids Res.*, **1**, 203—215.
38. Sodgopal A., Bonner J., (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **207**, 227—239.
39. Marks D. B., Paik W. K., Borun T. W., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 5660—5667.
40. Show B. R., Herman T. M., Kovacic R. T., Blandreau G. S., Van-Holde L., (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 505—509.
41. Thomas J. O., Kornberg R. D., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2626—2630.
42. Martinson H. G., McCarthy B. J., (1976) *Biochemistry*, **15**, 4126—4131.
43. Hardison R. C., Eischner M. E., Chalkley R., (1975) *Nucleic Acids Res.*, **2**, 1751—1770.
44. Garrord W. T., Nobis P., Hancock R., (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 4962—4967.
45. Collier J. R., (1975) *Bacterial Rev.*, **39**, 54—85.
46. Olsnes S., Pihl A., (1973) *Biochemistry*, **12**, 3121—3126.
47. Benson S., Olsnes S., Pihl A., Skorve J., Abraham K., (1975) *Eur. J. Biochem.*, **59**, 573—580.
48. Chang T., Neville D. M. Jr., (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 1505—1514.
49. Hishida F., Azuma T., Hanaguchi K., (1976) *J. Biochem.*, (Tokyo) **79**, 91—105.
50. Hayaishi O., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 4251—4260.
51. Sanger F., Fuppy H., (1951) *Biochem J.*, **49**, 463—486.
52. Harris J. I., Sanger F., Naughton M. A., (1956) *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 427—435.
53. Steiner D. F., Kemmler W., Tager H. S., Peterson J. P., (1974) *Fed. Proc.*, **33**, 2105—2115.
54. Rubenstein A. H., Mako M., Walbourne M. F., Steiner D. F., (1970) *Diabetes*, **19**, 546—552.
55. Steiner D. F., (1973) *Nature*, **243**, 528—534.
56. Steiner D. F., Cho S., Oyer P. E., Terris S., Peterson J. D., Rubenstein A. H., (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1365—1374.
57. Schwabe C., McDonald J. K., (1977) *Science*, **197**, 914—915.
58. Harrap K. R., Jackson R. C., Riches P. G., Smith C. A., Hill B. T., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 104—110.
59. Flohe' L., Benöhr H. C., Sies H., Waller H. D., Wendel A., (1974) w „Glutathione”, str. 58, wyd. G. Thieme, Stuttgart.
60. Lucia A. J., Mustafa M. G., Hussain M. Z., Cross C. E., (1975) *J. Clin Invest.*, **55**, 794—802.
61. Mannervik B., Axelsson K., (1975) *Biochem. J.*, **149**, 785—788.
62. Poutremoli S., Traniello S., Euser M., Shapiro S., Horecker B. L., (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **58**, 286—293.

63. Killilea S. D., Brandt H., Lee E. Y. C., Whelon W. J., (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2363—2368.
64. Antoniwi J. F., Nimmo H. G., Yeamon S. J., Cohen P., (1977) *Biochem. J.*, **162**, 423—433.
65. Huong F. L., Gliusman W. H., (1976) *Eur. J. Biochem.*, **70**, 419—426.
66. Shimazu T., Tokutake S., Usami M., (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7376—7382.
67. Ernest M. J., Kim K. M., (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1550—1555.
68. DeLorenzo F., Molea G., (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 593—595.
69. Varandani P. T., (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 642—659.
70. Venetianer P., Straub F. B., (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 166—168.
71. Grynberg A., Nicolas J., Dropron R., (1978) *Biochimie*, **60**, 547—551.
72. Yu-Cang D., Yu-Shang Z., Zi-Xian L., ChenLu T., (1961) *Sci. Sinica*, Peking, **10**, 84—90.
73. White F. H. Jr., (1961) *Fed. Proc.*, **21**, 233—241.
74. Epstein C. J., (1962) *Fed. Proc.*, **22**, 233—237.
75. Isemura T., Tagagi T., Maeda Y., Imai K., (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **5**, 373—378.
76. Goldberger R. F., Epstein C. J., Anfinsen C. B., (1962) *J. Biol. Chem.*, **238**, 628—635.
77. Goldberger R. F., Epstein C. J., Anfinsen C. B., (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 1406—1410.
78. Steiner R. F., DeLorenzo F., Anfinsen C. B., (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 4648—4651.
79. DeLorenzo F., Goldberger R. F., Steers E. Jr., Givol D., Anfinsen C. B., (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 1562—1567.
80. Della Corte E., Parkhause R. M. E., (1973) *Biochem. J.*, **136**, 589—596.
81. Della Corte E., Parkhause R. M. E., (1973) *Biochem. J.*, **136**, 597—606.
82. Fahey J. L., (1961) *J. Exp. Med.*, **114**, 399—413.
83. Bargellesi A., Periman P., Scharff M. D., (1972) *J. Immunol.*, **108**, 126—134.
84. Askonas B. A., Parkhause R. M. E., (1971) *Biochem. J.*, **123**, 629—634.
85. Freedman R. B., (1979) *FEBS Letters*, **97**, 201—210.

ZDZISŁAW ŻAK *

Badania geometrii wiązań dwusiarczkowych za pomocą metod fizycznych

Physical Methods Applied in the Study of Disulphide Bond Geometry

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Własności strukturalne i spektralne wiązań dwusiarczkowych
- III. Zastosowanie spektropolarimetrii do badań geometrii wiązań dwusiarczkowych
- IV. Zastosowanie spektroskopii Ramana do badań geometrii wiązań dwusiarczkowych
- V. Uwagi końcowe

Contents

- I. Introduction
- II. Structural and spectral properties of disulphide bonds
- III. Application of spectropolarimetry in the study of disulphide bond geometry
- IV. Application of Raman spectroscopy in the study of disulphide bond geometry
- V. Concluding remarks

I. Wstęp

Rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze białek od dawna była dyskutowana w wielu pracach oryginalnych i artykułach monograficznych (1, 2, 3, 4, 5, 6). Równocześnie nagromadziło się wiele informacji o roli wiązania dwusiarczkowego w procesach katalitycznych i regulacyjnych (7). Ta wielorakość znaczenia wiązań dwusiarczkowych w funkcji biologicznej białek i peptydów skłoniła licznych autorów do badania geometrii tej części cząsteczki, która zawiera mostek dwusiarcz-

*) Doc. dr hab., Zakład Biochemii Zwierząt, Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński, Grodzka 53, 31-001 Kraków.

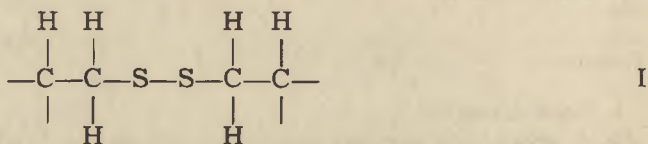
Wykaz stosowanych skrótów: CD — dichroizm kołowy; ORD — dyspersja skręcalności optycznej.

kowy. Wykazano dużą różnorodność w strukturze zarówno samego wiązania dwusiarczkowego jak i związanych z nim węglowodorowych łańcuchów reszt cystyny. Obszerne informacje o geometrii wiązań dwusiarczkowych i ich otoczenia dostarczają metody dyfrakcji promieni X, stosowane w badaniu postaci krystalicznej białek oraz metody fizyczne, które można stosować w badaniach roztworów wodnych. Badania w roztworach wodnych pozwalają na uzyskanie informacji o dynamice zmian zachodzących w cząsteczce białka.

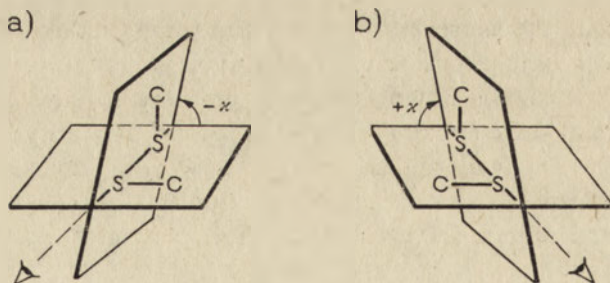
Autor niniejszego artykułu opublikował na łamach *Postępów Biochemii* (7) artykuł omawiający rolę wiązań dwusiarczkowych w strukturze białek, ze szczególnym uwzględnieniem udziału tych wiązań w niektórych procesach katalitycznych i regulacyjnych zachodzących w organizmach żywych. Natomiast w tym artykule przedstawia przegląd zastosowania metod spektrofotometrii, spektropolarymetrii i spektroskopii Ramana do badań geometrii wiązań dwusiarczkowych w strukturze białek.

II. Własności strukturalne i spektralne wiązań dwusiarczkowych

Strukturę wiązań dwusiarczkowych w cystynie, w białkach i innych dwusiarczkach biologicznie ważnych charakteryzuje się łącznie z najbliższym otoczeniem (Wzór I)



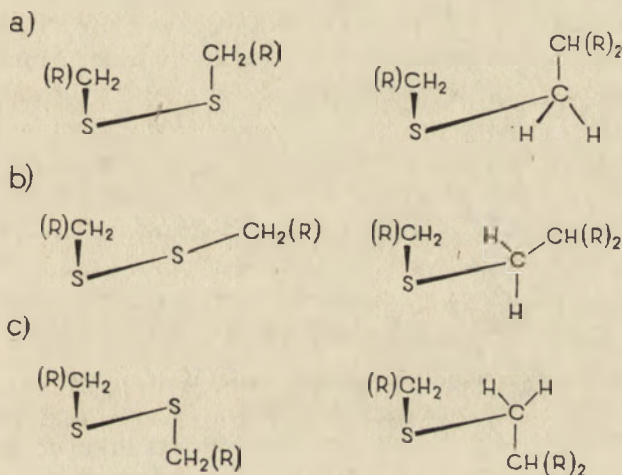
Wielu autorów koncentruje uwagę na geometrii grupy atomów C—S—S—C. Rozpatrują oni ułożenie podstawników w stosunku do osi wiązania S—S i obu wiązań C—S. Podstawową sprawą jest oznaczenie kąta dwuściennego w stosunku do wszystkich trzech wiązań (8). Ryc. 1 przedstawia kąt dwuścienny w osi wiązania S—S czyli kąt χ (CS—SC).



Ryc. 1. Kąt dwuścienny wiązania dwusiarczkowego: a) postać lewoskrętna, b) — postać prawoskrętna. Kąty $-x$ i $+x$ mają identyczne wartości. Obie konformacje są w stosunku do siebie jak obraz do odbicia lustrzanego

Patrząc wzdłuż osi wiązania S—S przeprowadza się dwie płaszczyzny: jedną przez podstawnik przyłączony do bliższego atomu siarki a drugą przez podstawnik dalszego atomu siarki. Płaszczyzny przecinają się na osi wiązania S—S. Wtedy kąt zawarty między tymi dwoma płaszczyznami jest kątem dwuściennym wiązania S—S χ (CS—SC). Gdy tą samą zasadę zastosujemy do wiązania C—S otrzymamy wartość kąta dwuściennego wiązania C—S lub χ (CC—SS).

Znajomość kąta dwuściennego umożliwi określenie z jaką konformacją mamy do czynienia (9). Otóż pierwszy rodzaj konformacji, zwanej *syn-periplenarną* ($\pm SP$), charakteryzuje się tym, że obserwator patrząc wzdłuż osi wiązania widzi, że podstawnik bliższego atomu pokrywa się z podstawnikiem dalszego atomu (Ryc. 2a). Wtedy obie płaszczyzny przechodzące przez podstawniki bliższy i dalszy pokrywają się i nie przecinają się z osią wiązania. Kąt dwuścienny χ (CS—SC) wynosi 0° . Konformacja *syn-periplenarna* jest najmniej trwała.



Ryc. 2. Konformacje wiązań S—S i C—S, a) konformacja *syn-periplenarna* gdy $\chi_{(CS-SC)}$ lub $\chi_{(CC-SS)}$ mają wartości 0° , b) konformacja skośna (*gauche*) lub *syn-klinalna* gdy $\chi_{(CS-SC)}$ lub $\chi_{(CC-SS)}$ mają wartości 60° , c) konformacja *trans* lub *anty-periplenarna* gdy $\chi_{(CS-SC)}$ lub $\chi_{(CC-SS)}$ mają wartości 180°

Drugim rodzajem konformacji jest konformacja skośna (*gauche*) lub *syn-klinalna* ($\pm SC$). Wyróżnia się ona naprzemianległym przestrzennym położeniem podstawników (Ryc. 2b). Kąt dwuścienny χ (CS—SC) wynosi 60° . Trzeci rodzaj konformacji to jest konformacja *trans* lub *anty-periplenarna* ($\pm AP$), wyróżnia się najdalszym przestrzennym położeniem podstawników przy dwu sąsiednich atomach siarki wiązania S—S lub atomu siarki i atomu węgla wiązania C—S. Kąt dwuścienny między kierunkami wiązania wynosi 180° (Ryc. 2c). Konformacja *trans* jest bardzo trwała.

Przedstawione rodzaje konformacji są potraktowane bardzo schematycznie, a wiele danych doświadczalnych wskazuje na znaczne urozmaicenie w konformacji wiązań dwusiarczkowych. W większości związków zawierających mostki dwusiarczkowe, w których nie jest ograniczona rotacja wokół wiązania S—S kąt dwuścienny χ (CS—SC) wynosi 90° . Jednak, gdy wiązanie dwusiarczkowe znajduje się w strukturze pierścienia węglowodorowego, lub gdy jest w złożonej strukturze łańcucha polipeptydowego, wtedy kąt dwuścienny ma wartość różną od 90° . Zmiana kąta dwuściennego wiązania S—S zmienia jego długość i moc. Wykazano, że gdy kąt dwuścienny ma wartość χ (CS—SC) = 90° to odpychanie między elektronami 2 p_z par atomów siarki jest bardzo małe. Wzrost stopnia zlepiania par elektronów p_z jednego atomu siarki z orbitalami 3d drugiego atomu siarki prowadzi do skracania długości wiązania i wzrostu jego mocy. Wiązanie ma charakter wiązania podwójnego (10, 11, 12). Wykazano, że energia rotacji wokół wiązania S—S zależy od kąta χ i wynosi od 3 do 14 kcal/mol w miarę zmiany kąta χ od 90° do 0° (10).

Wiązanie dwusiarczkowe w pierścieniu węglowodorowym o dużej ilości atomów wykazuje wartość kąta $\chi = 90^\circ$. Gdy pierścień zmniejsza się z 7 do 5 atomów następuje wzrost napięcia i zmniejsza się kąt dwuścienny χ (CS—SC) (13). Doskonałym przykładem jest kwas lipoinowy. W postaci utlenionej ma on pierścień złożony z pięciu atomów, a kąt dwuścienny wiązania dwusiarczkowego wynosi 27° . Autorzy przypuszczają, że to wiązanie dwusiarczkowe ma charakter podwójnego wiązania, a wiążące elektrony tworzą zhybrydyzowane orbitale elektronów p i d. Jednak przypuszczenie to budzi znaczne wątpliwości, bo pomiary długości wiązania nie wskazują na jego skracanie (6).

Mostki dwusiarczkowe w białkach mają bardzo ograniczoną rotację, co prowadzić może do konformacji odpowiadającej dwu różnym postaciom asymetrycznych cząsteczek będących w stosunku do siebie lustrzanymi odbiciami (Ryc. 1 a i b). Przedstawione na rycinie 1 dwie konformacje skośne są odbiciami lustrzanymi nie nakładających się na siebie postaci. Kąt dwuścienny odpowiada strukturze śruby prawoskrętnej ($+\chi$) (Ryc. 1 b) lub lewoskrętnej ($-\chi$) (Ryc. 1 a). Jeżeli w materiale przeważają cząsteczki o kierunku prawoskrętnej spirali lub odwrotnie, to wykazują one czynność optyczną (14, 15). Przy zastosowaniu metod spektropolarymetrycznych można odróżnić czynność optyczną dwusiarczków od optycznej czynności innych grup atomów.

Wiązania dwusiarczkowe charakteryzują się pasmem absorpcji w ultrafiolecie w zakresie 250—380 nm. Jednakże w białkach absorpcja w tym zakresie pokrywa się z absorpcją reszt aminokwasów aromatycznych (16). Niemniej ich widma różnicowe pozwoliły ustalić, że maksimum absorpcji zależy od długości wiązania S—S i wartości kąta dwuściennego (χ) (17). W badaniach modelowych kwasu tiooktanowego i innych wykazano prze-

suwanie się maksimum absorpcji w kierunku fal dłuższych i zmniejszania się absorpcji w miarę zmniejszania się kąta dwuściennego. Kwas 6,8-dwutiooktanowy zawierający pierścień pięcioczłonowy ma maksimum absorbancji przy 325 nm, a $E_{325} = 180$. Natomiast kwas 4,8-dwutiooktanowy zawierający pierścień siedmioczłonowy ma maksimum absorbancji przy 250 nm i $E_{250} = 490$.

III. Zastosowanie spektropolarymetrii do badań geometrii wiązań dwusiarczkowych

Oznaczenia spektropolarymetryczne przeprowadza się stosując światło spolaryzowane i monochromatyczne (18). Pomiary charakteryzują własności optyczne chromoforów w zależności od długości fali światła. Stosowane są dwie metody: 1. metoda skręcalności optycznej i dyspersji światła płasko spolaryzowanego, określona skrótem ORD. 2. metoda dichroizmu kołowego, określona skrótem CD, polegająca na oznaczeniu różnicowej absorpcji światła kołowo spolaryzowanego. Fizyczne podstawy dyspersji skręcalności optycznej i kołowego dichroizmu są takie same. Promień światła spolaryzowanego płasko powstaje po przejściu przez polaryzator zwany pryzmatem Nicolla. Światło spolaryzowane płasko składa się z fal spolaryzowanych kołowo w lewo i spolaryzowanych kołowo w prawo w równoważnych natężeniach. Przez światło spolaryzowane w prawo (P) rozumiemy takie fale, których wektory elektryczne obracają się zgodnie ze wskazówkami zegara, gdy obserwator patrzy od strony źródła światła. Odwrotnie zachowuje się wektor elektryczny w promieniu światła spolaryzowanego w lewo (L).

Gdy promień światła przechodzi przez materię zachodzi oddziaływanie z elektronami atomów badanego związku chemicznego. Ta interakcja powoduje redukcję szybkości przechodzenia światła i zmianę amplitudy wektora elektrycznego. Zmniejszenie szybkości przechodzenia wyraża się w refrakcji światła, którą opisuje współczynnik refrakcji n ; obniżenie amplitudy wektora elektrycznego opisuje się za pomocą współczynnika absorbancji molowej ϵ . Oba współczynniki, n i ϵ , zależą od długości fali światła i odpowiadają strukturze elektronowej i geometrii cząsteczki.

Refrakcja i absorpcja światła spolaryzowanego i niespolaryzowanego jest jednakowa w przypadku cząsteczek substancji nieczynnych optycznie. Natomiast substancje optycznie czynne posiadające cząsteczki asymetryczne są wrażliwe na działanie światła spolaryzowanego płasko. Różnią się one współczynnikami refrakcji promienia spolaryzowanego kołowo w lewo (n_L) i promienia spolaryzowanego w prawo (n_P). Tak też przedstawia się sprawa z absorpcją przez daną substancję optycznie czynną; współczynnik molowej absorbancji promienia spolaryzowanego

kołowo w lewo ϵ_L jest różny od współczynnika absorpcji promienia spolaryzowanego w prawo ϵ_P .

Właśnie zjawisko dyspersji skręcalności optycznej określa różnice współczynników refrakcji między promieniami spolaryzowanymi w lewo i w prawo: $n_L - n_P$. Stąd kąt skręcenia α wyraża się w stopniach, jak opisuje równanie II:

$$\alpha_\lambda = \frac{180 d}{\lambda} (n_L - n_P) \quad \text{II}$$

gdzie α_λ oznacza obserwowaną skręcalność światła spolaryzowanego płasko o długości fali λ , d — grubość warstwy substancji optycznie czynnej. W wielu publikacjach wyraża się skręcalność właściwą $[\alpha]_\lambda$ i molową $[M]_\lambda$ (Równania III i IV):

$$[\alpha]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda}{dc} \quad \text{III}$$

$$[M] = \frac{\alpha_\lambda M}{100 dc} \quad \text{IV}$$

gdzie c — oznacza stężenie w g/ml, zaś M — oznacza gramocząsteczkę substancji optycznie czynnej. Skręcalność światła spolaryzowanego polimerów wyraża się w postaci skręcalności resztowej $[m]_\lambda$ określonej równaniem V:

$$[m]_\lambda = \frac{\alpha_\lambda M_0}{100 dc} \quad \text{V}$$

M_0 — średnia masa cząsteczkowa monomeru. Skręcalność resztowa białek $[m]_\lambda$ przeliczana jest na średnią wartość gramocząsteczki pojedynczej reszty aminokwasowej, która wynosi 115 (18). Widmo ORD jest krzywą ujmującą zależność między długością fal światła a skręcalnością optyczną wyrażoną jako α , $[\alpha]$, $[M]$ lub $[m]$.

Substancje optycznie czynne absorbują różnicowo światło spolaryzowane kołowo. Porównanie współczynników absorpcji pozwoli ocenić różnice w absorpcji:

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_P \quad \text{VI}$$

Wartość $\Delta\epsilon$ nazywa się dichronizmem kołowym. Jest ona dodatnia jeżeli $\epsilon_L - \epsilon_P > 0$, a ujemna gdy $\epsilon_L - \epsilon_P < 0$. To zróżnicowanie światła spolaryzowanego po przejściu przez substancję optycznie czynną można określić jako zmianę eliptyczności Θ . Eliptyczność wyraża się równaniem:

$$\Theta = 3300 \Delta\epsilon \quad \text{VII}$$

Najczęściej przelicza się eliptyczność obserwowaną Θ na eliptyczność molową lub resztową:

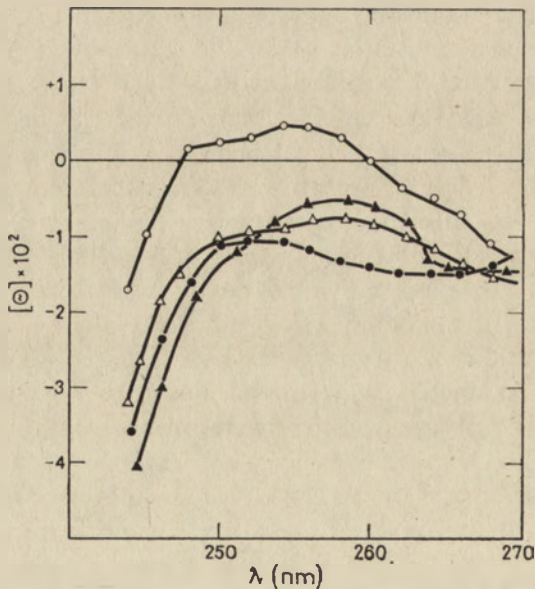
$$[\Theta]_{\lambda} = \frac{M (\text{lub } M_0) \Theta_{\lambda}}{10 \text{ dc}} \quad \text{VIII}$$

M lub M_0 oznacza wartość gramocząsteczki całego związku lub monomeru (oznaczenia jak w równaniach IV i V), d — droga światła przez roztwór w cm, c — stężenie substancji w g/ml. Krzywa ujmująca zależność wartości eliptyczności Θ lub $[\Theta]$ od długości fali światła nazywa się widmem CD lub widmem dichroizmu kołowego.

W białkach występują liczne grupy optycznie czynne tzw. chromofory: wiązania peptydowe, reszty aromatycznych aminokwasów, optycznie czynne ligandy białek i mostki dwusiarczkowe. W dalszym tekście przedstawione zostaną niektóre zastosowania metod spektropolarymetrycznych do interpretacji własności strukturalnych mostków dwusiarczkowych w białkach.

Czynność optyczną wiązań dwusiarczkowych bada się spektropolarymetrycznie w pomiarach skręcalności optycznej i jej dyspersji oraz przez pomiary zmiany eliptyczności w dichroizmie kołowym. Do ustalenia zależności między parametrami wiązań grupy C—S—S—C a znakami i wartościami w dichroizmie kołowym i dyspersji skręcalności optycznej użyto prostych związków organicznych. W związkach o budowie dwusiarczków pierścieniowych wykazano, że dodatnie pasmo dichroizmu kołowego w maksimum absorpcji λ_{max} jest spowodowane zmianą rezonansu elektronowego w strukturze dodatniego kąta dwusciennego $+\chi$, a ujemne pasmo dichroizmu kołowego jest spowodowane zmianami rezonansowymi elektronów w strukturze ujemnego kąta $-\chi$ (19). Jako związki modelowe z wiązaniami dwusiarczkowymi były też stosowane cystyna i jej pochodne. W krystalicznej L-cystynie wiązanie dwusiarczkowe ma układ prawoskrętny (20), a chlorowodorek cystyny, L-glicylo-cystyna, bromowodorek L-cystyny mają strukturę lewoskrętną spirali. W roztworach zarówno L-cystyna, L-homocystyna jak i wiele dwusiarczków alifatycznych ma aktywność optyczną w zakresie 243—248 nm (21, 22). W roztworze obojętnym cystyna ma maksimum zmiany eliptyczności w dichroizmie kołowym przesunięte w kierunku fal długich. Wysoka rotacja optyczna dwusiarczków w L-cystynie wskazuje na chiralność grupy dwusiarczkowej (23). Asymetria wiązania dwusiarczkowego w cystynie i jej wpływ na czynność optyczną posłużyły do interpretacji czynności optycznej wiązań dwusiarczkowych w peptydach i białkach. Zmianę kąta dwusciennego χ grupy CSSC badano spektropolarymetrycznie w oksytocynie (24) i inhibitorze trypsyny (25). Dodatnie pasmo w widmie dichroizmu kołowego z maksimum w 250 nm, jest spowodowane energetycznymi przeniesieniami elektronów w dwusiarczkach. Niedogodność tych badań w białkach jest powodowana częstym występowaniem czynności optycznej aromatycznych reszt aminokwasów, która nakłada się na zakres wiązań dwusiarczkowych.

Przykładem białka które zawiera wiele wiązań dwusiarczkowych przy niskiej zawartości reszt aromatycznych jest bydlęca neurofyzyna, która przenosi oksytocynę i wazopresynę w układzie neuroprzysadkowym (5, 26). Ten polipeptyd o masie 10 000 daltonów zawiera siedem mostków dwusiarczkowych ponadto tylko jedną resztę tyrozyny i trzy reszty fenyloalaniny. W roztworze wodnym neurofyzyna ma dwa pasma w widmie dichroizmu kołowego z maksimum przy 248 nm i 278 nm. Według dotychczasowych poglądów (5, 26) z eliptyczności pasm 248 nm i 278 nm nie jest możliwe uzyskanie informacji o geometrii każdego pojedynczego wiązania dwusiarczkowego w neurofyzynie jak też w innych białkach. Niemniej długości fali indywidualnych przeniesień mostków dwusiarczkowych w bliskim ultrafiolecie są zależne od kątów dwuściennych mostków dwusiarczkowych. Wartości maksimum w widmie dichroizmu kołowego, wielkości zmian eliptyczności i kierunek tych zmian, są rezultatem przemian zachodzących w obrębie wszystkich mostków dwusiarczkowych cząsteczki. Badania strukturalne neurofyzyny (5, 26) wykazują, że dodatnie pasmo 248 nm odpowiada wartości kąta $\chi = 90^\circ$. Ponadto informacje o pasmach 248 nm i 278 nm z widma dichroizmu kołowego neurofyzyny potwierdzono doświadczeniami, w których obserwowano zmiany konformacyjne zachodzące w tym polipeptydzie podczas redukcji. Po redukcji jednego wiązania dwusiarczkowego następuje całkowity zanik pasma 248 nm i przesunięcie maksimum w 278 nm w kierunku fal krót-



Ryc. 3. Widmo kołowego dichroizmu w zakresie aktywności wiązań dwusiarczkowych białka wiążącego ryboflawinę (●) i jego kompleksów z ryboflawiną (○), FMN (△) i FAD (▲). Oznaczenia były przeprowadzane w 0,1 M buforze fosforanowym (Na) w pH 7,0. (27)

szych, ze zmniejszeniem się zmiany eliptyczności w zakresie 278 nm. Efekt reoksydacji zredukowanej neurofizyny badano również metodą dichroizmu kołowego i wykazano, że tylko 50% cząsteczek wraca do postaci natywnej.

Białko z jaja kurzego transportujące ryboflawinę także zawiera liczne mostki dwusiarczkowe. W badaniach widma dichroizmu kołowego (27) wykazano udział w czynności optycznej (Ryc. 3) wiązań dwusiarczkowych w pasmie 255 nm ze zmianą w obu kierunkach. Flawoproteid ryboflawinowy wykazuje zmianę eliptyczności w kierunku dodatnim, apoproteid i jego kompleksy z nukleotydami flawinowymi w kierunku ujemnym; stąd sądzi się, że podczas powstawania kompleksów apoproteidu z flawinami zmienia się geometria wiązań dwusiarczkowych.

W lizozymie dwa wiązania dwusiarczkowe mają kąt dwuścienny $\chi = +100^\circ$ a pozostałe dwa $\chi = -100^\circ$ (6). W roztworach lizozymu oraz innych białek o znanych parametrach wiązań dwusiarczkowych, jak rybonukleaza, chymotrypsyna i karboksypeptydaza A pasma eliptyczności występują w obszarze fal dłuższych niż 240 nm (28).

IV. Zastosowanie spektroskopii Ramana do badań geometrii wiązań dwusiarczkowych

Technika spektroskopii ramanowskiej opiera się na pomiarach częstości drgań światła rozproszonego. Jeżeli foton światła zderza się z cząsteczką elastycznie, tzn. gdy nie zachodzi utrata energii, lecz zmienia się tylko jej kierunek, to takie rozproszenie nazywa się rozproszeniem Rayleigh'a. Natomiast podczas nieelastycznego zderzenia się fotonu światła z cząsteczką zachodzi zmiana energii zarówno fotonu jak i cząsteczki, a światło rozproszone o zmienionej energii nazywamy ramanowskim. W cząsteczce naświetlanego związku wzrasta poziom energii oscylacji i rotacji, a światło rozproszone ma zmienioną częstość drgań. Jeżeli światło padające na badaną substancję ma częstość ν_0 to powstałe pasma w widmie Ramana są o częstościach: $\nu_1 = \nu_0 \pm \nu'$; $\nu_2 = \nu_0 \pm \nu''$ itd., przy czym zmienione częstości ν' i ν'' niezależne są od częstości ν_0 .

Widmo Ramana daje dużo informacji na temat zmian energetycznych cząsteczek, podobnie jak badania absorpcji w podczerwieni. W przypadku cząsteczek związków biologicznie czynnych metoda Ramana ma duże znaczenie gdyż można ją szerzej stosować w badaniach roztworów wodnych. Obok zmian zachodzących w wiązaniu peptydowym i w różnych resztach aminokwasów spektroskopia Ramana pozwala wnikliwie badać geometrię wiązań dwusiarczkowych. W kilku ostatnich latach w krajowym piśmiennictwie artykuły Siemiona (29), Twardowskiego (30) i Żaka (31) przedstawiały zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniach biochemicznych.

Wiązania dwusiarczkowe i siarczkowe występujące w łańcuchach polipeptydowych białek dają bardzo interesujące pasma Ramana w zakresie od 100 cm^{-1} do 800 cm^{-1} , przy czym najbardziej interesujący jest zakres od 500 cm^{-1} do 550 cm^{-1} . W tym zakresie bowiem rozproszenie Ramana odpowiada rotacji wiązań S—S, na którą mogą wpływać rotacje wiązania C—S i C_{α} — C_{β} reszt cystyny (32, 33).

Badania nad strukturą wiązań dwusiarczkowych w białkach są zwykle poprzedzane badaniami związków modelowych (2, 3, 4, 34). Następnie próbuje się stosować uzyskane wyniki do złożonych struktur natywnych białek. Interesujące nas pasmo w widmie Ramana analizuje się następująco: dokładnie określa się maksimum częstości drgań, szerokość półkową pasma i oznacza się wartość stosunku intensywności dwu różnych pasm, które charakteryzują dany fragment cząsteczki. W spektroskopii Ramana mostki dwusiarczkowe polipeptydów dają pasma odpowiadające częstości drgań $\nu_{(S-S)}$ i $\nu_{(C-S)}$. Stosunek intensywności pasma $\nu_{(C-S)}$ do $\nu_{(S-S)}$ pozwala ustalić pewne zależności w konformacji wiązań dwusiarczkowych. Autor przedstawia poniżej przykłady prób interpretacji pasm widma Ramana informujących o własnościach strukturalnych mostków dwusiarczkowych.

Rybonukleaza, na przykład, ma cztery mostki dwusiarczkowe; natywna rybonukleaza w roztworze wodnym wykazuje pasma rozpraszania ramanowskiego w 509 cm^{-1} i 659 cm^{-1} (35). Lord i Yu (35, 36) wykazali, że stosunek intensywności $\nu_{(S-S)}$ i $\nu_{(C-S)}$, które odpowiadają pasmom 509 cm^{-1} i 659 cm^{-1} mogą zależeć od kątów dwuściennych wiązania dwusiarczkowego.

Metodą spektroskopii Ramana badano toksynę z węża *Palamus platurus*, która zawiera cztery mostki dwusiarczkowe na ogólną liczbę 62 reszt aminokwasowych. W tym peptydzie (37) obserwowano częstość $\nu_{(S-S)}$ w pasmie rozproszenia ramanowskiego przy 512 cm^{-1} . Niskocząsteczkowe związki modelowe zawierające wiązanie dwusiarczkowe i w widmie Ramana pasmo $\nu_{(S-S)} = 512\text{ cm}^{-1}$ mają w fragmencie CSSC konformację skośną—skośną—skośną. Jednak w przypadku toksyny z węża *Palamus*, autorzy obok ostrego pasma 512 cm^{-1} wykazali obecność asymetrycznego ramienia tego pasma z wzrostem rozproszenia przy 525 cm^{-1} , i na tej podstawie przyjęli, że z czterech mostków dwusiarczkowych tylko dwa mają konformację skośna—skośna—skośna. Natomiast pozostałe dwusiarczki są w konformacji *trans*—skośna—skośna i *trans*—skośna—*trans*. Po denaturacji cieplnej widmo Ramana tego peptydu ma pasmo 512 cm^{-1} z ramieniem rozszerzającym się, a maksimum tej asymetrii przypada w pasmie 546 cm^{-1} . Autorzy sugerują (37), że po ogrzaniu pojawia się nowy typ oscylacji rozciągających wiązanie S—S, chociaż większość wiązań S—S pozostaje w tej samej geometrii. Nowe pasmo oscylacyjne pojawia się w widmie Ramana w związku z konformacją

typu *trans*—skośna—*trans* jednego lub dwu mostków dwusiarczkowych. Autorzy sądzą, że pasmo $\nu_{(S-S)} = 510 \text{ cm}^{-1}$ ma związek z rozpraszaniem wiązania dwusiarczkowego o konformacji skośna—skośna—skośna. Pasmo o częstotliwości $\nu_{(S-S)} = 525 \text{ cm}^{-1}$ odpowiada rozpraszaniu wiązania o konformacji *trans*—skośna—skośna. Natomiast pasmo $\nu_{(S-S)} = 540 \text{ cm}^{-1}$ odpowiada rozpraszaniu wiązania dwusiarczkowego o konformacji *trans*—skośna—*trans*.

Wnioski uzyskane z badań dyfrakcji promieni X dla dwusiarczków w stanie stałym można w przypadku podobnego widma Ramana zastosować do substancji badanych w roztworach.

Jeśli wielkość $\nu_{(S-S)}$ związku krystalicznego jest identyczna z tą wielkością tej samej substancji w roztworze, to świadczy to o identyczności konformacji wiązań dwusiarczkowych w obu warunkach. Van Wart i Scheraga (3) wykorzystali badania dyfrakcji promieni X w białkach krystalicznych aby wyznaczyć kąty dwuściennie $\chi_{(SS-CC)}$ następujących białek: papainy, karboksypeptydazy A, rybonukleazy, inhibitora trypsyny z trzustki bydłowej i lizozymu, α -chymotrypsyny i elastazy. W badanych białkach zawierających sumarycznie 30 reszt cystyny oznaczono wartości kątów dwuściennych $\chi_{(SS-CC)}$ dla 60 wiązań C—S. Okazało się, że w około 45% reszt cystynowych wartość kąta $\chi_{(SS-CC)}$ mieści się w zakresie od 80° do 90° ; nie odpowiada to konformacji skośnej, autorzy przeto określili tę konformację jako B. Około 35% ma konformację *trans* (T), kąt dwuścienny $\chi_{(SS-CC)} = 180^\circ$, a około 20% reszt cystyny ma najmniejszą wartość kąta $\chi_{(SS-CC)}$ w zakresie od 20° do 30° i tę postać nazwano konformacją A. Niejednoznaczne wyniki uzyskano podczas uzgadniania geometrii wiązania C—S z wartością $\nu_{(S-S)}$ w widmie Ramana; grupa badaczy sugeruje (4), że wartość $\nu_{(S-S)}$ ok. 510 cm^{-1} odpowiada konformacji B i T, zaś konformację A charakteryzuje pasmo $\nu_{(S-S)} = 525 \text{ cm}^{-1}$.

Powyżej omawiane badania struktury wokół wiązania C—S rozpatrywano przy minimum energii kąta $\chi_{(CS-SC)} = \pm 90^\circ$. Ponadto prowadzono badania nad zależnością między częstotliwością $\nu_{(S-S)}$ a wartością kąta $\chi_{(CS-SC)}$ w zakresie od 0° do 90° (3). Alifatyczne dwusiarczki po korekcie pasma $\nu_{(S-S)}$ podzielono na 3 grupy o wartościach $\nu_{(S-S)}$: $508,8 \text{ cm}^{-1}$, $494,9 \text{ cm}^{-1}$ i $486,4 \text{ cm}^{-1}$ i odpowiadających im kątach $\chi_{(CS-SC)}$ 60° , 30° i 10° . Autorzy przedstawili tę zależność jako liniową. Próbowano wykorzystać tę zależność do określenia konformacji wiązania S—S w łańcuchu polipeptydowym. Martin (39) badał pentapeptyd molforminę A, która ma bardzo niską wartość $\nu_{(S-S)} = 492 \text{ cm}^{-1}$; wskazuje to na kąt dwuścienny $\chi_{(CS-SC)} = 35^\circ$, przy dużej zgodności z innymi wynikami badań. Yu i współ. (40, 41) również wykazali że insulina ma wartość $\nu_{(S-S)} = 492 \text{ cm}^{-1}$. Wartość tego pasma wskazuje na kąt $\chi_{(CS-SC)} = 35^\circ$. Wiadomo, że mostek dwusiarczkowy w łańcuchu A między resztą 6 i 11 Cys tworzy małą pętlę. Z małej wartości kąta dwuściennego $\chi_{(CS-SC)}$ oznaczo-

nej metodą Ramana można było wnioskować, że geometria omawianego wiązania odpowiada strukturze stanu napiętego. Jednak badania kryształicznej insuliny metodą dyfrakcji promieni X wykazały, że kąt dwuścienny $\chi_{(CS-SC)}$ wewnątrz łańcucha A jest znacznie większy (41).

V. Uwagi końcowe

Dotychczasowe badania wskazują, że geometria dwusiarczków w łańcuchu polipeptydowym jest bardzo urozmaicona. Różnorodność funkcji dwusiarczków uzasadnia dalsze badania ich struktury, co może okazać się drogą do znalezienia zależności między funkcją i strukturą mostków dwusiarczkowych i ich otoczenia. Badania własności strukturalnych kryształicznych białek i ich roztworów przy zastosowaniu spektropolarymetrii i spektroskopii ramanowskiej torują drogę do uzyskania takich niezmiernie ważnych informacji.

Zaakceptowano 23.2.1980

PISMIENICTWO

1. Beychok S., (1966) *Science*, **154**, 1288—1290.
2. Van Wart H. E., Lewis A. H., Scheraga A. H., (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2619—2622.
3. Van Wart H. E., Scheraga H. A., (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 1812—1822.
4. Van Wart H. E., Scheraga H. A., (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 1823—1832.
5. Menendex-Botet C. J., Breslow E., (1975) *Biochemistry*, **14**, 3825—3835.
6. Panijpan B., (1977) *J. Chem. Education*, **54**, 670—672.
7. Zak Z., (1980) *Post. Biochem.*, **26**, 343—358.
8. Penney W. G., Sutherland G. B. B. M., (1934) *J. Chem. Phys.*, **2**, 492—498.
9. Kline W., Prelog V., (1960) *Experientia*, **16**, 521—523.
10. Stendel R., (1975) *Angew Chem. Int. Edit.*, **14**, 655—661.
11. Webb J., Strickland R. W., Richardson F. S., (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4775—4779.
12. Boyd D. B., (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8799—8803.
13. Schmidt U., Grafen P., Goedde H. W., (1965) *Angew. Chem. Int. Edit.*, **4**, 846—849.
14. Ludescher U., Schwyzer R., (1971) *Helv. Chim. Acta*, **54**, 1637—1642.
15. Linderberg J., Michl J., (1970) *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2614—2619.
16. Otey M. C., Greenstein J. P., (1954) *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 501—513.
17. Baltrop J. A., Hayes P. M., Calvin M., (1954) *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4348—4352.
18. Freifelder D., (1976) w *Physical Biochemistry*, red. Freeman W. H. San Francisco, str. 444—474.
19. Carmack M., Neubert L. A., (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7134—7138.

20. Oughton B. M., Harrison P. M., (1959) *Acta Cryst.*, **12**, 396—402.
21. Ottnad M., Ottnad C., Hartter P., Jung G., (1975) *Tetrahydron*, **31**, 1155—1161.
22. Takagi T., Ito N., (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **257**, 1—10.
23. Casey J. P., Martin R. B., (1972) *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6141—6147.
24. Beychok S., Breslow E., (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 151—154.
25. Yoshida C., Yoshikawa M., Takagi T., (1976) *J. Biochem.*, **80**, 449—456.
26. Schlesinger D. H., Frangione B., Walter R., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3350—3358.
27. Żak Z., Ostrowski W., Steczko J., Weber M., Gizler M., Morawiecki A., (1972) *Acta Biochim. Polon.*, **19**, 307—323.
28. Birktoft J. J., Blow D. M., (1972) *J. Mol. Biol.*, **68**, 187—194.
29. Siemion I. Z., (1974) *Post. Biochem.*, **20**, 303—316.
30. Twardowski J., (1978) *Post. Biochem.*, **24**, 373—393.
31. Żak Z., (1978) *Zesz. Nauk. U.J. Prace Biol. Molek.*, **5**, 33—43.
32. Sugeta H., Go A., Miyazawa T., (1972) *Chem. Lett.*, **5**, 83—86.
33. Nakanishi M., Tokasada H., Tsubai M., (1974) *J. Mol. Biol.*, **89**, 241—243.
34. Van Wart H. E., Cordinaux F., Scheraga H. A., (1976) *J. Phys. Chem.*, **80**, 625—630.
35. Lord R. C., Yu N. T., (1970) *J. Mol. Biol.*, **50**, 509—524.
36. Lord R. C., Yu N. T., (1970) *J. Mol. Biol.*, **51**, 203—219.
37. Tu A. T., Jo B. H., Yu N. T., (1976) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **8**, 337—343.
38. Sugeta H., Go A., Miyazawa T., (1973) *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, **46**, 3407—3411.
39. Martin R. B., (1974) *J. Phys. Chem.*, **78**, 855—862.
40. Yu N. T., Jo B. H., Chang C. L., Huber J. D., (1974) *Arch. Biochem. Biophys.*, **160**, 614—620.
41. Yu N. T., Jo B. H., (1973) *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 5033—5037.

ANDRZEJ STASIAK *

Enzymy restrykcyjne. I. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II

Restriction Enzymes. I. Mechanisms of Action of Type II Restriction-Modification Systems

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Budowa enzymów
- III. Charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II
- IV. Swoistość rozpoznawania DNA przez enzymy restrykcyjne typu II
- V. Mechanizm działania właściwych endonukleaz restrykcyjnych typu II
- V-1. Budowa przestrzenna rozpoznawanych sekwencji DNA
- V-2. Charakterystyka aktywności endonukleolitycznych
- V-3. Nietypowe zasady w DNA a jego podatność na działanie endonukleaz typu II
- V-4. Inne niż modyfikacja sposoby ochrony DNA przed restrykcją
- V-5. Endonukleazy o obniżonej specyficzności
- V-6. Działanie endonukleaz na syntetyczne oligonukleotydy i wpływ zasad otaczających miejsce rozpoznawane na szybkość cięcia
- VI. Nietypowe enzymy restrykcyjne typu II

Contents

- I. Introduction
- II. Enzyme structure
- III. Genetic characteristics of type II restriction — modification systems
- IV. Specificity of DNA recognition by type II restriction enzymes
- V. Mechanism of action of strictly type II restriction endonucleases
- V-1. Spatial structure of recognized DNA sequences
- V-2. Properties of endonucleolytic activities
- V-3. Changes in type II endonuclease activities due to the presence of atypical bases in DNA

* Mgr, Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

V-4. Protection of DNA against restriction by other mechanisms than modifications**V-5. Endonucleases with lowered specificity****V-6. Activity of endonucleases versus synthetic oligonucleotides and effect of base sequences proximal to the recognition site on****VI. Atypical restriction enzymes of type II****I. Wstęp**

Zjawisko restrykcji i modyfikacji bakteriofagów jest znane od roku 1952. W tym czasie Luria i jego współpracownicy (1—3) opisali kontrolowaną przez bakterie niedziedziczną zmienność bakteriofagów. Stwierdzili oni, że bakteriofagi namnożone w komórkach danego szczepu bakteryjnego wykazują znaczne obniżenie zdolności infekowania bakterii innych szczepów tego samego gatunku, zachowując pełną zdolność infekcji komórek szczepu wyjściowego. Udowodnili oni również, że zjawisko to jest zależne wyłącznie od właściwości komórek bakteryjnych i z danych tych wnioskowali o obecności specjalnego mechanizmu komórkowego odpowiedzialnego za ten proces. Dopiero w dziesięć lat później Arber i Dussoix (4, 5) zaproponowali, iż w komórkach bakteryjnych znajdują się dwa różne enzymy: restrykcyjny i modyfikacyjny. Pierwszy z nich — endonukleaza, miał rozpoznawać określoną, swoistą dla niego sekwencję nukleotydów i następnie przecinać obie nici DNA. Drugi enzym — modyfikujący DNA, miał rozpoznawać tę samą specyficzną sekwencję DNA i modyfikować ją tak, by stawała się nierozpoznawalna przez endonukleazę. Według tej koncepcji DNA komórek bakteryjnych jest zawsze modyfikowany przez własne enzymy modyfikujące i w ten sposób chroniony przed działaniem własnych enzymów restrykcyjnych. Wnikający do komórki obcy DNA (fagowy lub bakteryjny) o niemodyfikowanej specyficznej sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez endonukleazę restrykcyjną gospodarza będzie wobec tego cięty przez ten enzym. Właśnie ten proces cięcia DNA uniemożliwiający rozwój bakteriofagów w komórkach bakteryjnych, powoduje zjawisko restrykcji bakteriofagów.

Badania biochemiczne enzymów restrykcyjnych i modyfikacyjnych rozpoczęto w 1968 r., kiedy wyizolowano endonukleazę restrykcyjną z komórek *E. coli* (6, 7). Od tego czasu opisano ponad 100 endonukleaz restrykcyjnych i wiele odpowiadających im metylaz modyfikacyjnych — DNA-metyltransferaz, opracowano ich klasyfikację i nomenklaturę.

Na podstawie analizy właściwości dotychczas opisanych enzymów restrykcyjnych wyróżniono początkowo dwa (8), a później trzy ich różne typy (9, 10). Dane przedstawione w Tabeli 1 obrazują zasadnicze cechy trzech typów enzymów restrykcyjnych.

Tabela 1

Podstawowe własności trzech typów endonukleaz restrykcyjnych

Właściwość	Typ Enzymu		
	I	II	III
Rozpoznanie specyficznej sekwencji nukleotydów	tak	tak	tak
Wymaganie Mg ⁺⁺	tak	tak	tak
Wymaganie ATP	tak	nie	tak
Wymaganie AdoMet	tak	nie	nie
Aktywność ATPazy	tak	nie	nie
Specyficzność miejsca cięcia	nie	tak	tak
Ciężar cząsteczkowy	~ 400 000	25 000—200 000	~ 200 000

Ogólnie przyjęta nomenklatura enzymów restrykcyjnych obowiązuje od 1973 roku. Smith i Nathans (11) zaproponowali, aby endonukleazy restrykcyjne i odpowiadające im metylazy modyfikacyjne, stanowiące razem enzymy systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego sygnować trzyliterowymi nazwami oznaczającymi rodzaj i gatunek organizmu, z którego zostały wyizolowane. W razie potrzeby czwartą literę dodaje się dla oznaczenia szczepu lub typu serologicznego, jeżeli poszczególne szczepy tego samego gatunku różnią się swoistością enzymów restrykcyjnych. W skrótach nazwy enzymów restrykcyjnych kodowanych przez geny plazmidów lub fagów czwarta litera oznacza te plazmidy lub fagi. Rzymska cyfra na końcu nazwy oznacza kolejne systemy restrykcyjno-modyfikacyjne odkryte w bakteriach danego gatunku lub szczepu bakteryjnego. I tak np. HindIII oznacza trzeci system restrykcyjno-modyfikacyjny odkryty w szczepie o typie serologicznym d gatunku *Haemophilus influenzae*, EcoRI oznacza pierwszy odkryty system restrykcyjno-modyfikacyjny kodowany w genach plazmidów lekooporności R *Escherichia coli*. Endonukleazy EcoRI i HindIII są to enzymy restrykcyjne systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych EcoRI i HindIII, z kolei metylazy EcoRI i HindIII to DNA — metyltransferazy będące enzymami modyfikacyjnymi tych systemów.

Trudno przecenić znaczenie odkrycia wysoce specyficznych endonukleaz jakimi są endonukleazy restrykcyjne. Zapoczątkowało ono erę inżynierii genetycznej. Użycie endonukleaz restrykcyjnych umożliwia tworzenie nowych kombinacji genowych, ułatwia precyzyjne określenie wzajemnego położenia genów, a także ustalenie ich sekwencji nukleotydowej. W większości laboratoriów zainteresowanie tymi enzymami sprowadza się jedynie do używania ich w charakterze precyzyjnych narzędzi obróbki DNA, ostatnio coraz częściej enzymy te stają się także przedmiotem badań. Badane są między innymi ich niezwykle wysoka specyficzność interakcji z DNA, skomplikowany mechanizm działania, a także me-

chanizm regulacji ekspresji genów kodujących te enzymy. Te zagadnienia są też głównym tematem poniższej pracy.

Ukazało się już wiele prac przeglądowych o enzymach restrykcyjnych i ich stosowaniu (5, 8, 12—18), jednak w języku polskim jedynie jedna (19) i to już ponad siedem lat temu.

Ze względu na obszerność tematu koniecznym stało się rozbić pracy na dwie części. Pierwsza część omawia systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II.

II. Budowa enzymów

Endonukleazy restrykcyjne typu II (porównaj Tabela 1) stanowią najlichnieszą opisaną grupę enzymów restrykcyjnych. Charakteryzująca je wysoka swoistość wobec nacinanych sekwencji DNA, spowodowała olbrzymie zainteresowanie tymi enzymami. Jednak zainteresowanie to było raczej jednostronne, dążono bowiem do uzyskania aktywnych preparatów enzymatycznych i poznania sekwencji rozpoznawanych przez coraz to nowoodkrywane enzymy restrykcyjne, pomijając dokładniejsze badania struktury i mechanizmu działania tych endonukleaz.

Spośród ponad 100 znanych endonukleaz restrykcyjnych tylko kilka zostało oczyszczonych do stanu homogenności w celu określenia budowy podjednostkowej. Stwierdzono, że endonukleaza EcoRI może występować w komórce w postaci dimerów i tetramerów zbudowanych z identycznych podjednostek o ciężarach cząsteczkowych 29 500 (20, 21). Endonukleaza BstI też występuje jako tetramer i dimer a ciężary cząsteczkowe podjednostek tego enzymu wynoszą 46 000 (22). Endonukleazy EcoRII, HpaI i HpaII są dimerami o ciężarach cząsteczkowych podjednostek odpowiednio 40 000 (23), 29 000 i 41 000 (24). Z kolei endonukleazy BspI, BamHI, PstII, BglII, HhaII są aktywne w formach monomerów o ciężarach cząsteczkowych odpowiednio 35 000, 90 000, 30 000, 32 000 i 24 000 (25—29).

Jak widać z tego krótkiego zestawienia endonukleazy restrykcyjne typu II nie są jednorodne pod względem budowy, niektóre z nich są aktywne w formie monomerycznej, inne w formie dimeru, bądź też w formach dimeru i tetrameru. Ich ciężary cząsteczkowe w formie aktywnej zawierają się w granicach od 24 000 do 184 000, zaś monomerów w granicach 24 000—90 000. Wydaje się jednak, że każda z dotychczas oczyszczonych endonukleaz restrykcyjnych typu II zbudowana jest tylko z jednego rodzaju łańcucha białkowego.

Badania metylaz typu II są o wiele bardziej fragmentaryczne. Dostępne informacje dotyczą jedynie metylaz EcoRI i BspI, o których wiadomo, że są białkami monomerycznymi o ciężarach molekularnych wynoszących odpowiednio 40 000 (23) i 52 000 (25).

III. Charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II

Na podstawie dotychczas zbadanych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II wydaje się, że metylazy i endonukleazy tych systemów są odrębnymi enzymami nie posiadającymi wspólnych podjednostek. Świadczą o tym także wyniki doświadczeń Yoshimori i wsp. (30) dotyczące systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych EcoRI i EcoRII. Autorzy ci, selekcionując mutanty o fenotypie r^- (brak restrykcji) po jednokrotnej mutagenzie wyizolowali jedynie bakterie o fenotypie $r^- m^+$ (brak aktywności endonukleazy przy zachowanej aktywności metylazy). Wnioskowali oni iż mutacje w genie endonukleazy nie powodują upośledzenia metylacji, a mutacje w genie endonukleazy nie powodują upośledzenia restrykcji, gdyż prowadziłyby to w obu przypadkach do powstania klasy mutantów o fenotypie $r^- m^-$ (brak aktywności endonukleazy i metylazy).

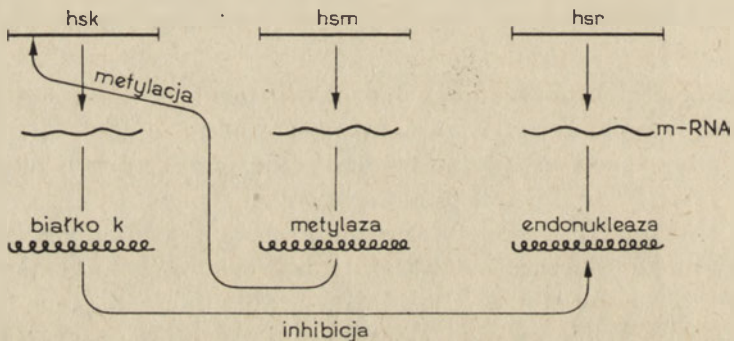
Badając te same systemy restrykcyjno-modyfikacyjne Bannister i Glover (31) uzyskali odmienne wyniki. Wyizolowali oni po jednokrotnej mutagenzie mutanty o fenotypach $r^- m^+$ i $r^- m^-$ w prawie równych ilościach. Podobne wyniki uzyskano badając system restrykcyjno-modyfikacyjny BstI (22).

Z tych ostatnich doświadczeń można wyciągnąć wniosek, że albo połowa mutacji prowadzących do stanu r^- powoduje utratę zdolności modyfikacji albo, że wszystkie mutacje w genie metylazy wywołują utratę zdolności restrykcji. Badania budowy tych enzymów wykluczają możliwość, że endonukleaza i metylaza mają wspólną podjednostkę, co tłumaczyć by mogło dlaczego połowa mutacji prowadzących do stanu r^- powoduje utratę zdolności modyfikacji. Aktywność nukleolityczna homogennych preparatów endonukleazy restrykcyjnej wyklucza także współdziałanie metylazy z endonukleazą w procesie restrykcji, co z kolei tłumaczyć by mogło dlaczego wszystkie mutacje w genie metylazy powodują utratę zdolności restrykcji. Zatem wydaje się, że przyczyna występowania w prawie równych ilościach mutantów $r^- m^+$ i $r^- m^-$ ma związek nie tylko z samymi genami struktury metylazy i endonukleazy. Jeśliby istniał trzeci gen w systemie restrykcyjno-modyfikacyjnym, gen regulatorowy, to wówczas możliwe byłoby uzyskanie pojedynczych mutacji prowadzących zarówno do fenotypu $r^- m^+$ jak i $r^- m^-$.

Rozważmy dwa z możliwych typów regulacji. Gdyby aktywność produktu genu regulatorowego warunkowała ekspresję genów kodujących metylazę i endonukleazę, to mutacje w tym genie prowadziłyby do fenotypu $r^- m^-$ a mutacje w genie endonukleazy do fenotypu $r^- m^+$. Gdyby natomiast rolą genu regulatorowego było blokowanie restrykcji w przypadku braku aktywności metylazy, wówczas mutacje w genie metylazy prowadziłyby do fenotypu $r^- m^-$ a mutacje w genie endonukleazy do fe-

notypu $r^- m^+$. Nowsze badania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II wskazują raczej na ten drugi sposób regulacji.

Badania szczepów *E. coli* zawierających pochodne plazmidu pMB1, noszącego geny systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoRI (32) wykazały, że bakterie niektórych z badanych szczepów zawierają endonukleazę EcoRI w stanie utajonym (33). Nie wykrywa się w nich także aktywności metylazy i stan ten odpowiada fenotypowi $r^- m^-$. Bakterie te nie modyfikują własnego i obcego DNA i nie mają zdolności cięcia niezmodyfikowanego DNA, jednak z ich komórek można wyizolować aktywną endonukleazę EcoRI. Wydaje się, że w komórkach tych szczepów aktywność endonukleazy ulega zahamowaniu i proces ten jest zależny od braku aktywności metylazy. Jeżeli bowiem do komórek tych wprowadza się drugi plazmid zawierający geny endonukleazy i metylazy EcoRI to przejawiają one *in vivo* aktywność endonukleazy EcoRI, co wskazuje, że hipotetyczny inhibitor endonukleazy nie jest już produkowany. Również badania systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego HhaII (29) wykazały uzależnienie przejawiania się restrykcji od obecności metylazy.



Ryc. 1. Hipotetyczny model działania trójgenowego systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego typu II

Na podstawie powyżej przedstawionych danych autor pragnąłby zaproponować hipotetyczny trójgenowy model systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego typu II. W modelu tym powszechnie przyjęte symbole *hsm* (*host specific methylation*) i *hsr* (*host specific restriction*) oznaczają odpowiednio geny strukturalne metylazy modyfikacyjnej i endonukleazy restrykcyjnej. Symbol *hsk* (*host specific krypticity*) wprowadzono dla oznaczenia genu strukturalnego białka k odpowiedzialnego za wprowadzenie endonukleazy restrykcyjnej w stan utajony — kryptyczny w przypadku braku aktywności metylazy. Hipotetyczny mechanizm działania takiego trójgenowego systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego przedstawiono na rycinie 1. Zgodnie z tą hipotezą trzy obserwowane fenotypy tłumaczy się następująco:

Fenotyp $r^+ m^+$ — metylaza metylując specyficzne sekwencje w DNA wprowadza także grupy metylowe do sekwencji genu *hsk*. Metylacja wprowadza na tyle istotne zmiany strukturalne w obszarze promotorowo-operatorowym genu *hsk*, że powoduje brak ekspresji tego genu. (Możliwy wpływ metylacji na strukturę DNA jest omówiony w dalszej części niniejszej pracy, rozdział V-1). Białko *k* nie jest wówczas produkowane i endonukleaza może przejawiać swoją aktywność.

Fenotyp $r^- m^+$ (mutacja w genie *hsr*) — brak aktywnej endonukleazy komórki syntetyzują metylazę, która metyluje właściwe sekwencje tak, jak to opisano wyżej i w związku z tym nie powstaje białko *k*.

Fenotyp $r^- m^-$ (mutacja w genie *hsm* lub obecność innych czynników powodujących brak ekspresji genu metylazy na przykład głodzenie metioninowe) — w komórce nie zachodzi metylacja i w związku z tym gen *hsk* ulega ekspresji. Białko *k* powoduje zahamowanie aktywności endonukleazy, co prowadzi do fenotypu $r^- m^-$ pomimo iż endonukleaza jest syntetyzowana. Powyższy mechanizm ma zapewniać komórce ochronę własnego DNA w przypadku chwilowego lub trwałego braku aktywności metylazy przy zachowanej aktywności genu endonukleazy. Fakt, że infekcja komórki plazmidem wnoszącym nowy system restrykcyjno-modyfikacyjny do komórki biorcy nie prowadzi do degradacji DNA tej komórki może być także tłumaczony przy pomocy przedstawionego modelu. Można sądzić, że plazmid replikujący się zaraz po wnikięciu do komórki nie posiadającej odpowiedniej metylazy traci swoistą metylację, którą posiadał w komórce dawcy. Może to powodować uczynnienie hipotetycznego genu *hsk* i doprowadzać do zahamowania aktywności produkowanej endonukleazy. W tym czasie aktywna metylaza byłaby produkowana normalnie i po podwyższeniu jej stężenia wewnątrz komórki następowałaby pełna metylacja wszystkich specyficznych sekwencji DNA komórkowego i plazmidowego. Ponowne unieczynnienie genu *hsk* na skutek metylacji umożliwiłoby przejawienie się aktywności restrykcyjnej.

W pewnej niezgodności z przedstawioną tu hipotezą pozostają omówione już wyniki prac Yoshimori i wsp., którzy w wyniku jednokrotnej mutagenyzy uzyskiwali mutanty o fenotypie $r^- m^+$ nie uzyskując mutantów $r^- m^-$ (30). Jeżeli jednak wziąć pod uwagę, że wyniki te otrzymano po przeniesieniu plazmidów kodujących badane systemy restrykcyjno-modyfikacyjne do komórek nowych gospodarzy, to jest możliwym, że plazmidy te utraciły hipotetyczny gen *hsk*. Staje się to prawdopodobne, gdyż w czasie przenoszenia plazmidów traciły one geny oporności na antybiotyki (34), a stwierdzono również, że łatwo tracone są w tych plazmidach obszary związane z genami systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego (33). Gdyby w badanej niewielkiej ilości szczepów (34) systemy restrykcyjno-modyfikacyjne nie posiadały aktywnego genu *hsk*, to nieprzejawiające restrykcji jednostopniowe mutanty byłyby jedynie typu

$r^- m^+$. Mutacja w genie metylazy prowadziłaby bowiem do śmierci komórki na skutek braku ochrony własnego DNA przed własnymi enzymami restrykcyjnymi. Brak w plazmidzie aktywnego genu warunkującego aktywność endonukleazy od obecności metylazy nie musi automatycznie powodować restrykcji DNA nowego gospodarza. Jeżeli na przykład wymagane stężenie endonukleazy jest większe od wymaganego stężenia metylazy (endonukleaza występuje jako tetramer bądź dimer, metylaza jako monomer) wówczas przy jednoczesnej syntezie obu czynników wcześniej nastąpi metylacja DNA. Tak właśnie można by tłumaczyć infekcyjność plazmidów pozbawionych genu *hsk*.

Niezgodne z hipotezą autora wydają się również wyniki wykazujące, że w początkowym okresie głodzenia metioninowego następuje samodegradacja około 50% DNA w szczepach bakteryjnych posiadających aktywne systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II (35). Brak metioniny, która jest donorem grup metylowych, uniemożliwia oczywiście proces metylacji czym naraża własne DNA na działanie enzymów restrykcyjnych, jednak brak ten winien również hamować aktywność endonukleaz poprzez działanie produktu genu *hsk*. Możliwe, że w opisanych warunkach doświadczalnych głodzenie metioninowe doprowadziło do zatrzymania biosyntezy białek, uniemożliwiając tym samym syntezę hipotetycznego inhibitora endonukleaz (aktywność różnych metylaz jest niezbędna do biosyntezy białka, brak metioniny zatrzymuje także syntezę białek choćby z tej przyczyny, że synteza każdego polipeptydu zaczyna się od formylometioniny).

Warto ponadto zauważyć, że komórki mają „dużo czasu” na zadziałanie systemu chroniącego DNA przed restrykcją w przypadku nagłego braku aktywności metylazy. Ponieważ metylazy wprowadzają grupy metylowe do obu nici rozpoznawanych sekwencji dopiero po dwóch podziałach jedna cząsteczka nowozreplikowanego DNA staje się wrażliwa na działanie endonukleaz. Jednak zawsze pozostaje druga cząsteczka zawierająca jedną nić zmetylowaną to znaczy posiadająca jedną grupę metylową w każdej rozpoznawanej sekwencji i w ten sposób chronioną przed endonukleazami restrykcyjnymi. Ta cząsteczka zapewnia przeżywanie jednej z potomnych komórek. Ten długi czas umożliwia ekspresję systemów chroniących własne DNA przed restrykcją i stwarza ewolucyjne możliwości powstawania takich systemów.

Są oczywiście możliwe inne sposoby uzależniające przejawienie się restrykcji od aktywności metylaz. Jednym z takich sposobów byłoby uzależnienie ekspresji genu endonukleazy od obecności grup metylowych w rejonie promotorowo-operatorowym tego genu. Jednak sposób ten nie tłumaczy zjawiska kryptyczności endonukleaz (33) a także nie wyjaśnia dlaczego Yoshimori i wsp. (30) wśród jednostopniowych mutantów niezdolnych do restrykcji uzyskali jedynie mutanty o fenotypie $r^- m^+$.

IV. Swoistość rozpoznawania DNA przez enzymy restrykcyjne typu II

Wśród endonukleaz typu II można wyróżnić dwie zasadnicze grupy. Liczne enzymy grupy pierwszej rozpoznają sekwencje palindromiczne lub niemal palindromiczne i tną obie nici DNA w obrębie tych sekwencji. Sekwencjami palindromicznymi nazywa się takie sekwencje zasad, w których nominalnie komplementarne zasady są ułożone wzajemnie symetrycznie względem osi tych sekwencji. Enzymy drugiej grupy rozpoznają sekwencje niepalindromiczne i przecinają dwie nici DNA w stałym, niewielkim oddaleniu od miejsca rozpoznawanego. Pomimo tych różnic w sposobie cięcia, produkty degradacji DNA przez enzymy obu klas układają się w charakterystyczne prążki w czasie rozdziału elektroforetycznego.

Wydaje się, że właściwe systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu II występują jedynie w grupie pierwszej enzymów, w której w wielu przypadkach stwierdzono, że specyficzna metylacja w miejscu rozpoznawanym przez endonukleazy chroni DNA przed ich działaniem. W grupie drugiej nieznanym jest jeszcze naturalny sposób zabezpieczenia DNA przed restrykcją a więc nie można tych enzymów przypisać do odpowiednich systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych. Dlatego też więcej miejsca poświęcono pierwszej grupie nazywanej w tej pracy właściwymi enzymami restrykcyjnymi typu II.

Omawiając swoistość rozpoznawania substratu przez właściwe enzymy restrykcyjne typu II warto zwrócić uwagę na szereg związanych z tym, wzajemnie przenikających się podziałów i klasyfikacji.

Pierwszego podziału dokonano na podstawie długości rozpoznawanych sekwencji. Znane są enzymy rozpoznające jedenasto (36), siedmio, sześć, pięć i czterozasadowe sekwencje (18).

Drugi podział dotyczy sposobu ochrony DNA przed restrykcją i wynika raczej ze specyficzności odpowiednich metylaz modyfikujących. Znane metylazy modyfikują adeninę do N⁶-metyloadeniny, cytozynę do C⁵-metylocytozyny (17) i prawdopodobnie guaninę do N⁷-metyloguaniny (37).

Trzeci podział dotyczy sposobu cięcia w obrębie rozpoznawanej sekwencji. Niektóre endonukleazy restrykcyjne tną obie nici DNA w środku symetrycznej sekwencji dając fragmenty o równych końcach. Inne endonukleazy wprowadzają dwa jednoniciowe cięcia symetrycznie, w pewnym oddaleniu od środka rozpoznawanych sekwencji dając w rezultacie jednoniciowe tak zwane lepkie końce po stronie 5', bądź po stronie 3'.

Czwarty podział opiera się na możliwości rozpoznawania przez dany enzym wyłącznie jednej sekwencji palindromicznej, bądź także sekwencji częściowo palindromicznej. W sekwencjach palindromicznych w każdej z nici DNA wszystkie zasady (oprócz środkowej w sekwencjach o niepa-

rzystej liczbie par zasad i pięciu środkowych zasad w sekwencji GCCNNNNNGGC rozpoznawanej przez BglI (36) symetrycznie ustawione względem osi symetrii danej sekwencji tworzą potencjalną parę zasad Watsona i Cricka. Przykładem sekwencji palindromicznej jest sekwencja GTTAAC rozpoznawana przez endonukleazę EcoRI (18). W sekwencjach prawie palindromicznych dopuszczalne jest wystąpienie w każdej z nici DNA dwóch symetrycznie położonych względem siebie zasad, które nie tworzą potencjalnej pary Watsona i Cricka. Najczęściej występuje tam symetrycznie para Pu-Py (puryno-pirymidyna) lub Py-Pu. Na przykład w sekwencji GTPyPuAC rozpoznawanej przez endonukleazę HindII parami Py-Pu mogą być zarówno potencjalne pary Watsona-Cricka TA, CG, jak i pary TC i CA.

V. Mechanizm działania właściwych endonukleaz restrykcyjnych typu II

Istnieją liczne hipotezy próbujące wyjaśnić swoistość enzymów restrykcyjnych. Prawidłowa hipoteza winna oczywiście być zgodna z dostępnymi wynikami eksperymentalnymi i danymi fizyko-chemicznymi oraz łączyć ze sobą i tłumaczyć takie cechy systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych jak:

- rozpoznawanie tylko palindromicznych lub prawie palindromicznych sekwencji DNA,
- ochroną funkcję metylacji oraz niektórych naturalnych i sztucznych modyfikacji nukleotydów,
- możliwość przecięcia komplementarnych nici DNA w symetrycznie położonych, zwykle oddalonych od siebie punktach.

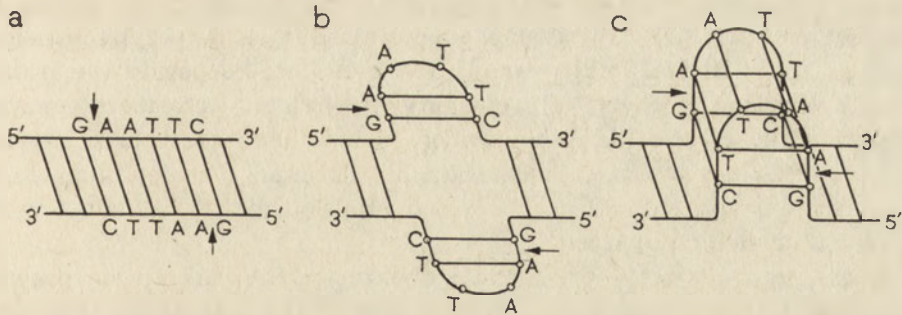
Żadna z opublikowanych dotychczas hipotez nie została jeszcze udowodniona ponieważ nie jest dotąd znana struktura przestrzenna sekwencji DNA rozpoznawanych specyficznie przez endonukleazy restrykcyjne.

V-1. Budowa przestrzenna rozpoznawanych sekwencji DNA

Można przedstawić trzy zasadnicze możliwe konformacje palindromicznej sekwencji DNA. Są to: forma liniowa, forma symetrycznej — podwójnej spinki do włosów i czteroniciowa forma klatkowa (Ryc. 2).

Forma liniowa DNA

Niektórzy badacze uważają, że enzymy restrykcyjne oddziałują z DNA będącym w formie liniowej (38). Rozpoznawanie tylko palindromicznych sekwencji wiąże się z ich symetrycznością umożliwiającą enzymom rozpoznanie właściwej sekwencji DNA niezależnie od tego, która z dwóch nici wyznacza cząsteczce enzymu odpowiednią orientację w momencie rozpoznawania substratowego DNA. Symetria umożliwia także rozpoznawanie właściwych miejsc cięcia w obu, komplementarnych niciach DNA.



Ryc. 2. Schematyczne przedstawienie trzech możliwych konformacji jakie może przyjąć sekwencja GAATC rozpoznawana przez endonukleazę EcoRI, a, struktura liniowa, b, struktura symetrycznej „spinki do włosów”, c, struktura czteroniciowej formy klatkowej. Strzałkami zaznaczono miejsca cięcia dokonywane przez endonukleazę EcoRI

Ochronną rolę metylacji w formie liniowej substratowego DNA tłumaczy się na dwa różne sposoby. Według pierwszej koncepcji oddziaływanie endonukleazy z właściwą sekwencją DNA jest tak specyficzne przestrzennie, że pozornie drobna zmiana, jaką jest metylacja jednej zasady uniemożliwia to oddziaływanie (o koncepcji tej słyszał autor jedynie w czasie dyskusji naukowych). Fakt, że niektóre enzymy restrykcyjne typu II rozpoznają sekwencje nie w pełni palindromiczne, gdzie jako dwie wzajemnie symetryczne zasady mogą występować alternatywnie A i T, G i T lub G i C (17) a także fakt, że niektóre metylacje w obrębie rozpoznawanej sekwencji nie chronią DNA przed restrykcją (39, 40) wydaje się podważać, choć nie wykluczać możliwości tak niezwykle precyzyjnego rozpoznawania zmian w specyficznej sekwencji DNA.

Według drugiej koncepcji (41) metylacja ochrania substratowe DNA przez zmianę jego właściwości fizyko-chemicznych. Wykazano, że obecność N⁶-metyloadeniny w DNA w znacznym stopniu zmniejsza jego stabilność (41). Jest więc możliwym, że oddziaływanie endonukleazy ze zmetylowaną sekwencją prowadzi do przejawienia się zmniejszonej stabilności DNA i doprowadza do lokalnej denaturacji DNA, co z kolei uniemożliwia dokonanie cięcia przez endonukleazę. Jest także możliwe, że zmniejszenie stabilności DNA powoduje zmiany w strukturze rozpoznawanej sekwencji, które uniemożliwiają oddziaływanie endonukleazy z tą sekwencją. Hipoteza ta jednakże może tłumaczyć jedynie ochronną rolę N⁶-metyloadeniny. Wydaje się, że C⁵-metyloazytozyna i N⁷-metyloguani-
na nie zmieniają istotnie stabilności DNA (41).

Endonukleazy restrykcyjne działając na DNA w formie liniowej musiałyby mieć zdolność przecinania obu nici DNA w dwóch dosyć odległych od siebie punktach (lepkie końce mogą mieć długość pięciu nukleotydów). Właściwości takiej nie mają inne endonukleazy. Rozważmy zatem w jaki sposób może zachodzić takie cięcie DNA. Jednoczesne prze-

cinanie obu nici DNA — to znaczy w czasie jednego przyłączenia się enzymu do DNA (jak to prawdopodobnie ma miejsce w przypadku endonukleaz SalI i BamHI) (42) — może być wynikiem kooperatywnego działania dwóch niezależnych centrów aktywnych jednej cząsteczki enzymu lub też efektem współdziałania dwóch niezależnych cząsteczek enzymu. Enzym może też posiadać jedno centrum aktywne o takiej budowie, że jest on zdolny do jednoczesnego przecinania obu nici DNA nawet w oddalonych od siebie punktach.

Niezależne od siebie przecinanie obu nici DNA (jak to się prawdopodobnie dzieje w przypadku endonukleaz EcoRI i HindIII) (42), może być wynikiem tego, że dana cząsteczka enzymu przecina tylko jedną nić DNA w czasie interakcji ze swoistą sekwencją, po czym oddysocjowuje od DNA a do przecięcia drugiej nici wymagane jest ponowne rozpoznanie już raz naciętego DNA przez inną lub nawet tę samą cząsteczkę enzymu (42). Istnieją jednakże dane eksperymentalne wskazujące na inny mechanizm niezależnego przecinania obu nici DNA (43). Dotyczą one także badania mechanizmu działania endonukleazy EcoRI. Wydaje się, że w określonych warunkach endonukleaza EcoRI nie oddysocjowuje od sekwencji rozpoznawanej po dokonaniu pierwszego cięcia i drugie cięcie dokonywane jest po pewnym czasie, ale prawdopodobnie w wyniku tego samego związania się enzymu z miejscem rozpoznawanym w substracie. Nie wiadomo co się dzieje z enzymem w okresie między jednym a drugim cięciem. Być może enzym EcoRI ma dwa miejsca aktywne i to drugie miejsce aktywne może dopasować się do substratu dopiero po pierwszym cięciu sekwencji rozpoznawanej. Możliwe jest też, że enzym ma tylko jedno centrum aktywne i po pierwszym cięciu enzym ulega pewnemu przesunięciu lub takiej zmianie konformacyjnej, aby miejsce to mogło odnaleźć drugi punkt cięcia.

Forma symetrycznej spinki do włosów

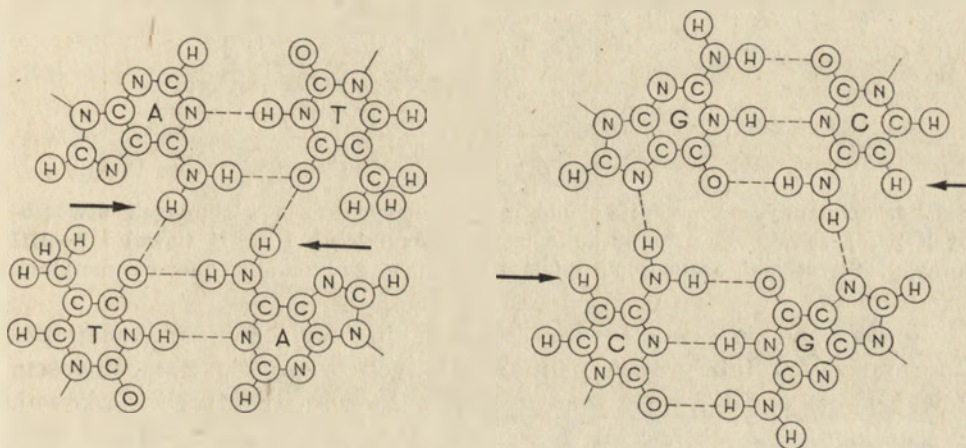
Forma ta (Ryc. 2) została po raz pierwszy zaproponowana przez Gierera (44) jako możliwa struktura przestrzenna palindromicznej sekwencji zasad w DNA. Ze względu na swoją odmienność od struktury podwójnej helisy i specyficzność przestrzenną jest ona bardzo dobrym kandydatem do interakcji z wszelkimi białkami oddziałującymi z palindromicznymi sekwencjami DNA. Jednak występowanie DNA w tej formie nie zostało nigdy zaobserwowane w stanie natywnym (45—47) ani wykazane metodami pośrednimi (48), ponadto rozważania termodynamiczne wydają się wykluczać spontaniczne powstawanie takiej struktury DNA (49). Pozostaje jedynie możliwość powstawania lub utrwalania takiej formy dzięki działaniu specyficznych czynników, być może w wyniku oddziaływania z samą endonukleazą restrykcyjną.

Bardzo istotnym zastrzeżeniem w stosunku do hipotezy spinki do włosów jako struktury sekwencji rozpoznawanej przez endonukleazę restrykcyjną jest występowanie klasy enzymów takich jak AvaI

(CPyCGPuG) czy HaeII (PuGCGCPy) które rozpoznają sekwencje nie w pełni palindromiczne (18). W przypadkach kiedy Py i Pu nie są potencjalnymi komplementarnymi zasadami Watsona i Cricka rozpoznawana sekwencja nie może przyjmować formy regularnej spinki do włosów a w każdym razie jej struktura będzie zupełnie inna od struktury spinki utworzonej wtedy, gdy Py i Pu są zasadami komplementarnymi. To, że endonukleazy *AvaI* i *HaeII* rozpoznają i nacinają specyficzne sekwencje niezależnie od tego czy są one w pełni palindromiczne czy nie (50) wydaje się poddawać w wątpliwość możliwość rozpoznawania przez te enzymy struktury symetrycznej spinki do włosów.

Hipoteza zakładająca występowanie DNA w formie symetrycznej spinki do włosów nie implikuje żadnych innych rozwiązań kwestii ochronnej roli metylacji i cięcia DNA w symetrycznie położonych oddalonych od siebie punktach niż to, co przedstawiono w przypadku formy liniowej rozpoznawanej sekwencji DNA.

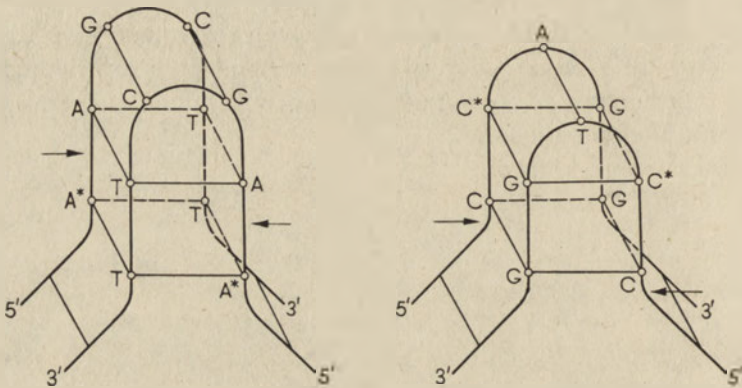
Czteroniciowa forma klatkowa



Ryc. 3. Wzory tetrad tworzonych przez dwie homologiczne pary zasad. Strzałkami zaznaczono potencjalne miejsca metylacji

Teoretycznie istnieje możliwość tworzenia tetrad przez dwie homologiczne pary zasad (51) (Ryc. 3). Wykorzystał to *McGavin* (52) do zaproponowania modelu czteroniciowej struktury DNA. Zgodnie z tym modelem stabilizacja struktury czteroniciowej jest zapewniona przez dodatkowe wiązania wodorowe pomiędzy homologicznymi parami zasad. Ponieważ dodatkowe wiązania wodorowe tworzą się preferencyjnie pomiędzy homologicznymi parami zasad, sekwencje palindromiczne są idealnymi kandydatami do tworzenia takich wewnątrzcząsteczkowych struktur czteroniciowych (53). Zatem i sekwencje palindromiczne rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne mogą występować w formie klatkowej (54, 55). Na podstawie badań przestrzennych modeli atomowych stwier-

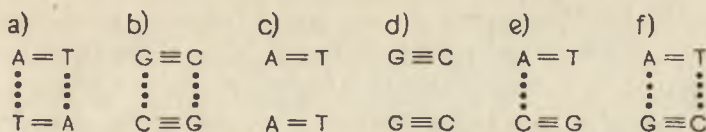
dzono, że łańcuch DNA może być tak zagięty, że nawet palindromy pięcioletni mogą utworzyć dwie tetrazy zasad (56) (Ryc. 4). Czteroniowa struktura klatkowa DNA byłaby strukturą wysoce specyficzną przestrzennie. Jej utworzenie zależałoby od występowania sekwencji palindromicznej lub prawie palindromicznej. Model czteroniowej formy klatkowej DNA tłumaczy ochronną rolę metylacji przed restrykcją, zapewnia możliwość cięcia obu nici DNA w symetrycznie położonych miejscach palindromicznej sekwencji i nie jest sprzeczny z dostępnymi danymi fizyko-chemicznymi (56).



Ryc. 4. Schematyczne przedstawienie czteroniowych form klatkowych utworzonych przez sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy HindIII (lewa) i EcoRII (prawa). Strzałkami zaznaczono miejsca cięcia a gwiazdkami miejsca metylacji

Rozpoznawanie przez enzymy restrykcyjne wyłącznie sekwencji palindromicznych lub prawie palindromicznych wiąże się z możliwością powstawania dodatkowych wiązań wodorowych w strukturze klatkowej. Z sześciu możliwych ułożeń dwóch par zasad (Ryc. 5a-f) jedynie dwa (Ryc. 5a, b) w pełni spełniają wymagania regularnej czteroniowej struktury, to jest tworzą dwa dodatkowe wiązania wodorowe i mają taki sam regularny kształt w płaszczyźnie oddziaływania zasad. Ułożenie f (Ryc. 5f) umożliwia wprowadzenie utworzenie dwóch dodatkowych wiązań wodorowych, ale kształt tak powstałej tetrazy jest zupełnie inny od kształtu tetrad $\begin{smallmatrix} \text{AT} \\ \text{TA} \end{smallmatrix}$ i $\begin{smallmatrix} \text{GC} \\ \text{CG} \end{smallmatrix}$ (Ryc. 3) i zaburza regularność czteroniowej struktury spiralnej. Ułożenie e (Ryc. 5e) umożliwia wprowadzenie tylko jednego dodatkowego, stabilizującego wiązania wodorowego, ale mimo tego kształt tak uzyskanej tetrazy jest regularny i taki sam jak tetrad a i b (Ryc. 5a, b). Sekwencje nie w pełni palindromiczne rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne typu II mogły by właśnie oprócz tetrad typu a i b tworzyć jedną tetradę typu e (Ryc. 5).

Jak widać na rycinie 3 metylacja adeniny i guaniny uniemożliwia tworzenie dodatkowych wiązań wodorowych pomiędzy homologicznymi



Ryc. 5. Schematyczne przedstawienie możliwych ułożeń par zasad. Linia kropkowaną zaznaczono możliwość utworzenia dodatkowego wiązania wodorowego. Schemat ten nie daje wyobrażenia o rzeczywistym kształcie tetrad, można je uzyskać porównując z ryciną 3

parami zasad. Metylacja cytozyny jedynie utrudnia tworzenie takich tetrad. Jeżeli efekt metylacji cytozyny sumowałby się na przykład z efektem naprężenia struktury DNA wywołanym zagięciem sekwencji palindromicznej, wówczas także i metylacja cytozyny mogłaby uniemożliwić tworzenie struktury klatkowej przez odpowiednie sekwencje palindromiczne. Zatem według przedstawionego modelu metylacje DNA w formie klatkowej prowadzą do istotnych zmian, struktury miejsca rozpoznawanego przez endonukleazy. Metylacje mogą zatem skutecznie chronić DNA przed działaniem endonukleaz restrykcyjnych.

Model struktury klatkowej tłumaczy również w jaki sposób DNA jest cięte w symetrycznie położonych miejscach sekwencji palindromicznej. Jak to pokazano na rycinie 4 miejsca cięcia DNA przez endonukleazy restrykcyjne w formie klatkowej leżą na przeciwko sobie i znajdują się na tyle blisko siebie, że mogą być objęte przez jedno centrum aktywne enzymu. Ułatwia to jednoczesne zachodzenie obu cięć tak jak to zaobserwowano w przypadku endonukleaz SalI i BamHI (42).

V-2. Charakterystyka aktywności endonukleolitycznych

Pomiary szybkości reakcji przecinania DNA przeprowadzono jedynie w przypadku kilku enzymów restrykcyjnych typu II. Badając enzymy EcoRI (21, 42, 43), HindIII (42) i HpaII (57) uzyskano wyniki wykazujące istotne różnice pomiędzy szybkościami cięcia pierwszej i drugiej nici w obrębie rozpoznawanej sekwencji. Świadczy to, że w przypadku tych enzymów cięcie obu nici zachodzi niezależnie od siebie i że raczej jest ono wynikiem dwóch niezależnych od siebie oddziaływań enzymu z DNA (42). Jest jednak możliwym, że w fizjologicznych warunkach enzymy te tną obie nici w rozpoznawanej sekwencji w czasie jednego aktu połączenia z DNA (21, 43). Natomiast wykazano, że obie nici DNA są cięte niemal jednocześnie przez endonukleazy SalI i BamHI (42). Te z kolei wyniki wskazują, że przecięcie obu nici jest wynikiem tylko jednej interakcji enzymu z DNA.

Szereg endonukleaz restrykcyjnych typu II wykazuje zdolność cięcia jednoniciowego DNA. Są wśród nich endonukleazy HaeIII, HhaI, HpaII, MboII, HinfI i prawdopodobnie HgaI oraz HphI (58—60). Do cięcia jed-

noniciowego DNA wymagane są znacznie wyższe stężenie enzymów aniżeli do cięcia dwuniciowego DNA co sugeruje, że nie jest to fizjologiczna aktywność tych enzymów, albo że aktywność tę przejawiają cząsteczki enzymów w pewien sposób uszkodzone. Przy założeniu, że niektóre endonukleazy tną jednoniciowy DNA, model spinki do włosów wydaje się najlepiej tłumaczyć możliwość utworzenia przez jednoniciowy DNA struktury rozpoznawanej przez enzym. Jedynie w przypadku tego modelu struktura rozpoznawanej sekwencji będzie miała tę samą formę niezależnie od tego czy DNA będzie dwuniciowy czy jednoniciowy. Jak dotychczas tylko w przypadku endonukleazy HaeIII wykazano, że w jednoniciowym i dwuniciowym DNA enzym rozpoznaje tę samą sekwencję zasad, jednak i w tym przypadku nie stwierdzono na pewno czy enzym działa na fragment jednoniciowy. Przypuszcza się, że tworzone w wyniku częściowej komplementarności dwuniciowe fragmenty w jednoniciowym DNA mogą zawierać specyficzne sekwencje i być cięte tak jak dwuniciowy DNA (18). A więc zachodzenie cięcia w jednoniciowym DNA zależałoby od tworzenia odpowiednich struktur dwuniciowych. Zgodnym z taką interpretacją jest fakt, że jednoniciowy DNA faga λ nie jest cięty przez endonukleazę HaeIII mimo, że dwuniciowy DNA faga λ jest cięty przez ten enzym na przeszło 50 fragmentów (58). Ponieważ jednocześnie wykazano, że jednoniciowy DNA faga Φ X174 jest cięty przez endonukleazę HaeIII (59), a więc można przypuszczać, że w jednoniciowym DNA faga Φ X174 łatwo tworzą się odpowiednie dwuniciowe fragmenty podczas gdy w jednoniciowym DNA faga λ jest to utrudnione z nieznanymi powodów. Za hipotezą lokalnych struktur dwuniciowych przemawiają doświadczenia wykazujące, że utrata zdolności cięcia jednoniciowego DNA przez enzymy HaeIII i HhaI w miarę podnoszenia temperatury inkubacji mieszaniny reakcyjnej przebiega równolegle z termiczną denaturacją struktur dwuniciowych (61). Wykonano doświadczenia wykazujące aktywność endonukleaz restrykcyjnych w stosunku do jednoniciowego DNA w warunkach utrudniających tworzenie odpowiednich struktur dwuniciowych (60) (w jednej cząsteczce DNA znajdowała się tylko jedna specyficzna sekwencja rozpoznawana przez dany enzym, ponadto preparat DNA był bardzo rozcieńczony). Jednakże w przypadku tych doświadczeń nie wykluczono możliwości tworzenia nie w pełni komplementarnych dupleksów na przykład $\begin{matrix} \text{GGCC} \\ \text{CTOC} \end{matrix}$, które mogły by być w tych warunkach (zwiększone stężenie enzymu) rozpoznawane przez endonukleazę.

V-3. Nietypowe zasady w DNA a jego podatność na działanie endonukleaz II typu

Pewne światło na istotę interakcji endonukleaz restrykcyjnych typu II z DNA wydają się rzucać wyniki doświadczeń, w których badano

wpływ występowania nietypowych zasad w DNA na jego podatność na działanie różnych enzymów restrykcyjnych.

Wykazano iż DNA faga T4 zawierający glukozylowaną hydroksymetylocytozynę jest odporny na działanie endonukleazy EcoRI, podczas gdy ten sam DNA zawierający nieglukozylowaną hydroksymetylocytozynę jest wrażliwy na działanie tego enzymu (62, 63). Endonukleazy EcoRII, HindII i HindIII nie działają na żaden z tych typów DNA faga T4 (63). Z kolei DNA zawierający hydroksymetylouracyl w miejsce tyminy jest odporny na działanie endonukleazy HpaI i wrażliwy na EcoRI, HindIII, HpaII chociaż jest cięty wolniej przez te enzymy aniżeli taki sam DNA zawierający tyminę (63).

Z trzech omówionych modeli form przestrzennych DNA oddziałyującego z enzymami restrykcyjnymi tylko hipoteza formy klatkowej jest weryfikowana przez powyższe wyniki, gdyż jedynie ta koncepcja pozwala na przewidywanie ochronnej roli nietypowych zasad. Jeżeli zasady, znajdujące się w sekwencji rozpoznawanej przez endonukleazę nie mogą utworzyć dodatkowych wiązań wodorowych to według hipotezy formy klatkowej DNA, takie sekwencje będą odporne na działanie endonukleaz restrykcyjnych. Glukozylowanie hydroksymetylocytozyny uniemożliwia tworzenie form klatkowych i we wszystkich poznanych przypadkach, w których cytozyna występuje w rozpoznawanej sekwencji, proces ten prowadzi do oporności DNA na działanie restryktaz. Nietypowe zasady, które nie wykluczają możliwości tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych nie muszą chronić DNA przed restrykcją, ale mogą to czynić jeżeli będą zmieniać położenie i rodzaj grup rozpoznawanych przez enzym w danej sekwencji. Mogłoby to tłumaczyć tak różnorodne zachowanie się poszczególnych enzymów restrykcyjnych wobec DNA zawierających hydroksymetylocytozynę bądź hydroksymetylouracyl.

Podobnie do wpływu obecności nietypowych zasad w DNA na jego podatność na działanie endonukleaz restrykcyjnych można rozpatrywać wpływ występowania N⁶-metyloadeniny i C⁵-metylocytozyny w rozpoznawanych sekwencjach.

Metylacja, przez odpowiednie enzymy modyfikacyjne czyni DNA odpornym na działanie odpowiadających tym metylazom endonukleaz restrykcyjnych. Według hipotezy oddziaływania enzymu z formą liniową DNA bądź z formą symetrycznej spinki do włosów enzym rozpoznaje wprost obecność grupy metylowej w danym punkcie sekwencji, bądź też metylacja zmienia w rozpoznawanym rejonie stabilność DNA. Autorzy tych koncepcji nie proponują wyróżnionych pozycji zasad zmetylowanych w sekwencji rozpoznawanej przez enzym. Hipoteza czteroniciowej formy klatkowej przewiduje ochronną rolę grup metylowych jedynie w tych pozycjach, w których prowadziłyby to do destabilizacji formy klatkowej. Na przykład dla ochrony DNA przed restrykcją metylowana

powinna być adenina tworząca dodatkowe wiązania wodorowe w formie klatkowej, uniemożliwiając ich powstawanie. Przykładami takiego ochronnego występowania N⁶-metyloadenin są sekwencje rozpoznawane przez HindII (GTPuPyAC) i HindIII (AAGCTT) (18).

W przypadku położenia N⁶-metyloadeniny w obszarze szczytowym formy klatkowej, w którym zasady nie tworzą dodatkowych wiązań wodorowych (Ryc. 4), mógłby wystąpić również efekt destabilizujący polegający na nacisku grupy metylowej na tetradę podszczytową (56). Nacisk ten mógłby doprowadzić do rozerwania słabej tetrady podszczytowej (tetradą $\begin{smallmatrix} \text{A} & \text{T} \\ \text{T} & \text{A} \end{smallmatrix}$ jest znacznie mniej stabilna od tetrady $\begin{smallmatrix} \text{G} & \text{C} \\ \text{C} & \text{G} \end{smallmatrix}$ f 52, 54, 56) (lub pojedynczej, nie wspomaganej dalszymi tetradami tetrady $\begin{smallmatrix} \text{G} & \text{C} \\ \text{C} & \text{G} \end{smallmatrix}$). Jest możliwe, że na tym właśnie polega ochronny efekt metylacji w przypadku enzymów EcoRI (GAATTC) i DpnII (GATC) (18).

Wydaje się, że jedynym obszarem, w którym obecność N⁶-metyloadeniny nie wpływałaby istotnie na stabilność formy klatkowej jest obszar szczytowy, w którym tetradą podszczytową jest stabilna tetradą $\begin{smallmatrix} \text{G} & \text{C} \\ \text{C} & \text{G} \end{smallmatrix}$ dodatkowo wspomagana drugą tetradą. Doświadczenia, w których sztucznie wprowadzano N⁶-metyladeninę do takich obszarów wykazały, że jej obecność w tych miejscach nie chroni DNA przed działaniem endonukleaz BamI (GGATCC) (39) i BglII (AGATCT) (40).

Bardziej złożonym wydaje się przypadek ochrony DNA przed restrykcją przez metylację cytozyny do C⁵-metylocytozyny. Obecność C⁵-metylocytozyny wydaje się jedynie osłabiać oddziaływanie w obrębie stabilnej tetrady $\begin{smallmatrix} \text{G} & \text{C} \\ \text{C} & \text{G} \end{smallmatrix}$ (56). C⁵-metylocytozyna mogłaby zatem doprowadzić do rozerwania tetrady jedynie wtedy, gdy ów efekt destabilizujący sumowałby się z innym czynnikiem destabilizującym. W przypadku palindromów pięćozasadowych, gdzie zgięcie DNA zachodzić może na odcinku tylko dwóch wiązań fosfodwuestrowych (Ryc. 4) takim czynnikiem destabilizującym mogłoby być naprężenie wiązań wywołane ostrym zgięciem łańcucha DNA. W związku z tym metylacja cytozyny w podszczytowej tetradzie formy klatkowej palindromu pięćozasadowego winna doprowadzić do destabilizacji tej formy. Jak wykazano doświadczalnie właśnie metylacja cytozyny w takiej pozycji sekwencji palindromicznej jest naturalnym sposobem zabezpieczenia DNA przed endonukleazami restrykcyjnymi BbvSI (GC/A/GC) i EcoRII (CC/A/GG).

Innym czynnikiem destabilizującym tetradę $\begin{smallmatrix} \text{G} & \text{C} \\ \text{C} & \text{G} \end{smallmatrix}$ wspomagającym efekt obecności C⁵-metylocytozyny może być naciskanie na nią grup metylowych tymin wchodzących w skład szczytowych par zasad formy klatkowej. To właśnie mogłoby powodować przejawienie się ochronnej roli naturalnej metylacji cytozyny w przypadku endonukleazy BamI (GGATCC) (65).

Metylacja cytozyn w mniej naprężonych tetradach nie powinna pro-

wadzić do ich destabilizacji i nie zabezpieczać DNA przed restrykcją. Doświadczenia, w których sztucznie wprowadzano C⁵-metylocytozynę do takich tetrad w sekwencjach rozpoznawanych przez endonukleazy restrykcyjne wykazały, że C⁵-metylocytozyna w tych przypadkach nie zabezpiecza DNA przed działaniem endonukleaz BamI (GGATCC), HpaII (CCGG) i HaeIII (GGCC) (39).

Grupa metylowa C⁵-metylocytozyny może, podobnie do grupy metylowej N⁶-metyloadeniny, wywierać nacisk na tetradę podszczytową w przypadku gdy C⁵-metylocytozyna wchodzi w skład par szczytowych formy klatkowej (badania na modelach atomowych, (56)). Nacisk ten może doprowadzić do rozerwania tetrady podszczytowej, gdy jest to „słaba” tetradą bądź jedyną tetradą podszczytową. W licznych przypadkach, w których metylacja cytozyny zabezpiecza DNA przed restrykcją C⁵-metylocytozyna występuje w takich właśnie sekwencjach palindromicznych, przykładami są sekwencje rozpoznawane przez enzymy BsuI (GGCC), AvaI (CCCGAC), HaeIII (GGCC), HhaI (GCGC) i HpaII (CCGG) (17, 50, 66).

Zgodność miejsca występowania ochronnej metylacji z miejscem przewidywanym na podstawie hipotezy struktury klatkowej może być jednak jedynie przypadkowa. Nie opisano dotychczas przypadku ochrony specyficznych sekwencji przez dwa różne niezależne sposoby metylacji, chociaż z punktu widzenia hipotezy struktury klatkowej jest to możliwe. Być może przeprowadzono zbyt mało doświadczeń lub też prawdą jest, że dany enzym restrykcyjny rozpoznaje bezpośrednio obecność zasady zmetylowanej tylko w jednym specyficznym miejscu właściwej mu sekwencji zgodnie z hipotezą struktury liniowej DNA oddziałującego z enzymem. Za tą drugą ewentualnością przemawiają doświadczenia z endonukleazami MspI i FnuEI (67, 68). Enzymy te przecinają DNA niezależnie od obecności zmetylowanych zasad w rozpoznawanych sekwencjach (CCGG i GATC) pomimo tego, że metylacje w tych miejscach, zgodnie z hipotezą czteroniciowych struktur klatkowych winny chronić DNA przed restrykcją i rzeczywiście chronią w przypadku innych enzymów restrykcyjnych rozpoznających te same sekwencje (ich izoshizomerów (17)). W przypadku enzymów MspI i FnuEI nie wykazano jeszcze, czy metylacje w innych punktach rozpoznawanych przez nie sekwencji chronią DNA przed ich działaniem, jest więc możliwym, że nie istnieją odpowiadające tym enzymom metylazy a DNA jest chroniony przed tymi enzymami w sposób implikujący inny mechanizm ich interakcji z DNA.

V-4. Inne niż modyfikacja sposoby ochrony DNA przed restrykcją

Inny niż modyfikacja mechanizm chroniący DNA gospodarza przed restrykcją działa przeciw endonukleazie kodowanej przez plazmid

CloDF13 (69). Wydaje się, że enzym ten jest unieczynniany wewnątrz komórki w wyniku tworzenia kompleksu ze specyficznym białkiem. Także omawiane już występowanie tak zwanych endonukleaz utajonych (33, 70), które po wyizolowaniu z komórek mają zdolność cięcia *in vitro*, oczyszczonego DNA wyizolowanego z tych samych komórek wskazuje na inne niż modyfikacja możliwości ochrony DNA.

Zupełnie innym sposobem ochrony DNA przed własnymi enzymami restrykcyjnymi mógł by być brak we własnym DNA specyficznych sekwencji rozpoznawanych przez te enzymy (17). Jednakże w przypadku krótkich sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy (czterozasadowe) rozwiązanie takie ogranicza dobór odpowiednich kodonów aminokwasowych a nawet wyklucza pewne sąsiedztwa aminokwasów w białkach, na przykład brak sekwencji GGCC w DNA prowadzi do braku sekwencji Trp-Pro w kodowanych przez ten DNA białkach. W przypadku dłuższych palindromów unikanie ich nie prowadzioby do tak istotnych ograniczeń w doborze kodonów i aminokwasów, ale nawet wówczas taki sposób ochrony DNA byłby wysoce niekorzystny ewolucyjnie.

V-5. Endonukleazy o obniżonej specyficzności

Ciekawym zjawiskiem mogącym pomóc w wyjaśnieniu sposobu oddziaływania endonukleaz restrykcyjnych typu II z DNA jest obniżenie w pewnych warunkach ścisłej specyficzności rozpoznawania sekwencji przez niektóre enzymy restrykcyjne. W roztworach o niskiej sile jonowej i o podwyższonym pH endonukleaza EcoRI, która normalnie rozpoznaje sekwencję GAATTC rozpoznaje liczne (ale prawdopodobnie nie wszystkie) sekwencje zawierające centralne cztery zasady sekwencji kanonicznej (AATT) (71). Podobne zjawisko zaobserwowano w przypadku endonukleazy BsuRI, rozpoznającej normalnie sekwencję GGCC. W zmienionych warunkach enzym ten rozpoznaje także inne sekwencje, o centralnych dwóch zasadach GC (72, 73). Endonukleazy o tak zmienionych własnościach, oznaczono EcoRI* i BsuRI*. Stosując nadmiar metylazy EcoRI uzyskano metylacje chroniące DNA przed działaniem endonukleazy EcoRI* (74). Chociaż nie ma takich danych odnośnie BsuRI* jest wysoce prawdopodobne, że mechanizm rozpoznawania substratu przez endonukleazy EcoRI* i BsuRI* jest podobny do mechanizmu rozpoznawania przez inne enzymy restrykcyjne typu II w tym sensie, że specyficzna metylacja rozpoznawanych sekwencji DNA chroni je przed restrykcją. Z punktu widzenia hipotezy struktury czteroniciowej, sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy EcoRI* i BsuRI* nie mogą utworzyć struktury klatkowej. Zawada przestrzenna grup metylowych tymin położonych w obsza-

rze szczytowym formy klatkowej uniemożliwia utworzenie słabej pojedynczej tetrady podszczytowej, a dwuzasadowa sekwencja GC nie może tak się wygiąć, aby utworzyć między sobą dodatkowe wiązania wodorowe (56). Także formowanie przez te sekwencje struktury typu symetrycznej spinki do włosów jest niemożliwe w przypadku sekwencji GC i bardzo mało prawdopodobne w przypadku sekwencji AATT (badania modelowe autora).

Wydawać by się mogło, że jedynie hipoteza rozpoznawania struktury liniowej DNA przez endonukleazy może wyjaśnić fakt, że sekwencje AATT i GC są rozpoznawane przez te enzymy. Jednak nowsze prace wprowadzają pewne poprawki do opisu działania EcoRI*. Dokładne zsekwencjonowanie trzech wybranych miejsc wrażliwych na działanie EcoRI* wykazało, że enzym ten rozpoznaje nie sekwencję AATT a raczej sekwencję PuAAPyTPy (75). Sekwencja tego typu ma pewne możliwości utworzenia struktur klatkowych dzięki stabilizującemu wpływowi bazalnej tetrady $\begin{matrix} G & P \\ P & G \end{matrix}$, w której mogłoby powstać przynajmniej jedno dodatkowe wiązanie wodorowe. Być może i sekwencje GC rozpoznawane przez BsuRI* są otoczone zasadami mogącymi tworzyć tetradę.

Nasuwa się pytanie, dlaczego właśnie obniżenie siły jonowej i podwyższenie pH mieszaniny reakcyjnej powodują obniżenie specyficzności tych endonukleaz i, czy zmiana warunków reakcji powoduje zmianę właściwości substratu (DNA), czy też raczej zmianę właściwości enzymu. Ponieważ w przypadku innych enzymów restrykcyjnych nie udało się spowodować utraty wysokiej swoistości ich działania przez zmianę środowiska reakcji (73) wydaje się, że zmiana warunków oddziałuje specyficznie właśnie na enzymy EcoRI* i BsuRI*. Możliwa jest także taka interpretacja, że swoiste warunki oddziałują na DNA zmieniając jego właściwości i tylko endonukleazy EcoRI i BsuRI rozpoznają tak zmieniony DNA. Przy takim założeniu zmiana w DNA powinna polegać na przybieraniu przez inne sekwencje struktury zbliżonej do struktury tworzonej przez sekwencję normalnie rozpoznawaną przez enzym. Wykazano, że optymalne warunki działania EcoRI* i BsuRI* uzyskuje się w środowisku zawierającym 38—58% glikolu etylenowego (73). Są to warunki podobne do warunków tranzykcji ψ (76). Tranzykcja ψ jest stanem DNA, w którym odcinki tej samej cząsteczki DNA mogą sąsiadować ze sobą dzięki zagięciom dwuniciowego DNA (77). Warunki tranzykcji ψ wydają się zatem ułatwiać tworzenie struktur klatkowych. Te tetrady, które w normalnych warunkach by nie powstawały spontanicznie w warunkach tranzykcji ψ mogłyby powstawać i stabilizować formy klatkowe a nawet być mylnie rozpoznawane przez endonukleazy. Fakt, że wiele enzymów nie przejawia obniżonej swoistości w warunkach tranzykcji ψ może być związany z dokładniejszym rozpoznawaniem przez nie specyficznej sekwencji.

V-6. Działanie endonukleaz na syntetyczne oligonukleotydy i wpływ zasad otaczających miejsce rozpoznawane na szybkość cięcia

Chemicznie syntetyzowane samokomplementarne oligonukleotydy zastosowano jako substraty w badaniach rozpoznawania specyficznych sekwencji przez endonukleazy restrykcyjne. Dziesięcio i ośmionukleotydowe dwuniciowe fragmenty DNA utworzone z samokomplementarnych oligonukleotydów zawierających sekwencje rozpoznawane przez endonukleazy EcoRI, BamHI i AluI (78—80) były substratem wymienionych enzymów. Powinowactwo endonukleazy EcoRI do takich substratów było jednak dużo niższe niż do DNA wirusa SV40 (78). Endonukleaza HsuI nie działała na tak krótkie, specyficzne dla niej sekwencje i wymagała znacznie dłuższych odcinków DNA.

Doświadczenia te wykazały, że w procesie rozpoznawania substratu przez enzym istotna jest także interakcja z sekwencjami otaczającymi miejsce rozpoznawane.

Okazało się, że sekwencja zasad otaczających miejsce rozpoznawane ma nawet istotny wpływ na szybkość cięcia DNA w danym miejscu. Na przykład szybkości cięcia przez EcoRI w różnych miejscach DNA faga λ czy DNA — adenowirusa-2 mogą się różnić o rząd wielkości (81, 82). Badania korelacji pomiędzy sekwencją otaczającą miejsce rozpoznawane a szybkością cięcia w danym miejscu mogą być istotne dla rozwiązania problemu struktury przestrzennej miejsc rozpoznawanych przez endonukleazy restrykcyjne.

VI. Nietypowe enzymy restrykcyjne typu II

Pewna grupa enzymów restrykcyjnych mimo, że formalnie zaliczona została do endonukleaz typu II znacznie różni się w swoich właściwościach od pozostałych endonukleaz typu II. Enzymy te rozpoznają specyficzne sekwencje nukleotydów i wykazują specyficzność miejsca cięcia DNA. Wymagają obecności jonów Mg^{2+} , nie wymagają ATP i S-adenozylometioniny i nie mają aktywności ATP-azowej. Łączy je to z pozostałymi endonukleazami typu II (Tabela 1). Odmienność tych enzymów polega na rozpoznawaniu sekwencji niepalindromicznych i cięciu DNA w niewielkim oddaleniu (5—10 par zasad) od specyficznej sekwencji rozpoznawanej (18). Z grupy tej opisano enzym MnlI rozpoznający sekwencję czterozasadową, który tnie DNA w odległości 5—10 par zasad w kierunku 3' od rozpoznawanej sekwencji CCTC na nici zawierającej tę sekwencję i w kierunku 5' na nici komplementarnej. Opisano też cztery enzymy rozpoznające sekwencje pięcioletnicowe, są to endonukleazy HgaI (GACGC) (83), HphI (CGGTGA) (84), MboII (GAAGA) (85) i SfaNI (GACGC) (87), które także tną DNA w niewielkiej, stałej dla danego

enzymu, odległości od miejsca rozpoznawanego.

Miejsca tych cięć nie leżą naprzeciwko siebie co powoduje powstanie produktów o jednoniciowych końcach długości 5 zasad w przypadku działania HgaI i 1 zasady w przypadku HphI i MboII (18).

Odległość około 10 par zasad pomiędzy miejscem rozpoznania a miejscem cięcia sugeruje, że enzymy te przyłączają się do miejsca rozpoznawanego oddziałowując z jedną stroną podwójnej spirali DNA i dokonują cięcia w sąsiadującym obszarze następnego skrętu spirali (18). Jednak fakt, że niektóre z tych enzymów wykazują również aktywność wobec jednoniciowego DNA (61), który nie może tworzyć podwójnej spirali, nie jest zgodny z powyższą hipotezą.

Mechanizm ochrony DNA przed tymi enzymami nie jest jeszcze poznany, jednak już z samych sekwencji rozpoznawanych przez te endonukleazy widać, że nie może to być symetryczna metylacja w obu niciach DNA. Przykłady ochrony DNA przed własnymi enzymami restrykcyjnymi przez metylację niepalindromicznych sekwencji są omówione w następnej części tej pracy (87) poświęconej systemom restrykcyjno-modyfikacyjnym typu I i III.

Zaakceptowano 28.2.1980

PISMIENICTWO

1. Luria S. E., Human M. L., (1952), *J. Bacteriol.*, **64**, 557—569.
2. Bertani G., Weigle J. J., (1953), *J. Bacteriol.*, **65**, 113—121.
3. Luria S. E., (1953), *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **18**, 237—244.
4. Arber W., Dussoix D., (1962), *J. Mol. Biol.*, **5**, 18—36.
5. Arber W., (1965), *Ann. Rev. Microbiol.*, **19**, 365—378.
6. Meselson M., Yuan R., (1968), *Nature*, **217**, 1110—1114.
7. Linn S., Arber W., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **59**, 1300—1306.
8. Boyer H. W., (1971), *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 153—176.
9. Yuan R., Reiser J., (1978), *J. Mol. Biol.*, **122**, 433—445.
10. Kauc L., Piekarowicz A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 417—426.
11. Smith H. O., Nathans D., (1973), *J. Mol. Biol.*, **81**, 419—423.
12. Arber W., Linn S., (1969), *Ann. Rev. Biochem.*, **38**, 467—500.
13. Arber W., (1971), *The Bacteriophage Lambda*, red. Hershey A. D., str. 83—96, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
14. Meselson M., Yuan R., Heywood J., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 447—466.
15. Arber W., (1974), *Prog. Nuc. Acid. Res. Mol. Biol.*, **14**, 1—37.
16. Nathans D., Smith H. O., (1975), *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 273—293.
17. Roberts R. J., (1976), *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **4**, 123—164.
18. Zabeau M., Roberts R. J., (1978), *Mol. Genet.*, **3**, 1—54.
19. Piekarowicz A., (1973), *Postępy Mikrobiologii*, **12**, 299—340.
20. Greene P. J., Betlach M. C., Goodman H. M., Boyer H. W., (1974), *Methods in Molecular Biology*, red. Wickner R. B., t. 7, str. 87—111, Marcel Dekker, New York.
21. Modrich P., Zabel D., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 5866—5874.

22. Catterall J. F., Welker N. E., (1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 1110—1120.
23. Roulland-Dussoix D., Yoshimori R., Greene P., Betlach M., Goodman H. M., Boyer H. W., (1975), *Microbiology — 1974*, red. Schlessinger D., str. 187—206, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
24. Hines J. L., Agarwal K. L., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 294.
25. Koncz C., Kiss A., Venetianer P., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **89**, 523—529.
26. Smith L. A., Chirikjian J. G., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 908.
27. Baksi K., Ruzhizky G., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 486.
28. Lee Y. H., Clanton D., Chirikjian J. G., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 294.
29. Mann M. B., Smith H. O., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 293.
30. Yoshimori R., Roulland-Dussoix D., Boyer H. W., (1972), *J. Bacteriol.*, **112**, 1275—1279.
31. Bannister D., Glover S. W., (1970), *J. Gen. Microbiol.*, **61**, 63—71.
32. Betlach M., Hershfield V., Chow L., Brown W., Goodman H. M., Boyer H. W., (1976), *Fed. Proc.*, **35**, 2037—2043.
33. Miller C. A., Cohen S. N., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1265—1269.
34. Yoshimori R. N., (1971), Ph. D. thesis, University of California, San Francisco.
35. Lark C., Arber W., (1970), *J. Mol. Biol.*, **52**, 337—348.
36. Lautenberger J. A., White C. T., Edgell M. H., Hutchison III C. A., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 293.
37. McConnel D. J., Searcy D. G., Sutcliffe J. G., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 1729—1739.
38. Roberts R. J., informacja ustna.
39. Mann M. B., Smith H. O., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 4211—4221.
40. Pirrotta V., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 1747—1760.
41. Engel J. D., von Hippel P. H., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 927—934.
42. Halford S. E., Johnson N. P., Grinstead J., (1979), *Biochem. J.*, **179**, 353—363.
43. Modrich P. M., Rubin R., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 293.
44. Gierer A., (1966), *Nature*, **212**, 1480—1481.
45. Wilson D. A., Thomas C. A., Jr., (1974), *J. Mol. Biol.*, **84**, 115—138.
46. Bazetoux S., Jouanian L., Huguet T., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 751—769.
47. Cech T. R., Pardue M. L., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2644—2648.
48. Marians K. J., Wu R., (1976), *Nature*, **260**, 360—363.
49. von Heijne G., Blomberg E., (1976), *J. theor. Biol.*, **63**, 347—353.
50. Sutcliffe J. G., Church G. M., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2313—2319.
51. Kubitschek H. E., Henderson T. R., (1966), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 512—519.
52. McGavin S., (1971), *J. Mol. Biol.*, **55**, 293—298.
53. McGavin S., (1972), *Nature*, **242**, 330.
54. Lim V. I., Mazanov A. L., (1976), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **231**, 492—494.
55. Lim V. I., Mazanov A. L., (1978), *FEBS Letters*, **88**, 118—123.
56. Stasiak A., Kłopotowski T., (1979), *J. theor. Biol.*, **80**, 65—82.
57. Ruben G., Spielman P., Tu C. D., Jay E., Siegel B., Wu R., (1977), *Nucleic Acids Res.*, **4**, 1803—1813.
58. Blakesley R. W., Wells R. D., (1975), *Nature* **257**, 421—422.
59. Horiuchi K., Zinder N. D., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2555—2558.

60. Godson G. N., Roberts R. J., (1976), *Virology*, **73**, 561—567.
61. Blakesley R. W., Dodgson J. B., Nes I. F., Wells R. D., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 7300—7306.
62. Li L. I., Tanyashin V. I., Matvienko N. I., Boyev A. A., (1975), *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **223**, 1262—1265.
63. Kaplan D. A., Nierlich D. P., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 2395—2397.
64. Gregg J. M., Stewart C. R., (1978), *Virology*, **85**, 601—605.
65. Hattman S., Keister T., Gottehrer A., (1978), *J. Mol. Biol.*, **124**, 701—711.
66. Bird A. P., (1978), *J. Mol. Biol.*, **119**, 27—47.
67. Walwijk C., Flavell R. A., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3231—3236.
68. Lui A. C. P., McBride B. C., Vovis G. F., Smith M., (1979), *Nucleic Acids Res.*, **6**, 1—15.
69. Veltkamp E., Pols K., van Ee J. H., Nijkamp H. J. J., (1976), *J. Mol. Biol.*, **106**, 75—95.
70. Shibata T., Ikawa S., Kim C., Ando T., (1976), *J. Bacteriol.*, **128**, 473—476.
71. Polisky B., Greene P., Garfin D. E., McCarthy B. J., Goodman H. M., Boyer H. W., (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 3310.
72. Heininger K., Horz W., Zachau H. G., (1977), *Gene*, **1**, 291—303.
73. Mayer H., (1978) *FEBS Letters*, **90**, 341—344.
74. Berker K. L., Folk W. R., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 435—450.
75. Scherer G., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3141—3156.
76. Lerman L. S., (1973), *Physico-chemical Properties of Nucleic Acid*. red. Duchesne J., t. 3, str. 59—76.
77. Cheng S.-M., Mohr S. C., (1975), *Biopolymers*, **14**, 663—674.
78. Greene P. J., Poonian M. S., Nussbaum A. L., Tobias L., Garfin D. E., Boyer H. W., Goodman H. M., (1975), *J. Molec. Biol.*, **99**, 237—261.
79. Bahl C. P., Marians K. J., Wu R., Stawinsky J., Narang S. A., (1976), *Gene*, **1**, 81—92.
80. Scheller R. H., Dickerson R. E., Boyer H. W., Riggs A. D., Itakura K., (1977), *Science*, **196**, 177—180.
81. Thomas M., Davis R. W., (1975), *J. Mol. Biol.*, **91**, 315—328.
82. Forsblom S., Rigler R., Ehrenberg M., Petterson U., Philipson L., (1976), *Nucleic Acids Res.*, **3**, 3255—3269.
83. Brown N. L., Smith M., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3213—3216.
84. Kleid D., Humayun Z., Jeffrey A., Ptashne M., (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 293—297.
85. Gelinis R. E., Myers P. A., Weiss G. H., Roberts R. J., Murray K., (1977), *J. Mol. Biol.*, **114**, 433—440.
86. Gingeras T. R., Milazzo J. P., Roberts R. J., (1978), *Nucleic Acids Res.*, **5**, 4105—4127.
87. Stasiak A., (1980), *Post. Biochem.*, **26**, 369—388.

ANDRZEJ STASIAK *

Enzymy restrykcyjne. II. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I i III

Restriction Enzymes. II. Mechanisms of Action of Type I and III Restriction-Modification Systems.

Spis treści

- I. Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu I
 - I-1. Budowa enzymów restrykcyjnych typu I
 - I-2. Charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I
 - I-3. Swoistość rozpoznawania DNA
 - I-4. Mechanizm działania enzymów restrykcyjnych typu I
- II. Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu III
 - II-1. Budowa enzymów restrykcyjnych typu III i charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych tego typu
 - II-2. Mechanizm działania enzymów restrykcyjnych typu III
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. Type I restriction — modification systems
 - I-1. Structure of type I restriction enzymes
 - I-2. Genetic properties of type I restriction-modification systems
 - I-3. Specificity of DNA recognition
 - I-4. Mechanism of action of type I restriction enzymes
- II. Type III restriction-modification systems
 - II-1. Structure of type III restriction enzymes and genetic properties of type III restriction-modification systems
 - II-2. Mechanism of action of type III restriction enzymes
- III. Concluding remarks

* Mgr Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa.

Wykaz stosowanych skrótów: AdoMet — S-adenozylometionina.

Enzymami restrykcyjnymi nazwano trzy zupełnie odrębne grupy endonukleaz bakteryjnych. Wspólną cechą tych enzymów jest brak działania na DNA pochodzący z komórek tych samych szczepów bakteryjnych, z których wyizolowano dany enzym.

W poprzedniej pracy (1) omówiono enzymy restrykcyjne typu II. Endonukleazy tego typu charakteryzują się ścisłą specyficznością cięcia DNA i z tego powodu stały się podstawowym narzędziem inżynierii genetycznej, a co za tym idzie także przedmiotem intensywnych badań.

Endonukleazy typu I i III pomimo wysokiej specyficzności rozpoznawania DNA dokonują cięcia DNA bez wyraźnej specyficzności. Powoduje to bezużyteczność tych enzymów z punktu widzenia inżynierii genetycznej. Jednakże połączenie specyficzności rozpoznawania z brakiem specyficzności cięcia stało się intrygujące z punktu widzenia enzymologii.

I. Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu I

Systemem restrykcyjno-modyfikacyjnym nazywa się w tej pracy system składający się z wszystkich genów i ich produktów białkowych (enzymów i ewentualnie represorów) mających związek z przejawianiem się specyficznego restrykcji i modyfikacji DNA.

I-1. Budowa enzymów restrykcyjnych typu I

Endonukleazy restrykcyjne typu I różnią się bardzo istotnie od enzymów restrykcyjnych typu II (1). Właściwie jedyne wspólne cechy enzymów tych dwóch typów to wymaganie obecności jonów Mg^{2+} , rozpoznawanie specyficznego sekwencji DNA, jak i to, że w szeregu poznanych przypadków specyficzna metylacja adeniny chroni DNA przed ich działaniem.

Opisano szereg enzymów restrykcyjnych typu I. Występują one między innymi w szczepach *E. coli* K12 u *E. coli* B (2, 3), w szczepach *Salmonella typhimurium* (4), *Haemophilus influenzae* Rd i Rf (5, 6) oraz *Staphylococcus aureus* (7). Uwaga naukowców skupiła się głównie na enzymach wyizolowanych ze szczepów *E. coli* K12 i *E. coli* B i nazwanych odpowiednio EcoK i EcoB. Enzymy te oczyszczono, określono ich ciężary cząsteczkowe oraz wielkości i ilości podjednostek.

Endonukleaza EcoK występuje prawdopodobnie w jednej formie o stałej liczbie podjednostek, jej ciężar cząsteczkowy wynosi około 400 000. Ciężary podjednostek α , β i γ wynoszą odpowiednio 135 000, 62 000 i 52 000 (8). Endonukleaza EcoB o ciężarze cząsteczkowym około 450 000 może występować w kilku formach o różnych ilościach podjednostek α , β i γ ,

których ciężary molekularne wynoszą odpowiednio 135 000, 60 000 i 55 000 (9).

Stwierdzono, że endonukleazy EcoK i EcoB mogą także przejawiać aktywność modyfikacyjnych metylaz, (DNA-metylo-transferaz) a tym samym chronić DNA przed własną aktywnością endonukleolityczną (10—12). Badając enzymy restrykcyjne EcoB udało się wyizolować enzym przejawiający tylko aktywność metylazy. Enzym ten metylaza EcoB (13) występuje w kilku różnych formach o ciężarach od 115 000 do 235 000; poszczególne jej formy zawierają różne ilości podjednostek identycznych z podjednostkami β i γ endonukleazy EcoB. Metylaza EcoK nie udało się dotychczas wyizolować. Przypuszcza się jednak, że zarówno w przypadku endonukleazy EcoK jak EcoB związana z nimi aktywność metylazy jest właściwą metylazą EcoK i EcoB zaś aktywność kompleksu $\beta+\gamma$ jest jedynie artefaktem uzyskiwanym *in vitro*.

I-2. Charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I

Tworzenie przez podjednostki β i γ kompleksu o aktywności metylującej a także występowanie tych podjednostek w cząsteczkach endonukleaz wskazuje, że podjednostki te w enzymach EcoK i EcoB biorą udział zarówno w procesie restrykcji, jak i procesie modyfikacji. Potwierdzają to badania nad jednostopniowymi mutantami r^- (niezdolnymi do restrykcji) w szczepach *E. coli* K12 i *E. coli* B, wśród których stwierdzono występowanie (w mniej więcej równych ilościach) mutantów o fenotypie $r^- m^-$ (niezdolnych do restrykcji i modyfikacji DNA) i o fenotypie $r^- m^+$ (niezdolnych do restrykcji, zdolnych do modyfikacji DNA) (14). Testy komplementacyjne z użyciem jednostopniowych mutantów $r^- m^-$ i dwustopniowych $r^- m^-$ (powstałych przez mutacje w mutantach $r^- m^+$) doprowadziły do przedstawienia koncepcji trójgenowych systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I *E. coli* (15). Według tej koncepcji gen *hss* (*host specific specificity*) koduje polipeptyd podjednostki enzymatycznej odpowiedzialnej za rozpoznawanie specyficznej sekwencji nukleotydów miejsca rozpoznawanego przez endonukleazę i metylazę. Pozostałe dwa geny kodują odpowiednio polipeptyd podjednostki enzymatycznej odpowiedzialnej za cięcie — restrykcję (*hsr*) (*host specific restriction*) i za modyfikację (*hsm*) (*host specific methylation*). Postuluje się, że wszystkie trzy podjednostki niezbędne są dla zapewnienia aktywności restrykcyjnej, a tylko dwie (β i γ) kodowane przez geny *hsm* i *hss* są wymagane do procesu modyfikacji. Tak więc endonukleaza złożona z trzech rodzajów podjednostek jest zdolna do restrykcji i modyfikacji, podczas gdy na przykład metylaza EcoB nie zawierająca podjednostki α jest zdolna tylko do modyfikacji. Mutacje w genach *hss* i *hsm* prowadzą więc do fenotypu $r^- m^-$, a jedynie mutacja w genie *hsr* prowadzi do fenotypu $r^- m^+$.

I-3. Swoistość rozpoznawania DNA

Enzymy EcoK i EcoB są do siebie bardzo podobne — mają podjednostki o zbliżonych ciężarach cząsteczkowych, ich genetyczne wyznaczniki w chromosomach *E. coli* K12 i *E. coli* B są alleliczne i zdolne do wzajemnego zastępowania, to znaczy, że jeżeli na przykład gen *hsr* z *E. coli* K12 zastąpi się genem *hsr* z *E. coli* B to powstanie w pełni aktywny enzym o specyfice EcoK (14, 16—18). Jednakże enzymy te różnią się specyficznością miejsc rozpoznawanych w substratowym DNA. Endonukleaza EcoK działa na DNA *E. coli* B a nie działa na DNA *E. coli* K12; endonukleaza EcoB zaś działa na DNA *E. coli* K12 a nie działa na DNA *E. coli* B.

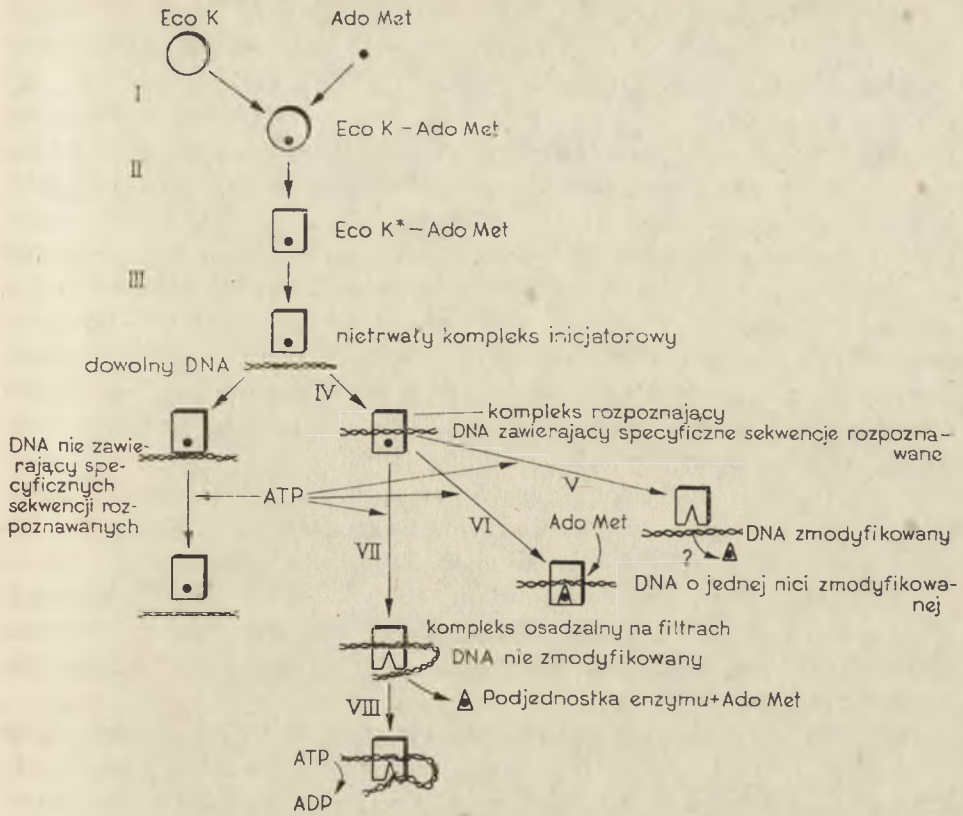
Specyficzna sekwencja rozpoznawana przez endonukleazę EcoB została już poznana (19—20). Jest to sekwencja 15 par zasad TGA(N₈)TGCT składająca się z dwóch fragmentów o stałej sekwencji długości trzech i czterech par zasad rozdzielonych fragmentem o zmiennej, prawdopodobnie dowolnej, sekwencji, długości 8 par zasad. Sekwencja ta nie ma żadnych elementów symetrii a modyfikacja chroniąca DNA przed restrykcją polega na metylacji reszt adenin przyległych do zmiennego fragmentu (adeniny zapisanej w przedstawionej sekwencji i adeniny komplementarnej z tyminą rozpoczynającą drugi stały fragment). Jakikolwiek zamiany zasad w stałych regionach rozpoznawanej sekwencji oraz zwiększenie lub zmniejszenie zmiennego fragmentu ośmiu par zasad o chociażby jedną parę zasad powoduje utratę możliwości rozpoznania tej sekwencji przez endonukleazę EcoB.

Sekwencja rozpoznawana przez EcoK nie została jeszcze opisana, wiadomo tylko, że jest ona podobna do specyficznej sekwencji dla EcoB (21).

I-4. Mechanizm działania enzymów restrykcyjnych typu I

W odróżnieniu od endonukleaz typu II mechanizm działania endonukleaz restrykcyjnych typu I został dosyć dokładnie zbadany. Poznano kolejne etapy reakcji enzymatycznej, udział ATP i AdoMet w tej reakcji, lecz nie wyjaśniono mechanizmu ochronnej roli specyficznej metylacji adeniny.

Najlepiej poznano mechanizm działania endonukleazy EcoK. Niewykluczone, że mechanizm ten jest typowy dla endonukleaz restrykcyjnych typu I. W odpowiednio dobranych warunkach doświadczalnych enzym EcoK może katalizować trzy różne reakcje. Może ciąć niezmodyfikowany DNA w obecności AdoMet, ATP i Mg⁺⁺ (2). Tej reakcji cięcia endonukleolitycznego towarzyszy reakcja hydrolizy wielu cząsteczek ATP, która trwa jeszcze długo po zajściu cięcia (22). EcoK może także działać jako DNA-metyltransferaza i modyfikować sekwencje rozpoznawane w niezmetylowanym DNA lub w DNA o jednej nici zmetylowanej (10). Wszyst-



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie kolejnych etapów reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzym EcoK

kie te reakcje mają wiele kolejnych wspólnych etapów, które zachodzą podobnie dla reakcji endonekcleazy EcoK (23) jak i EcoB (24). Etapy te dla łatwiejszego zrozumienia rozdzielono i ponumerowano (Ryc. 1).

W pierwszym, szybkim etapie wspólnym dla wszystkich trzech wymienionych reakcji, endonukleaza EcoK łączy się z AdoMet, co powoduje powolne przejście enzymu w formę zaktywowaną EcoK-AdoMet. To powolne przejście stanowi etap drugi reakcji. W etapie trzecim zaktywowana forma enzymu EcoK-AdoMet tworzy z dowolnym rodzajem DNA nietrwały kompleks (zwany inicjatorowym). Jeżeli DNA zawiera sekwencje specyficznie rozpoznawane przez endonukleazę EcoK wówczas enzym tworzy z takim DNA trwały kompleks rozpoznający, jest to etap czwarty reakcji. W zależności od tego, w jakiej formie jest specyficzna sekwencja DNA, z którą enzym utworzył kompleks rozpoznający różne są dalsze etapy tej reakcji. Jeżeli specyficzna sekwencja jest w pełni zmetylowana to enzym nie przejawia aktywności endonukleazy, ATP-azy i metylazy a jedynie przy udziale ATP odłącza się od DNA (etap piąty reakcji). Jeżeli specyficzna sekwencja ma zmodyfikowaną jedną nić

wówczas DNA nie ulega restrykcji (nie jest cięte) (2) tylko jest bardzo dobrym substratem w reakcji metylacji (25). Metylacja ta (etap szósty reakcji) jest stymulowana allosterycznie przez ATP. Nie wiadomo, czy AdoMet związana z enzymem służy jako donor grup metylowych w tej reakcji, czy też rolę tę pełnią dodatkowe ilości AdoMet. Jeżeli specyficzna sekwencja nie jest zmodyfikowana wówczas kompleks rozpoznający przy udziale ATP przechodzi w nowy rodzaj kompleksu (etap siódmy), kompleks ten różni się tym od poprzednich kompleksów, że można go osadzić na sączkach nitrocelulozowych. Dopiero powstanie tego kompleksu pozwala na zajęcie etapu ósmego, tj. cięcia endonukleolitycznego powiązanego z hydrolizą znacznych ilości ATP, zakończonego przejściem enzymu w stan niezdolny do dalszej katalizy. Enzym w trwałym kompleksie rozpoznającym może też przeprowadzić metylację rozpoznawanej sekwencji w warunkach braku ATP i Mg^{2+} (10).

Te kolejne etapy reakcji można przyporządkować czterem zasadniczym fazom reakcji: aktywności enzymu, rozpoznawania DNA, zmian indukowanych przez ATP i katalizy enzymatycznej *sensu stricto*.

O ile faza aktywności enzymu nie sprawia kłopotów interpretacyjnych, jest to bowiem typowa reakcja wiązania allosterycznego efektora, jakim w tym przypadku jest AdoMet, z białkiem enzymatycznym, o tyle następne fazy przedstawiają wiele niewiadomych.

W fazie rozpoznawania DNA występują dwa rodzaje kompleksów enzymu z DNA. Pierwszy, nietrwały kompleks inicjatorowy, odpowiada wstępnemu rozpoznaniu substratu przez enzym. W fazie tej enzym prawdopodobnie łączy się z DNA w sposób umożliwiający przesuwanie się enzymu wzdłuż cząsteczki DNA. Jeżeli w czasie tego domniemanego przesuwania enzym natrafia na specyficzną sekwencję nukleotydów, następuje jego zatrzymanie w tym miejscu i konwersja w formę trwałego kompleksu rozpoznającego. Tworzenie obu tych kompleksów można śledzić w sposób bezpośredni techniką mikroskopii elektronowej (23). Zdjęcia mikroskopowe wykazują, że w przypadku reakcji enzymu z DNA nie zawierającym sekwencji rozpoznawanych przez enzym miejsca kontaktu enzymu z DNA są przypadkowe. Jeżeli DNA zawiera sekwencje rozpoznawane w formie niezmetylowanej, o jednej nici zmetylowanej, czy też w pełni zmetylowanej, miejsca kontaktu enzymu z DNA nie są przypadkowe i prawdopodobnie pokrywają się z pozycją rozpoznawanej sekwencji. Wykazano (23), że powstawanie kompleksu rozpoznającego nie zależy od tego czy rozpoznawana sekwencja jest zmetylowana czy nie, a więc prawdopodobnie w fazie rozpoznawania DNA nie przejawia się jeszcze ochronna rola specyficznej metylacji.

Kolejną fazą reakcji jest faza zmian indukowanych przez ATP. Faza ta przebiega różnie w zależności od tego z jaką formą specyficznej sekwencji rozpoznawanej utworzony został kompleks rozpoznający, a także przebiega inaczej w przypadku kompleksu inicjatorowego, który nie prze-

szedł w formę kompleksu rozpoznającego. ATP oddziałując z takim właśnie kompleksem inicjatorowym powoduje odłączenie enzymu od cząsteczki DNA. ATP oddziałując z kompleksem rozpoznającym, utworzonym z enzymu i całkowicie zmodyfikowanej specyficznej sekwencji DNA, również powoduje odłączenie enzymu od cząsteczki DNA, jednak jest to jakościowo inna reakcja. W tym ostatnim przypadku dochodzi do dysocjacji o wiele bardziej stabilnego kompleksu niż kompleks inicjatorowy. Prawdopodobnie w reakcji tej również AdoMet uwalnia się z kompleksu z białkiem, ale nie zostało to jeszcze bezspornie stwierdzone.

ATP stymuluje enzym w kompleksie rozpoznającym utworzonym z DNA o jednej nici specyficznie zmetylowanej do pełnej metylacji rozpoznawanej sekwencji. Stymulacja przez ATP dotyczy jedynie metylacji sekwencji DNA zawierających już jedną nić zmetylowaną, podczas gdy metylacja sekwencji DNA o obu niciach nie zmodyfikowanych zachodzi wyłącznie przy braku ATP.

Najbardziej złożona i chyba najbardziej interesująca z punktu widzenia enzymologii jest zmiana indukowana przez ATP w kompleksie rozpoznającym utworzonym z właściwą sekwencją niezmetylowaną. Kompleks taki pod wpływem ATP przechodzi w nowy rodzaj kompleksu, o nowych własnościach fizyko-chemicznych, które sprawiają, że dobrze osadza się on na sączkach nitrocelulozowych. Temu przejściu towarzyszy odłączenie AdoMet od kompleksu rozpoznającego i zmniejszenie cząsteczki enzymu związanej ze specyficzną sekwencją DNA. Procesy te śledzono używając znakowanej AdoMet i techniki mikroskopii elektronowej (23). Metody te nie pozwalają jednak na stwierdzenie czy obserwowane zmniejszenie cząsteczki enzymu związanego z DNA jest skutkiem zmiany konformacyjnej czy też oddysocjowania podjednostki lub podjednostek enzymatycznych. Nie wiadomo także, czy podczas omawianego procesu odłącza się wolna AdoMet, czy też związana z jakąś podjednostką enzymatyczną. Obserwacja, że DNA dodatkowo dodany wraz z ATP do uprzednio utworzonych kompleksów rozpoznających, osiada na filtrach sugeruje, że odpowiedzialne za osadzanie się kompleksu na sączkach są ujawniające się w enzymie nowe miejsca wiążące DNA. Enzym z dwoma miejscami wiążącymi DNA może tworzyć struktury sieciowe DNA dobrze osadzalne na sączkach. To, że DNA dodany do kompleksów rozpoznających później niż ATP nie jest już osadzany na sączkach wskazuje, że prawdopodobnie nowo ujawniające się miejsca wiązania DNA ulegają szybkiemu wysyceniu przez DNA obecny w kompleksie rozpoznającym.

ATP w fazie zmian przezeń indukowanych spełnia rolę allosterycznego efektora. W żadnej z powyższych reakcji ATP nie ulega hydrolizie, co wykazano zastępując ATP nieulegającym hydrolizie enzymatycznej analogiem (23). Użycie tego analogu nie wpływa ujemnie na tworzenie kompleksów osadzalnych na sączkach i towarzyszącym temu wizualnemu zmniejszeniu cząstki enzymu oraz uwalnianiu AdoMet z kompleksu.

Wydaje się, że właśnie w fazie zmian indukowanych przez ATP przejawia się ochronna rola metylacji DNA. Jak to już raz podkreślono powstawanie kompleksów rozpoznających nie wydaje się zależne od stanu miejsca rozpoznawanego, w związku z tym kompleksy rozpoznające utworzone z sekwencjami niemetylowanymi, częściowo zmetylowanymi i całkowicie zmetylowanymi nie powinny różnić się między sobą. Konsekwencją braku tych różnic winno być jednakowe oddziaływanie ATP z poszczególnymi rodzajami kompleksów rozpoznających.

Wydaje się, że rzeczywiście ATP oddziałując z różnymi kompleksami rozpoznającymi powoduje w nich jednakowe zmiany. Zmiana ta polega na odłączeniu AdoMet lub podjednostki enzymatycznej związanej z AdoMet od kompleksu rozpoznającego. Odłączenie to prawdopodobnie odsłania w kompleksie nowe miejsce wiążące DNA. Można sądzić, że w przypadku, gdy kompleks jest utworzony z całkowicie lub częściowo zmetylowaną specyficzną sekwencją owe domniemane odsłonięte miejsce nie wiąże DNA i kompleks ten nie mogąc przejść w formę osadzalną na sączkach odłącza się od DNA. W przypadku, gdy kompleks jest utworzony z niemetylowaną sekwencją, odsłonięte miejsce może wiązać się z innymi segmentami DNA i kompleks przechodzi w formę osadzalną na filtrach. Dlaczego odsłonięte miejsce może raz wiązać DNA a innym razem nie jest do tego zdolne nie wiadomo. Tym niemniej fakt, że znaczenie metylacji ujawnia się dopiero po utworzeniu kompleksu rozpoznającego pozwala przypuszczać, że to nie enzym rozpoznaje obecność grup metylowych w DNA lecz, że brak grup metylowych bezpośrednio warunkuje wiązanie się DNA z drugim miejscem wiążącym enzymu. Jesliby przyjąć, że owe, ciągle jeszcze domniemane, odsłaniane miejsca wiązania DNA znajdują się naprzeciwko stałych miejsc wiązania DNA (po drugiej stronie wnęki centrum aktywnego), to można sądzić że nowo wiązane DNA będzie oddziaływać z sekwencją rozpoznawaną. Jeżeli stałe miejsca wiążące DNA oddziaływałyby z małymi rowkami DNA wówczas grupy metylowe N⁶-metyloadenin sięgając w głąb wnęki centrum aktywnego mogłyby uniemożliwiać wejście nowego segmentu DNA do tego centrum.

W przypadku, utworzenia kompleksu rozpoznającego z częściowo zmetylowaną sekwencją odsłonięte miejsce mogłoby być blokowane przez jedną grupę metylową N⁶-metyloadeniny i kompleks nie przechodziłby w formę osadzalną na filtrach. Z kolei uwalniana AdoMet lub podjednostka z nią związana mogłaby wziąć udział w metylacji nie zmodyfikowanej adeniny.

Faza katalizy — restrykcji *sensu stricto* zachodzi tylko w kompleksie osadzalnym na filtrach. Enzym w tym kompleksie hydrolizując duże ilości ATP dokonuje endonukleolitycznego przecięcia tylko jednej nici a następnie DNA uwalnia około 75—150 nukleotydów z tej przeciętej nici DNA (26, 27). Przecięcia drugiej nici dokonuje najprawdopodobniej

inna cząsteczka enzymu rozpoznająca tak powstały region jednoniciowy (27). Cięcia endonukleolityczne i miejsce hydrolizy DNA występuje najczęściej w odległości od 1000 do 5000 par zasad od miejsca rozpoznawanego. Stwierdzono, że w tej fazie reakcji już nie można zastąpić ATP analogiem nie ulegającym hydrolizie. Prawdopodobnie hydroliza znacznych ilości ATP nie tylko towarzyszy aktywności endo i egzonukleolitycznej, ale jest jej niezbędnym warunkiem (23). Okazało się, że nawet przy bardzo odległym miejscu cięcia od miejsca rozpoznawanego enzym w dalszym ciągu pozostaje związany ze swoją specyficzną sekwencją. Dokładne badania z użyciem techniki mikroskopii elektronowej (26, 27) wykazały, że enzym pozostając związany ze swoją specyficzną sekwencją, tworzy pętlę DNA. Pętle te powiększają się w miarę upływu czasu tak, jakby w drugim miejscu wiążącym DNA następowało przesuwanie DNA w kierunku 5' od rozpoznawanej sekwencji TGA(N)₈TGCT. Przesuwanie takie zachodzi aż do momentu cięcia DNA przez enzym, który i potem pozostając związany z DNA jest zdolny do dalszej hydrolizy ATP (26, 27).

Nie wiadomo, co decyduje o pozycji cięcia w pewnych niespecyficznym miejscach DNA i dlaczego cięcie może zajść dopiero po przesunięciu DNA o przeszło 1000 par zasad (27). Być może rozpoznawane są miejsca o mało specyficznym sekwencji, która umożliwia ale nie wymusza cięcia DNA. Jest też możliwe, że cięcie zachodzi na skutek pewnych zmian zachodzących w enzymie i nie jest związane z sekwencją DNA.

Na podstawie doświadczeń ze szczepami *E. coli* K12 niosącymi różne mutacje w genach systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego ustalono rolę poszczególnych podjednostek w kolejnych etapach procesu restrykcji (28—29). Szczególnie owocną metodą w tych badaniach okazała się komplementacja *in vitro* pomiędzy defektywnymi enzymami różnych mutantów (30—31). Ustalono, że podjednostka kodowana przez gen *hsm* odpowiedzialna jest między innymi za wiązanie się z AdoMet. W związku z tym enzymy zawierające defektywne podjednostki β nie są w stanie przyłączyć AdoMet i ulegać aktywacji, a co za tym idzie nie są zdolne do żadnej reakcji enzymatycznej. Enzymy zawierające zmienione podjednostki γ kodowane przez zmutowany gen *hss* wiążą się normalnie z AdoMet jednak nie są w stanie utworzyć kompleksu inicjatorowanego z DNA. Z kolei defekt w podjednostce α kodowanej przez gen *hsr* powoduje stosunkowo najmniejsze upośledzenie enzymu. Enzymy zawierające zmienione podjednostki α przyłączają normalnie AdoMet, ulegają aktywacji do formy EcoK-AdoMet, tworzą kompleks inicjatorowy z DNA, który ze specyficzną sekwencją tworzy kompleks rozpoznający będący jednak mniej trwałym niż kompleks utworzony przez EcoK podchodzący z dzikiego typu *E. coli* K12. Kompleks ten pod wpływem ATP ulega pewnej stabilizacji, ale nie przechodzi w formę kompleksu osadzalnego na sączkach. Enzymy takie nie są zdolne do cięcia DNA a jedynie do modyfi-

kacji rozpoznawanej sekwencji. Warto zwrócić uwagę, że systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu I posiadają podwójne zabezpieczenie przed restrykcją własnego DNA na wypadek braku aktywności metylazy. Jeżeli brak AdoMet jest powodem niepełnej metylacji DNA, to i enzym restrykcyjny z tego samego powodu nie ulega aktywacji. Jeżeli mutacja w podjednostce β odpowiedzialnej za metylację, powoduje zahamowanie metylacji, wówczas jest hamowany również proces restrykcji, gdyż aktywność tej podjednostki jest konieczna także do procesu restrykcji.

II. Systemy restrykcyjno-modyfikacyjne typu III

Typ III enzymów restrykcyjnych wyróżniono niedawno (32—33) i dotychczas opisano jedynie trzy enzymy zaliczane do tego typu. Są to enzymy kodowane przez geny bakteriofaga *E. coli* o nazwie P1 (34), przez geny plazmidu *E. coli* o nazwie P15 (35) i przez geny chromosomalne szczepu *Haemophilus influenzae* Rf (33). Te trzy enzymy nazwane odpowiednio EcoP1, EcoP15 i HinfIII zbudowane są z co najmniej z dwóch różnych podjednostek, wymagają obecności ATP i Mg^{2+} do przejawienia aktywności endonukleolitycznej i mogą metylować niezmodyfikowany DNA. Powyższe cechy zbliżają je do enzymów typu I. Jednakże tną one DNA w specyficznych miejscach, wskutek czego produkty degradacji DNA układają się w specyficzne prążki w czasie rozdziału elektroforetycznego, nie wymagają AdoMet do przejawienia aktywności endonukleolitycznej i nie hydrolizują znacznych ilości ATP po dokonaniu cięcia. Z kolei te cechy zbliżają je do enzymów typu II. Enzymy zaliczone do typu III nie stanowią jedynie grupy pośredniej między enzymami typu I i II i przejawiają także właściwości specyficzne tylko dla swego typu. Najbardziej istotną z tych właściwości i rzutującą w istotny sposób na mechanizm działania i uzyskiwane produkty cięcia DNA jest fakt, że w tych samych warunkach mogą one ciąć, jak i metylować niezmodyfikowany DNA.

II-1. Budowa enzymów restrykcyjnych typu III i charakterystyka genetyczna systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych tego typu

Budowa enzymów typu III nie została jeszcze dobrze poznana, nie znana jest także funkcja poszczególnych podjednostek i niewiele wiadomo o genach je kodujących.

Opisano jedynie budowę enzymu HinfIII (33). Enzym ten o masie cząsteczkowej nieco większej niż 200 000 składa się z trzech różnych podjednostek o ciężarach molekularnych 110 000, 80 000 i 45 000. Jednak w niektórych preparatykach uzyskano aktywny nukleolitycznie enzym

składający się tylko z dwóch podjednostek (110 000 i 80 000). Badania jednostopniowych mutantów systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego HinfIII (35), w których uzyskano mutanty o fenotypach $r^- m^-$ i $r^- m^+$ są zgodne zarówno z modelem trój jak i dwugenowym. Oczyszczającym enzymem EcoP1 (33) wykazano, że aktywna endonukleaza zawierać może jedynie dwie podjednostki (100 000 i 80 000), co pozwala przypuszczać, że albo enzymy typu III składają się z dwóch podjednostek, albo też dwie podjednostki z trzech wystarczają do zapewnienia enzymowi aktywności endonukleolitycznej, a trzecia podjednostka mogąca oddysocjować od reszty enzymu wymagana jest jedynie do procesu metylacji DNA. Ta druga ewentualność znalazła potwierdzenie w badaniach mutantów $r^+ m^-$ systemu restrykcyjno-modyfikacyjnego EcoP1 (37). W badaniach tych wykazano, że istnieją dwie komplementujące grupy mutantów $r^+ m^-$, a więc, że modyfikacja w tym systemie zależy co najmniej od dwóch podjednostek enzymatycznych. Mutacje w genach tych podjednostek nie naruszają funkcji restrykcji a więc prawdopodobnie badany enzym składa się z trzech podjednostek kodowanych przez geny nazwane odpowiednio *hsr*, *hsm₁* i *hsm₂*. Jeżeli co najmniej jedna z podjednostek kodowanych przez geny *hsm* współdziała w czasie restrykcji z podjednostką kodowaną przez gen *hsr*, to niektóre mutacje w tej podjednostce prowadzić będą do fenotypu $r^- m^-$, a podjednostka ta była by częściowo analogiczna do podjednostki kodowanej przez gen *hss* w systemach restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I (15).

Budowy podjednostkowej enzymu EcoP15 dotychczas nie opisano, wydaje się jednak, że enzym ten ma podobną budowę do budowy enzymu EcoP1, gdyż także zawiera dwa miejsca wiążące AdoMet i trzy miejsca wiążące ATP (31).

II-2. Mechanizm działania enzymów restrykcyjnych typu III

Bardzo niewiele wiadomo na temat mechanizmu działania enzymów typu III. Spośród specyficznych sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazy typu III opisano jedynie sekwencję metylowaną przez EcoP1 (38), jest to sekwencja AGACPy, gdzie Py może być cytozyną lub tyminą. N⁶-metyloadenina, zasada warunkująca oporność DNA na restrykcję, występuje tylko w jednej nici rozpoznawanej sekwencji. W czasie replikacji DNA powstają zatem potomne cząsteczki DNA zawierające rozpoznawane przez endonukleazy sekwencje w formie niezmodyfikowanej (nie zawierające ani jednej zasady zmetylowanej). W przypadku znanych enzymów typu I i II odpowiadająca im metylacja polega zawsze na metylacji obu nici w obrębie rozpoznawanej sekwencji. W związku z tym po replikacji DNA obie potomne cząsteczki mają połowicznie zmetylowane odpowiednie sekwencje co zabezpiecza DNA przed restrykcją. Nie wiado-

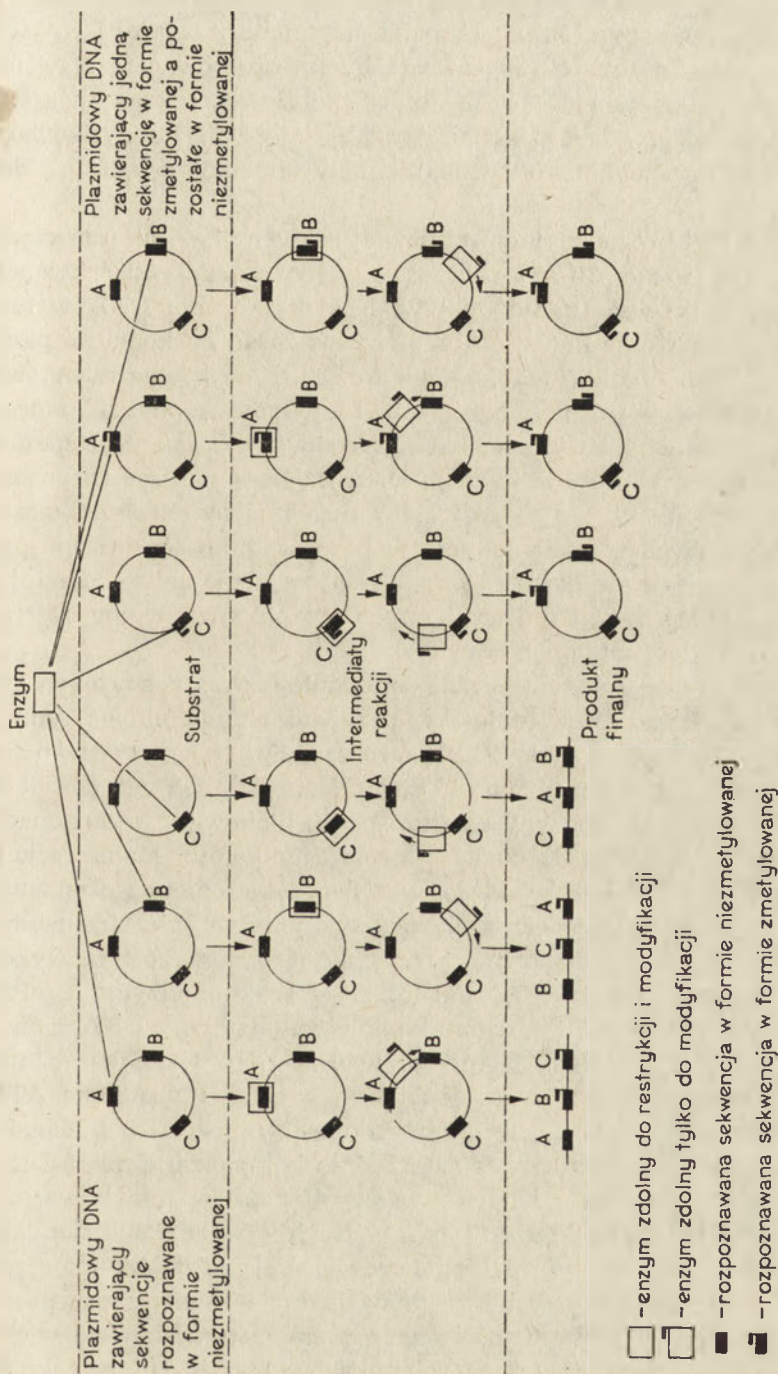
mo w jaki sposób powstające po replikacji DNA niezmodyfikowane sekwencje, rozpoznawane przez endonukleazę EcoP1, są chronione przed restrykcją a jedynie ulegają modyfikacji.

Można sobie wyobrazić, że posuwający się zaraz za widełkami replikacyjnymi enzym restrykcyjny typu III ma w tych specyficznych warunkach jedynie zdolność modyfikacji. Jednak fakt, że sztucznie uzyskane heterodupleksy faga λ o jednej nici z faga zmodyfikowanego i o jednej nici z faga niezmodyfikowanego, posiadające w związku z tym szereg miejsc niezmodyfikowanych były niewrażliwe na działanie EcoP1 (38), chociaż nie były to cząsteczki w stadium replikacji, raczej wyklucza powyższą hipotezę. Wydaje się zatem, że w danej cząsteczce DNA nie wszystkie specyficzne sekwencje muszą być zmodyfikowane, aby ochronić ją przed restrykcją. Być może kilka albo nawet jedno miejsce zmodyfikowane chroni przed restrykcją cały segment DNA zawierający kilka niezmodyfikowanych sekwencji rozpoznawanych.

Nie wiadomo jeszcze w jaki sposób obecność kilku miejsc właściwie zmodyfikowanych chroni DNA zawierający także sekwencje niezmodyfikowane. Częściowo wyjaśniają ten problem wyniki doświadczeń, w których wykazano, że enzym EcoP1 działając na niezmodyfikowany DNA wirusa SV40 wprowadza tylko jedno cięcie endonukleolityczne w jednym z pięciu możliwych miejsc, zaś pozostałe cztery ulegają metylacji (39). Cięcie to zajść może w każdym z miejsc rozpoznawanych, ale tylko w jednym w danej cząsteczce DNA (Ryc. 2).

Wydaje mi się możliwym, że dana cząsteczka enzymu, rozpoznając jedną ze specyficznych sekwencji DNA, działa jako endonukleaza, która po dokonaniu pierwszego cięcia traci aktywność endonukleazy i potem działa tylko jako DNA-metylotransferaza metylując sąsiednie sekwencje. Wykazano, że w odróżnieniu od enzymów typu I, które po dokonaniu cięcia przechodzą w kompleks niezdolny do dalszej katalizy enzymy typu III są enzymami wieloobrotowymi (40). Jeżeli dokonanie cięcia nie powodowałoby natychmiastowego odłączenia enzymu od DNA, wówczas enzym mógłby oddziaływać na sąsiednie sekwencje. Jeśliby enzym EcoP1 wykazywał większe powinowactwo wobec sekwencji zmetylowanych niż niezmetrylowanych, to można by wytłumaczyć w jaki sposób jedna sekwencja zmetylowana chroni sąsiednie niezmetrylowane sekwencje. Otóż w przypadku gdy DNA zawiera sekwencje zmetylowane i niezmetrylowane enzym oddziałuje jedynie z sekwencjami zmetylowanymi. Oddziaływanie enzymu z sekwencją zmetylowaną mogłoby wywoływać takie zmiany w enzymie, że nie byłby on zdolny do dalszej restrykcji lecz tylko do metylacji, zatem przesuwając się następnie po DNA enzym metylowałby po kolei sąsiednie sekwencje DNA (Ryc. 2).

Przedstawiona tu hipoteza autora jest nie tylko próbą wyjaśnienia w jaki sposób sekwencje niezmetrylowane mogą być chronione przed re-



Ryc. 2. Model interakcji enzymów restrykcyjnych typu III z DNA wyjaśniający działanie plazmidowy DNA zawierający szereg niezmodyfikowanych sekwencji jest cięty tylko w jednym miejscu i dlatego obecność jednego miejsca zmetylowanego chroni całą cząsteczkę DNA przed restrykcją

strykcją, ale także próbą oderwania się od dotychczas przyjętych schematów działania enzymów, próbą otwierającą drogę do innych hipotez.

Pewnym potwierdzeniem powyższej hipotezy jest fakt, że w warunkach braku AdoMet enzym EcoP1 przecina niezmodyfikowany DNA wirusa SV40 w kilku miejscach (39). Można by interpretować to zjawisko tak: enzym wobec braku AdoMet nie może metylować sekwencji sąsiadujących z sekwencją gdzie dokonał cięcia. Miejsca niezmodyfikowane są zatem, ciągle wystawiane na działanie nowych enzymów, które dokonują nowych cięć.

Enzym EcoP1 nie rozpoznaje specyficznej sekwencji w miejscu cięcia i tnie DNA w odległości 25—27 par zasad w kierunku 3' od sekwencji rozpoznawanej w procesie metylacji (39). Enzym ten tnie DNA w taki sposób, że powstają wolne końce o długości 2—4 zasad na końcu 5' przecinanego fragmentu. Pomimo tego, że enzym EcoP1 ma pewną dowolność w możliwości cięcia w różnych miejscach, to jednak w pobliżu danego miejsca rozpoznawanego enzym nacina DNA zawsze w ten sam sposób. Być może jest to związane z sekwencją DNA dzielącą miejsce rozpoznawane i miejsce cięcia lub też z samą sekwencją miejsca cięcia. Okazało się, że EcoP1 wprowadza cięcia jedynie w bezpośrednim sąsiedztwie par AT (39). Jeżeli więc w najbardziej odpowiadającej enzymowi odległości od rozpoznawanej sekwencji nie występuje para AT enzym mógłby ciąć w nieco innej odległości ale obok pary AT.

Kolejne etapy reakcji enzymatycznej endonukleaz restrykcyjnych typu III są gorzej poznane niż to jest w przypadku endonukleaz typu I głównie dlatego, że enzymy typu III nie tworzą z DNA ciągu różnego rodzaju kompleksów o specyficznych właściwościach (35). Jedynie doświadczenia, w których użyto heparyny i w ten sposób blokowano w enzymach miejsca wiążące się z DNA (24), pozwalają rozróżnić kolejne stadia reakcji enzymatycznych — reakcje zachodzące przed przyłączeniem się enzymu do DNA (wrażliwe na heparynę) i zachodzące po przyłączeniu się enzymu do DNA (niewrażliwe na heparynę). Technika powyższa została wykorzystana do badania udziału ATP i AdoMet w reakcji enzymu EcoP15 z DNA (32). Stwierdzono, że tworzenie kompleksu enzymu z DNA zachodzi bez udziału ATP i AdoMet. Kompleks EcoP15-DNA jest niewrażliwy na działanie heparyny, gdyż po dodaniu heparyny a następnie ATP i AdoMet enzym jest zdolny do cięcia niezmodyfikowanego DNA. Jednakże dodanie heparyny do utworzonego uprzednio kompleksu EcoP15-DNA zmniejsza efektywność cięcia DNA, gdyż uzyskiwane w takich warunkach fragmenty DNA są większe od uzyskiwanych w warunkach standardowych. Ponieważ enzymy typu III w obecności ATP i AdoMet mają zarówno zdolność cięcia DNA jak i jego modyfikacji, wysunięto przypuszczenie, że zmniejszenie efektywności cięcia zostało spowodowane większą efektywnością metylacji w tych warunkach. Okazało się jednak, że nawet prowadzenie tej reakcji w warunkach uniemożliwiających mety-

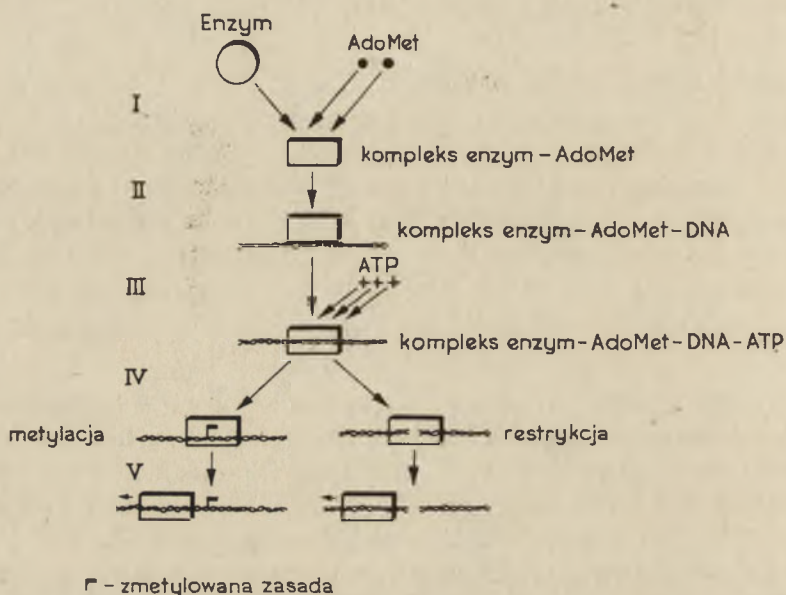
lację (brak AdoMet) nie zwiększa efektywności cięcia DNA w obecności heparyny.

Jak to już podkreślono w odróżnieniu od enzymów restrykcyjnych typu I enzym EcoP15 w reakcji restrykcji jest enzymem wielobrotowym (40), a więc po interakcji z jedną specyficzną sekwencją DNA odnajduje inną specyficzną sekwencję. Wydaje się zatem, że etap odnajdywania nowego miejsca wiązania mógłby być właśnie efektywnie blokowany przez heparynę (32).

Zostało już zaznaczone, że enzymy EcoP15 i EcoP1 mają co najmniej dwa miejsca wiązania AdoMet i trzy miejsca wiązania ATP. Nie wydaje się, aby taka liczba cząsteczek AdoMet i ATP była wymagana jedynie do metylacji (przeniesienie tylko jednej grupy metylowej) czy do cięcia DNA (enzymy typu II nie wymagają wcale ATP do przejawienia aktywności endonukleolitycznej). Badania nad wpływem AdoMet i ATP na aktywność endonukleazy EcoP15 (32) wykazały, że czynniki te odgrywają rolę allosterycznych efektorów podobnie jak to jest w przypadku enzymów typu I.

Kompleks EcoP15-DNA utworzony w obecności AdoMet różni się istotnie od kompleksu EcoP15-DNA utworzonego bez udziału AdoMet. Pierwszy kompleks przejawia swoją aktywność endonukleolityczną przy niższym stężeniu ATP i jest o wiele trwalszy niż kompleks utworzony bez udziału ATP. Tak więc AdoMet oddziałując z kompleksem EcoP15-DNA stymuluje cięcie DNA i stabilizuje kompleks EcoP15-DNA. Badania kinetyki cięcia DNA przez EcoP15 (32, 35), wykazały że reakcja cięcia w obecności AdoMet jest szybsza niż reakcja bez udziału AdoMet. Różnica w szybkościach jest zbyt duża, aby przypisać ją wyłącznie temu, że kompleks EcoP15-DNA w obecności AdoMet jest bardziej trwały i że niższe stężenia ATP pozwalają na przejawienie aktywności endonukleolitycznej kompleksu EcoP15-DNA w obecności AdoMet. Tak duża różnica powstać mogła by jedynie dzięki ujawnieniu się wpływu AdoMet na etap limitujący szybkość reakcji. Ponieważ szybkość powstawania kompleksu EcoP15-DNA jest niezależna od obecności AdoMet i jest to szybki etap reakcji, zwrócono uwagę na etap oddziaływania ATP z kompleksem EcoP15-DNA. Okazało się, że etap ten jest stosunkowo wolny i że obecność AdoMet znacznie go przyspiesza. Wydaje się, że samo przyłączenie ATP do kompleksu EcoP15-DNA jest procesem szybkim a dopiero transformacja kompleksu do formy zdolnej do cięcia DNA jest procesem wolnym, w którym ATP i AdoMet działają jako allosteryczne efekторы. Wydaje się, że mechanizm działania HinFIII jest bardzo podobny do mechanizmu działania EcoP15 (33). Optymalne stężenie ATP dla reakcji endonukleolitycznej obu tych enzymów wynosi 1×10^{-5} M. Największa stymulacja endonukleolitycznej aktywności następuje w obu przypadkach przy stężeniu 1×10^{-7} M AdoMet.

Również przejawiane aktywności metylazy wydają się być bardzo podobne w enzymach EcoP1 (38, 41), EcoP15 (32) i HinfIII (33). Wszystkie trzy enzymy wydają się metylować adeninę do N⁶-metyloadeniny i mają zdolność przejawiania tej aktywności w warunkach wymaganych do przejawiania aktywności endonukleolitycznej. Enzymy EcoP1 (32) i HinfIII (33) mogą metylować DNA także w warunkach braku ATP.



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie prawdopodobnego ciągu etapów reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy restrykcyjne typu III

Przedstawione powyżej dane są niewystarczające dla zaproponowania schematu reakcji katalizowanych przez enzymy typu III. Jednak dla pewnego uporządkowania wydaje się celowe przedstawienie (Ryc. 3) jednej z możliwości, która moim zdaniem najlepiej obrazuje mechanizm działania enzymów typu III, chociaż nie wyjaśnia roli kilku miejsc wiążących ATP i AdoMet w tych enzymach.

1. *Etap pierwszy:* Enzym tworzy kompleks z AdoMet. Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, że świeżo wyizolowany HinfIII jest związany z AdoMet a dłuższe przechowywanie powoduje dysocjację tego kompleksu (42).
2. *Etap drugi:* Kompleks enzym AdoMet rozpoznaje specyficzną nie zmodyfikowaną sekwencję, tworząc stabilny kompleks Enzym-AdoMet-DNA.
3. *Etap trzeci:* Kompleks Enzym-AdoMet-DNA pod wpływem ATP ulega powolnej transformacji do formy, która jest zdolna zarówno do cięcia jak i modyfikacji DNA.
4. *Etap czwarty:* Enzym przejawia aktywność endonukleazy bądź me-

tylżazy wobec niezmodyfikowanej sekwencji. W jaki sposób wybierana jest jedna z aktywności jeszcze nie wiadomo.

5. *Etap piąty*: Enzym odłącza się od miejsca rozpoznawanego i jest gotowy do ponownego ciągu reakcji.

III. Uwagi końcowe

Badacze enzymów restrykcyjnych zostali postawieni wobec pewnego paradoksu. W miarę poznawania odmiennych mechanizmów działania trzech typów systemów restrykcyjnych nasuwało się pytanie dlaczego dla uzyskania tego samego celu natura stosuje tak różne rozwiązania. Dlaczego do restrykcji fagowego DNA komórka używa tak energochłonnej i skomplikowanej maszyny enzymatycznej, jaką stanowią enzymy restrykcyjne typu I jeżeli posiada do dyspozycji nie wymagające nakładu energii, o małym ciężarze molekularnym enzymy typu II.

Także kwestia funkcji enzymów restrykcyjnych staje się coraz bardziej skomplikowana. Początkowo sądzono, że funkcją tych enzymów jest obrona bakterii przed bakteriofagami (43). Jednakże fakt, iż jedynie fagi namnożone w bakteriach innego szczepu niż bakteria infekowana są efektywnie eliminowane przez działanie enzymów restrykcyjnych zwrócił uwagę, że być może enzymy te stanowią barierę genetyczną pomiędzy poszczególnymi szczepami bakteryjnymi. Arber nazwał nawet enzymy restrykcyjne swoistymi systemami immunologicznymi skierowanymi przeciw obcemu genetycznie DNA przenikającemu na teren komórki (44). Ostatnio jednak coraz częściej postuluje się udział enzymów restrykcyjnych w procesie rekombinacji (27, 45—46).

Być może każdy z trzech typów enzymów restrykcyjnych spełnia inną rolę (na przykład udział w różnych procesach rekombinacji), a ich odmienna budowa jest rezultatem przystosowania do tych funkcji, natomiast działanie na niezmodyfikowany DNA jest jedynie wspólną cechą tych enzymów.

Zaakceptowano 4.2.1980

PIŚMIENNICTWO

1. Stasiak A., (1980), *Postępy Biochemii*, **26**,
2. Meselson M., Yuan R., (1968), *Nature*, **217**, 1110—1114.
3. Linn S., Arber W., (1968), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **59**, 1300—1306.
4. Colson C., van Pel A., (1969), *J. Gen. Mikrobiol.*, **58**, 57—64.
5. Gromkova R., Bendler J., Goodgal S., (1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 1151—1157.

6. Piekarowicz A., Brzezinski R., Kauc L., (1976), *Acta Mikrobiol. Pol.*, **8**, 307—312.
7. Sjostrom J. E., Lofdaht S., Philipson L., (1978), *J. Bacteriol.*, **133**, 1144—1149.
8. Meselson M., Yuan R., Heywood J., (1972), *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 447—466.
9. Eskin B., Linn S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6183—6191.
10. Haberman A., Heywood J., Meselson M., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3138—3141.
11. Vovis G., Horiuchi K., Zinder N. D., (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3810—3813.
12. Vovis G., Zinder N. D., (1975), *J. Mol. Biol.*, **95**, 557—568.
13. Lautenberger J. A., Linn S., (1972), *J. Biol. Chem.*, **247**, 6176—6182.
14. Wood W. B., (1966), *J. Mol. Biol.*, **16**, 116—133.
15. Boyer H. W., Roulland-Dussoix D., (1969), *J. Mol. Biol.*, **41**, 459—472.
16. Boyer H. W., (1964), *J. Bacteriol.*, **88**, 1652—1660.
17. Boyer H. W., Scibienski E., Slocum H., Roulland-Dussoix D., (1971), *Virology*, **46**, 703—710.
18. Hubacek J., Glover S. W., (1970), *J. Mol. Biol.*, **50**, 111—127.
19. Ravetch J. V., Horiuchi K., Zinder N. D., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2266—2270.
20. Lautenberger J. A., Chen Kan N., Lackey D., Linn S., Edgell M. H., Hutchison III C. A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2271—2275.
21. Bickle T. A., informacja ustna.
22. Yuan R., Heywood J., Meselson M., (1972), *Nature, New Biology*, **240**, 42—43.
23. Bickle T. A., Brack C., Yuan R., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3099—3103.
24. Yuan R., Bickle T. A., Ebberts W., Brack C., (1975), *Nature*, **256**, 556—566.
25. Kuhnlein U., Arber W., (1972), *J. Mol. Biol.*, **63**, 9—19.
26. Linn S., Rosamond J., Endlich B., (1979), *Fed. Proc.*, **38**, 367.
27. Rosamond J., Endlich B., Telander K. M., Linn S., (1978), *CSH Symp. Quant. Biol.*, **43**, 1049—1057.
28. Hadi S. M., Bickle T. A., Yuan R., (1975), *J. Biol. Chem.*, **250**, 4159—4164.
29. Hubacek J., (1973), *J. Gen. Microbiol.*, **79**, 257—264.
30. Hadi S. M., Yuan R., (1974), *J. Biol. Chem.*, **249**, 4580—4586.
31. Buhler R., Yuan R., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 6756—6760.
32. Yuan R., Reiser J., (1978), *J. Mol. Biol.*, **122**, 433—445.
33. Kauc L., Piekarowicz A., (1978), *Eur. J. Biochem.*, **92**, 417—426.
34. Haberman A., (1974), *J. Mol. Biol.*, **89**, 545—563.
35. Reiser J., Yuan R., (1977), *J. Biol. Chem.*, **252**, 451—456.
36. Piekarowicz A., Kauc L., Glover S. W., (1974), *J. Gen. Microbiol.*, **81**, 391—403.
37. Rosner J. L., (1973), *Virology*, **52**, 213—222.
38. Hattman S., Brooks J. E., Masunekar M., (1978), *J. Mol. Biol.*, **126**, 367—380.
39. Bachi B., Reiser J., Pirrota V., (1979), *J. Mol. Biol.*, **128**, 143—163.
40. Reiser J., (1975), *Ph. D. thesis*, University of Basel.
41. Haberman A., Heywood J., Meselson M., (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **69**, 3138—3141.

42. Piekarowicz A., informacja ustna.
43. Lunia S. E., (1953), *CSH Symp. Quant. Biol.*, **18**, 237—244.
44. Arber W., (1977), *Trends in Biochem. Sci.*, **2**, N176—N178.
45. Chang S., Cohen S. N., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4811—4815.
46. Zabeau M., Roberts R. J., (1978), *Mol. Genet.*, **3**, 1—54.

ROMANA WINTER ^{*)}, DANUTA PISKORSKA ^{**)}

Enzymy układu glioksalazy

Glyoxalase Enzyme System

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Właściwości glioksalazy I
 - II-1. Masa cząsteczkowa
 - II-2. Skład aminokwasowy, punkt izoelektryczny
 - II-3. Właściwości kinetyczne, specyficzność substratowa i mechanizm działania
 - II-4. Metale a aktywność glioksalazy I
 - II-5. Inhibitory
- III. Właściwości glioksalazy II
- IV. Oznaczanie aktywności enzymów systemu glioksalazy
 - V. Biologiczna rola glioksalaz
 - VI. Glioksalazy w nowotworach

Contents

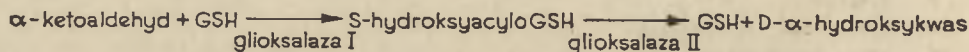
- I. Introduction
- II. Properties of glyoxalase I
 - II-1. Molecular weight
 - II-2. Aminoacid composition, isoelectric point
 - II-3. Kinetic properties, substrate specificity and the mechanism of reaction
 - II-4. Metals and activity of glyoxalase I
 - II-5. Inhibitors
- III. Properties of the glyoxalase II
- IV. Methods of determination of glyoxalase system
 - V. Biological function of glyoxalases
 - VI. Glyoxalases in tumours

^{*)} ^{**)} Dr., Zakład Biochemii, Instytut Biologiczno-Fizjologiczny, Śląska Akademia Medyczna, ul. Marksa 19, 41-808 Zabrze.

Wykaz stosowanych skrótów: GSH — glutation zredukowany; SDS — siarczan dodecyłu sodu; HEPES — kwas N-2-hydroksyetylopiperazyno-N'-2-etanosulfonowy; EDTA — sól sodowa kwasu etylenodwuaminocztworooctowego; EGTA — kwas etylenoglikolo-bis(β-amino-etylowy eter)-N,N'-czterooctowy.

I. Wstęp

W 1913 roku Dakin i Dudley (1) oraz Neuberg (2) wykryli enzym, który katalizował przemianę α -ketoaldehydów — pochodnych gliksalu do odpowiednich D- α -hydroksykwasów, a szczególnie metylogliksalu do D-mleczanu i nazwali go gliksalazą. W roku 1932 Lohmann (3) stwierdził, że zredukowany glutation jest koniecznym gliksalazy, co zostało później potwierdzone przez innych autorów (4, 5). Początkowo uważano, że reakcję przemiany metylogliksalu do D(-)mleczanu katalizuje jeden enzym — gliksalaza. Dopiero jednak w 1951 roku Racker (6) wykazał, że przemiana ta zachodzi dwustopniowo, a gliksalaza jest w rzeczywistości systemem enzymatycznym składającym się z dwóch niezależnie działających enzymów: gliksalazy I i gliksalazy II, które przeprowadzają reakcje:



Ryc. 1. Ciąg reakcji enzymów systemu gliksalazy

Enzymy te następnie zakwalifikowano do dwóch odrębnych klas: gliksalazę I do liaz — E.C. 4.4.1.5 (metylogliksalo-liaza S-laktoiloglutationu), a gliksalazę II do hydrolaz — E.C. 3.1.2.6 (hydrolaza S-2-hydroksyacyloglutationu).

Gliksalazy znajdują się w bakteriach, roślinach i tkankach zwierząt (7—12). Metodą ultrawirowania wykazano, że prawie cała aktywność gliksalaz jest zlokalizowana w cytozolu (10). Obszerne dane na temat aktywności tych enzymów w tkankach normalnych i nowotworowych zawarte są w pracy Jerzykowskiego i wsp. (10).

II. Właściwości gliksalazy I

W ostatnich latach ukazało się wiele prac dotyczących oczyszczania gliksalazy I (13—23). Zastosowanie DEAE-celulozy i chromatografii powinowactwa pozwoliło na uzyskanie wysoce oczyszczonych preparatów enzymu (Tabela 1) i równocześnie na szczegółowe zbadanie właściwości gliksalazy I.

Tabela 1

Stopień oczyszczenia i aktywność właściwa glioksalazy I z różnych źródeł

Źródło enzymu	Oczyszczenie (x)	Aktywność wł. IU/mg białka	Warunki pomiaru	Písmien- nictwo
drożdże piekarskie	233	312	33 mmol/l bufor fosforanowy pH 6,6	6
drożdże piekarskie	5,4*	1 080	25 mmol/l imidazol-HCl pH 7,0	21
świnia — erytrocyty	2 030	159	100 mmol/l imidazol-HCl pH 6,8+10 mmol/l MgCl ₂	22
świnia — erytrocyty	11 500	957	25 mmol/l imidazol-HCl pH 7,0	14
szczur — wątroba	5 000	950	25 mmol/l imidazol-HCl pH 7,0	23
szczur — wątroba	68	55	95 mmol/l imidazol-HCl pH 6,8+8 mmol/l MgSO ₄	20
szczur — wątroba	1 170	983	50 mmol/l bufor fosforanowy pH 7,0+10 mmol/l MgCl ₂	15
szczur — mózg	503	814	50 mmol/l bufor fosforanowy pH 7,0+10 mmol/l MgCl ₂	15
szczur — nerka	163	101	50 mmol/l bufor fosforanowy pH 7,0+10 mmol/l MgCl ₂	15
szczur — erytrocyty	2 415	9 300	50 mmol/l bufor fosforanowy pH 7,0+10 mmol/l MgCl ₂	15
mysz DBA/11 — wątroba	1 140	2 200	100 mmol/l imidazol-HCl pH 6,8+16 mmol/l MgSO ₄	16
mysz Swiss — wątroba	1 162	944	100 mmol/l imidazol-HCl pH 6,8+16 mmol/l MgSO ₄	17
owca — wątroba	4 800	4 200	80 mmol/l imidazol-HCl pH 6,8+13,3 mmol/l MgSO ₄	19
człowiek — erytrocyty	12 000	1 019	25 mmol/l imidazol-HCl pH 7,0	24

*) materiałem wyjściowym była glioksalaza I firmy Boehringer o specyficznej aktywności 200 jedn/mg białka

II-1. Masa cząsteczkowa

Masy cząsteczkowe gliksalazy I z różnych tkanek zwierząt (Tabela 2) oznaczone metodą sączenia molekularnego na kolumnie Sephadex G-100 i G-75, jak również metodą ultrawierowania, mieszczą się w granicach 42 000—54 000 daltonów.

Tabela 2

Masa cząsteczkowa gliksalazy I

Źródło enzymu		Masa cząsteczkowa (daltony)	Metoda oznaczania	Piśmienictwo
wół	wątroba	45 800	sączenie Sephadex G-75	18
	nerka			
	mózg			
świnia	wątroba	51 300	sączenie Sephadex G-100	18
	nerka			
świnka morska	wątroba	46 200	sączenie Sephadex G-100	18
	nerka			
	mózg	46 200	ultrawierowanie	18
mysz	wątroba			
	mózg	46 200	ultrawierowanie	18
szczur	wątroba			
	mózg	46 200	ultrawierowanie	18
	mięśnie			
kurczak	wątroba	52 000	sączenie Sephadex G-75 i G-100	22
	nerka			
świnia	erytrocyty	48 000	sączenie Sephadex G-100	14
		54 000	sączenie Sephadex G-100	25
szczur	wątroba	50 000	sączenie Sephadex G-100	15
		49 500	sączenie Sephadex G-100	20
		54 000	sączenie Sephadex G-100	23
		27 000	żel poliakryloamidowy z SDS	23
	erytrocyty	50 000	sączenie Sephadex G-100	15
mysz	wątroba	43 000	sączenie Sephadex G-100, ultrawierowanie	16, 17
		42 000	ultrawierowanie	16
		21 500	żel poliakrylamidowy z SDS	17
owca	wątroba	45 900	sączenie Sephadex G-100	19
		21 000	żel poliakrylamidowy z SDS	19
człowiek	wątroba	50 000	sączenie Sephadex G-100	26
drożdże piekarskie		33 000	sączenie Sephadex G-100	25
		32 000	sączenie Sephadex G-100	21
		29 600	sączenie Sephadex G-75	27
nowotwory doświadczalne*)		46 000	sączenie Sephadex G-75	28
bakterie (<i>B. subtilis</i>)		350 000	sączenie Bio-Gel P ₃₀₀	29

*) czerniak Al amelanotyczny, czerniak Mc melanotyczny, guz Guerin, mięsak Yoshidy, wątrobiak Kirkmana-Robbinsa, wątrobiak Morrisa 7777, wątrobiak Morrisa 5123 D.

Różne wartości siły jonowej buforu eluującego, jak również dodatek mocznika nie powodują zmian w wartości masy cząsteczkowej. Stosując elektroforezę w żelu poliakryloamidowym z dodatkiem SDS stwierdzono występowanie aktywnego pasma enzymu o masie cząsteczkowej od 21 000—27 000 daltonów. Wskazuje to na dimeryczną strukturę i wydaje się, że jest to cecha natywnego enzymu pochodzącego z tkanek zwierzęcych (14, 17, 19, 23, 24). Masa cząsteczkowa glioksalazy I drożdżowej oznaczona metodą sączenia molekularnego wynosi 29 600—33 000 daltonów (21, 25, 26). Badania glioksalazy I drożdżowej (21) wykazały, że cząsteczka zbudowana jest z prostego łańcucha polipeptydowego. Glioksalaza I pochodzenia bakteryjnego wydaje się znacznie różnić od enzymu z tkanek zwierzęcych i drożdży. Posiada ona znacznie wyższą masę cząsteczkową — 350 000 daltonów (29) i inną specyficzność substratową. Wartości V_{max} są o wiele wyższe dla fenyloglioksalu i jego pochodnych (30).

II-2. Skład aminokwasowy, punkt izoelektryczny

Otrzymanie wysoce oczyszczonych preparatów glioksalazy I pozwoliło na zbadanie składu aminokwasowego tego enzymu (Tabela 3). W czą-

Tabela 3

Skład aminokwasowy glioksalazy I z różnych źródeł
(mole/mol enzymu)

aminokwas	erytrocyty świni (wg 14)	wątroba myszy (wg 16)	wątroba szczura (wg 23)	drożdże piekarskie (wg 21)
kwas asparaginowy	56	53	46	30
treonina	23	34	27	14
seryna	29	32	23	20
kwas glutaminowy	43	42	65	30
prolina	27	27	25	15
glicyna	32	31	19	26
alanina	31	19	46	10
cysteina	9		26	15
walina	11	14	28	12
metionina	9	7	6	2
izoleucyna	26	17	14	14
leucyna	41	47	45	20
tyrozyna	12	13	17	10
fenyloalanina	25	25	23	13
histydyna	9	7	10	9
lizyna	39	23	43	21
tryptofan	6			
arginina	13	14	20	10

steczce gliksalazy I izolowanej i oczyszczonej z różnych organizmów na uwagę zasługuje duża zawartość kwasu asparaginowego i glutaminowego, a niska histydyny i argininy. Taki skład aminokwasowy czyni gliksalazę białkiem kwaśnym. Punkt izoelektryczny (pI) gliksalazy I z erytrocytów świni i wątroby owcy wyznaczany metodą elektroogniskowania wynosi 5,0 (14, 19, 22), a enzymu z wątroby szczura — 4,7 (23). W jednej cząsteczce enzymu z erytrocytów świni występują cztery grupy dwusiarczkowe i dwie tiolowe (14), natomiast w enzymie z wątroby szczura — 12 wiązań dwusiarczkowych i dwie grupy tiolowe (23).

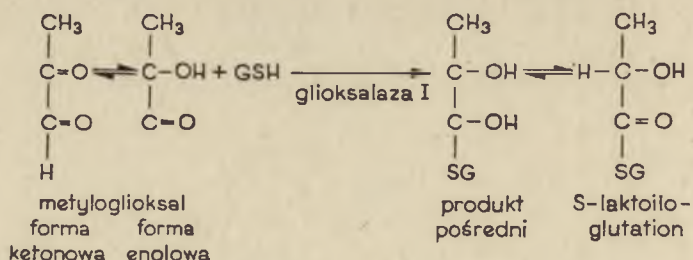
Centrum aktywne gliksalazy I ma obszar niepolarny. Potwierdzeniem hydrofobowego charakteru centrum aktywnego jest wyższa stała Michaelisa dla polarnego substratu jakim jest hydroksymetylogliksal ($K_m = 0,8$ mmol/l) w porównaniu z wartością dla metylogliksalu ($K_m = 0,3$ mmol/l) (31). Ponadto inhibicja enzymu przez S-alkilowe pochodne glutationu wzrasta wraz z długością łańcucha alkilowego (32).

II-3. Własności kinetyczne, specyficzność substratowa i mechanizm działania

Optimum pH gliksalazy I wynosi 5,5—8,0 (6, 19, 33, 34) w buforach: fosforanowym, octanowym, HEPES oraz imidazolowym. Jednakże przy pomiarze w buforze imidazolowym istotny wpływ na aktywność enzymu wywiera obecność Mg^{++} . W przypadku zastosowania wyższych stężeń imidazolu (100—150 mmol/l) następuje kompleksowanie przez imidazol metalu zawartego w enzymie i obniżenie aktywności o ponad 60%. W tych warunkach aktywność jest przywracana przez dodatek 13,3 mmol/l $MgSO_4$ (19).

Gliksalaza I katalizuje tworzenie się z metylogliksalu i glutationu S-laktoilglutationu (6). Podobne tioestry mogą tworzyć się z α -ketoaldehydów i GSH względnie tioli analogicznych do GSH (4, 35—37). Mechanizm reakcji gliksalazy I zaproponowany przez Rackera (6) podany jest na rycinie 2.

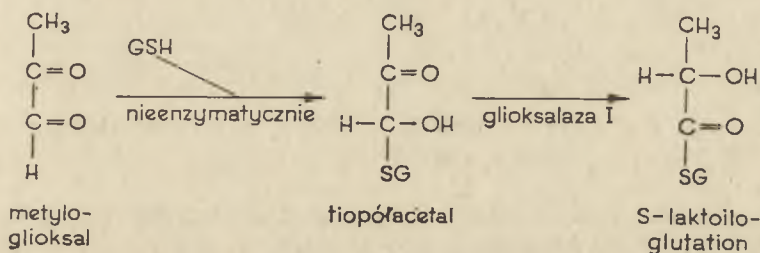
W reakcji tej gliksalaza I łączy enolową formę metylogliksalu z glutationem dając S-laktoilglutation w formie enolowej, który prawdopo-



Ryc. 2. Mechanizm działania gliksalazy I wg Rackera (6)

dobnie w reakcji nieenzymatycznej przechodzi w formę ketonową.

Rose (38) badał przemianę metylogliksalu do D(-)mleczanu w roztworze wodnym zawierającym tryt. Według niego glioksalaza I katalizuje reakcję dysproporcjonowania metylogliksalu z jednoczesną tioestryfikacją. Mechanizm działania enzymu polega więc głównie na przeniesieniu równoważnika wodoru z C₁ na C₂ ketoaldehydu z towarzyszącym wytworzeniem tioestru (38, 39). Dawne badania Kermacka i Mathesona (40) sugerowały, że dla prawidłowego przebiegu reakcji niezbędny jest wolny metylogliksal i glutation. Późniejsze prace wskazują, że mechanizm działania glioksalazy I należy rozpatrywać jako jednosubstratowy. Najpierw z α-ketoaldehydu i glutationu tworzy się tiopółacetal, który jest dopiero właściwym substratem glioksalazy I (41), co przedstawia rycina 3.



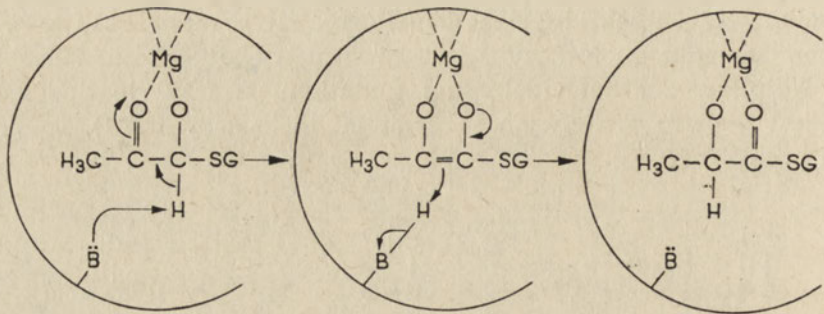
Ryc. 3. Jednosubstratowy mechanizm działania glioksalazy I (wg 41)

Według Vander Jagta i wsp. (42) glioksalaza I katalizuje dysproporcjonowanie tiopółacetalu, utworzonego z metylogliksalu i glutationu. Wewnątrzcząsteczkowa migracja jonu wodorkowego jest czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji glioksalazy I (15, 34, 38, 39). Pogląd na oksydoredukcyjną izomeryzację tiopółacetalu przy udziale glioksalazy I z wątroby cielęcej podziela wielu autorów (13, 41). Stereospecyficzne przeniesienie jonu wodorkowego poprzez cykliczne przesunięcie przy udziale metalu wiążącego substrat jest właściwym mechanizmem, podobnym do mechanizmu działania oksydoreduktaz. Dlatego też niektórzy badacze przyjmują jednosubstratowy mechanizm działania z tiopółacetalem jako prawdziwym substratem i uważają, że glioksalaza I winna być zakwalifikowana do oksydoredukcyjnych izomeraz, a nie do liaz.

W 1976 roku Hall i wsp. (43) przedstawili dowody, że mechanizm przemiany α-ketotiopółacetalu, utworzonego z metylogliksalu i glutationu w ester α-hydroksytiolowy (S-laktoiloglutation) polega raczej na przeniesieniu protonu z wytworzeniem ugrupowania endiolowego niż na przesunięciu jonu wodorkowego. Stosując technikę jądrowego rezonansu magnetycznego badacze ci wykazali rosnące wraz z temperaturą włączenie do produktu protonów ze środowiska wykluczając mechanizm przesunięcia jonu wodorkowego z C₁ na C₂, co było uprzednio postulowane (13).

Ponadto stwierdzono, że niezbyt wysokie włączanie do produktu protonów ze środowiska (15%—22%), wskazuje na to, że centrum aktywne enzymu jest mocno osłonięte i niedostępne (43).

Mechanizm działania gliksalazy I zaproponowany przez Halla i wsp. (43) przedstawiono na rycinie 4. Substrat chelatuje Mg^{+2} w centrum aktywnym, a grupa „B” przedstawia resztę zasadowego aminokwasu. Technika fotooksydacji wykazano, że jest nim histydyna (Ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat mechanizmu przeniesienia protonu w centrum aktywnym gliksalazy I (wg 43)

Na podstawie komputerowej analizy danych uzyskanych z 10 modeli doświadczalnych dla gliksalazy I z drożdży, uważa się zarówno reakcję jedno- jak i dwusubstratową za prawdopodobny mechanizm działania tego enzymu (44). Zgodnie z pierwszą możliwością tio-półoacetal jest substratem a GSH kompetycyjnym inhibitorem, podczas gdy zgodnie z drugą możliwością glutation jest pierwszym, a metylogliksal drugim substratem w reakcji osiągającej natychmiastową równowagę. Przy niższych stężeniach substratów (metylogliksalu i glutationu) możliwy jest zarówno mechanizm jedno- jak i dwusubstratowy. Odnosi się to zarówno do gliksalazy I z drożdży jak i z tkanek zwierzęcych (15, 45, 46).

Przedstawione w Tabeli 4 wartości stałych Michaelisa są najniższe dla tio-półoacetalu *p*-chlorofenylogliksalu w odniesieniu do gliksalazy I pochodzącej zarówno z drożdży, *E. coli* jak i erytrocytów szczura. Dla tio-półoacetalu metylogliksalu najniższą wartość K_m posiada enzym z *E. coli*.

Gliksalaza I jest enzymem o wysokiej aktywności molekularnej ($1,2 \times 10^6/\text{min}$) (45).

II-4. Metale a aktywność gliksalazy I

Davis i Williams (47) zaproponowali dwie możliwe role jonu metalu w reakcji katalizowanej przez gliksalazę I:

1) wpływ na zmianę konformacji białka poprzez utworzenie przez atom metalu wiązania między podjednostkami enzymu;

Wartości stałej Michaelisa glioksalazy I z różnych źródeł

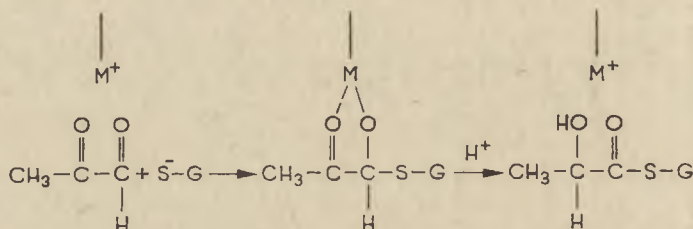
Substrat	Źródło enzymu										
	drożdże		<i>Escherichia coli</i>				erytrocyty szczura		wątroba owcy		
	K_M mmol/l	V_{max}	K_M mmol/l	V_{max}	*	K_M mmol/l	V_{max}	*	K_M mmol/l	V_{max}	*
A: tiopólacetal**/: metyloglioksalu	1,0	1,0	0,04	1,0	30	0,09	1,0	15	0,078	1,0	19
	0,3	1,0									
	0,32	1,0									
	0,2	0,93	0,2	133	30	0,04	0,5	15	0,113	0,85	19
	0,3	0,75				0,2	1,5	15			
p-chlorofenyloglioksalu hydroksymetyloglioksalu	0,04	0,5	0,02	38	30	0,02	0,7	15			
	0,8	0,43									
B: α -ketoaldehyd: metyloglioksal fenyloglioksal ketoksal hydroksymetyloglioksal fosfohydroksy—metyloglioksal glioksal dwuoksowalerianian	1,0	1,0							0,194	1,0	19
									0,147	0,85	19
									1,38	0,75	19
	3,9	1,0			36				1,54	0,15	19
	1,0	0,53			33				0,96	0,03	19

*) pismienictwo, **) wartości K_M podane dla stężeń substratu tiopólacetalu utworzonego z glutationu i podanych w tabeli α -ketoaldehydów

2) bezpośredni udział dwuwartościowych kationów w katalizie tworzenia tioestru.

Rozwinięciem tej drugiej koncepcji są sugestie wysunięte przez Van der Jagta i Hana (34). Jon metalu może być wiązany w centrum aktywnym w postaci kompleksu z tlenem grupy ketonowej tiopółacetalu. Jon metalu (Me^{+2}) uczestniczący w reakcji glioksalazy I jako superkwasy Lewisa, który jest zdolny do polaryzacji grupy α -ketonowej substratu, ułatwia reakcję dysproporcjonowania. Czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji jest pęknięcie wiązania węgiel—wodór tiopółacetalu (45).

Glioksalaza I drożdżowa o aktywności właściwej 1000 IU/mg białka zawiera 1 gramatom magnezu na 93 000 gramów białka (47). Ponieważ preinkubacja glioksalazy I z jonami metalu powoduje podwyższenie aktywności enzymu, przypuszcza się, że aktywny enzymatycznie jest kompleks metal—enzym. Proponowany mechanizm działania metalu w reakcji zachodzącej pod wpływem glioksalazy I przedstawiony jest na rycinie 5.



Ryc. 5. Schemat udziału metalu w reakcji glioksalazy I zaproponowany przez Davisa i Williamsa (47)

Kinetyka inaktywacji glioksalazy I przez chlorek dansylu wskazuje, że grupa dansylowa modyfikuje miejsce blisko centrum aktywnego, a więc jon metalu odgrywa zasadniczą rolę w centrum aktywnym enzymu (45). Oznaczono zawartość metalu w cząsteczce glioksalazy I z wątroby owcy przy użyciu spektrometru absorpcji atomowej i stwierdzono obecność około 10 atomów Mg, 1 atomu Zn i 0,05 atomu Mn w cząsteczce enzymu (19). Ostatnio wykazano (48), że glioksalaza I z erytrocytów ludzkich i świni oraz wątroby szczura zawiera cynk w ilości 2 mole Zn na 1 mol enzymu, czyli 1 mol cynku na 1 podjednostkę enzymu, zaś enzym z drożdży 1 mol Zn/mol enzymu. Należy zaznaczyć, że glioksalaza I z drożdży jest monomerem, natomiast enzym pochodzenia zwierzęcego składa się z dwóch podjednostek (23, 48). Cynk jest kofaktorem natywnego enzymu. Usunięcie cynku przez słabe odczynniki chelatujące powoduje utratę aktywności enzymatycznej. Wpływ metalu na aktywność glioksalazy I przedstawia Tabela 5. Zarówno Zn^{+2} jak i Mg^{+2} mogą być wiązane w tym samym miejscu. Reaktywacja glioksalazy I przez Co^{+2} pozwala zakwalifikować ten enzym jako cynkometaloenzym (48).

Tabela 5

Wpływ kationów metali dwuwartościowych na aktywność glioksalazy I

Źródło enzymu ^{*)}	Aktywacja	Piśmiennictwo
wątroba ludzka	Mg > Mn	26
wątroba cielęca	Mg > Mn > Ni ≥ Zn > Ca > Sr > Ba	47
wątroba owcy	Mg > Zn > Mn > Co > Ni > Ca	19
wątroba szczura	Mg > Mn > Zn > Co > Ni	23
erytrocyty szczura	Mg > Mn > Co > Ni	45
erytrocyty świni	Mg > Mn > Ca	22
erytrocyty świni	Mg > Co > Mn > Zn	14

*) Enzym przed dodaniem aktywatora był poddany dializie wobec EDTA

II-5. Inhibitory

Aktywność glioksalazy I częściowo hamują związki, które reagują z grupami sulfhydryłowymi — tworząc merkaptidy, a także substancje utleniające i alkilujące. To, że niektóre z tych odczynników hamują aktywność enzymu tylko o około 40% może wskazywać, że dla pełnej aktywności glioksalazy potrzebne są nietknięte grupy sulfhydrylowe, lecz grupy te nie biorą bezpośredniego udziału w katalizie enzymatycznej (49, 50). Najsilniejszym inhibitorem grup SH glioksalazy I jest *p*-hydrok-sybenzoesan rtęci, który w stężeniu 5 μmol/l powoduje 86% hamowania (49). Hamowanie w wyniku zablokowania grup aminowych wykazało, że pełnią one główną rolę w aktywności katalitycznej enzymu (50). Najsilniejsze hamowanie powoduje 2,4,6-trójnitrobenzenosulfonian oraz chlorek dansylu w stężeniu 5 mmol/l. Utrata aktywności glioksalazy I spowodowana inhibitorami reagującymi z grupami aminowymi może być zatrzymana przez ochraniające działanie pochodnych glutationu. Do całkowitej ochrony enzymu przed działaniem inhibitorów grup aminowych potrzebne są dwie cząsteczki pochodnych glutationu (50).

Odwracalnym kompetycyjnym inhibitorem glioksalazy I jest wolny glutation ($K_1 = 5$ mmol/l) (23, 42) jak również pochodne glutationu, szczególnie ftaloimidodecylo-GSH i aminodecylo-GSH (32, 40, 51). Badania (52) z S- i N- podstawionymi cysteinyloglicynami, jako inhibitorami glioksalazy I, wykazały efekt hamowania niekompetycyjnego, co było nieoczekiwane, ponieważ są to analogi substratu — glutationu. Wskazuje to na wiązanie ich w innym miejscu niż miejsce substratowe. Badacze ci wysuwają sugestię, że glioksalaza I z drożdży ma dwa miejsca wiążące: w centrum aktywnym wiązany jest substrat — tiopólacetal, glutation lub jego S-podstawione pochodne, natomiast pozbawione reszty γ -glutamylowej pochodne S-cysteinyloglicyny wiążą się w innym miejscu.

EDTA powoduje utratę aktywności glioksalazy I, a dodatek jonów Me^{+2} przywraca jej aktywność (14, 19, 47).

W dawnej literaturze jest wiele danych o istnieniu naturalnych inhibitorów glioksalazy, występujących w nerkach i trzustce, nazwanych anty-

Stopień oczyszczenia i aktywność właściwa glioksalazy II z różnych źródeł

Źródło enzymu	Oczyszczenie (x)	Aktywność właściwa IU/mg białka	Sposób oczyszczenia, warunki pomiaru	Piśmiennictwo
wątroba wołu	20	9,8	strącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i etanolem, absorbcja na Alumina C_γ ; 33 mmol/l bufor fosforanowy pH 6,6	6
wątroba wołu	15	0,6	strącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i etanolem; 25 mmol/l trójetanoloamina-HCl pH 7,4	35
wątroba wołu	20	7,3	strącanie IV rz-butanołem i <i>n</i> -propanolem; 67 mmol/l TRJS-HCl pH 7,5	59
wątroba wołu	30	17,0	sączenie Sephadex G-75; 50 mmol/l TRIS-HCl pH 7,4	18
nerka kurczęcia	21	20,4	sączenie Sephadex G-75; 50 mmol/l TRIS-HCl pH 7,4	18
wątroba ludzka	4330	822,0	strącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sączenie DEAE i CM-celuloza oraz Sephadex G-75, absorbcja na hydroksyapatycie; 67 mmol/l TRIS-HCl pH 7,4	58

glioksalazą (53). Wykazano, że jednym z takich czynników w odniesieniu do glioksalazy I jest enzym γ -glutamylotranspeptydaza inaktywująca kosubstrat glioksalazy I — glutation (54, 55). Wydaje się, że jest ona ważnym czynnikiem w regulacji aktywności glioksalazy I (55).

Kwas oftalmowy — analog glutationu (γ -glutamilo- α -aminobutyryloglicyna), występujący w soczewce oka, jest kompetycyjnym inhibitorem glioksalazy I (56). Kompetycyjnym inhibitorem glioksalazy I jest aldehyd D,L-mlekowy. W związku z tym Ting i wsp. (57) przypuszczają, że możliwy jest mechanizm regulacyjny, w którym poziom aldehydu mlekowego kontrolowałby aktywność glioksalazy I, metabolizującej produkt jego utlenienia — metyloglioksal. Sugestia ta nie znalazła jednakże potwierdzenia w pracach innych badaczy.

III. Właściwości glioksalazy II

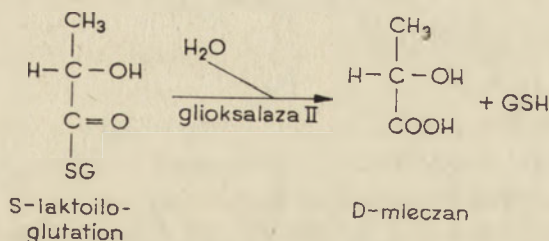
Glioksalaza II nie jest jeszcze tak dobrze poznanym enzymem jak glioksalaza I i na razie ukazało się niezbyt wiele prac na jej temat (6, 10, 18, 33, 35, 58, 59, 60).

Zastosowanie kolumn z wymiennicami jonowymi, z Sephadex G-75 oraz hydroksyapatytem pozwoliło otrzymać enzym o aktywności właściwej 822 IU/mg białka (58) (Tabela 6).

Metodą sączenia molekularnego na kolumnie z Sephadex G-75 i G-100 oznaczano ciężar cząsteczkowy enzymu z wątroby ludzkiej, wołowej oraz nerki królika; wynosi on 22 400—23 000, zaś cząsteczkowy oznaczany metodą ultrawierowania — 21 420 (18, 58) (Tabela 7).

Optimum pH glioksalazy II wynosi 5,0—8,0 (18, 58, 60). Enzym ten jest białkiem zasadowym, a jego punkt izoelektryczny oznaczony metodą elektroogniskowania wynosi 8,35 (58, 61). Oczyszczony enzym jest białkiem niestabilnym. Może być stabilizowany przez dodatek albuminy surowicy wołu lub glicerolu (58).

Prawdopodobny mechanizm działania enzymu polega na wytworzeniu w centrum aktywnym wiązania tioestrowego pomiędzy grupą SH białka a grupą karbosylową substratu — tioestru glutationu, a następnie na przeniesieniu tej grupy acylowej na cząsteczkę wody (58) (Ryc. 6).



Ryc. 6. Przebieg reakcji katalizowanej przez glioksalazę II (wg 6)

Tabela 7

Masa cząsteczkowa gliksalazy II

Źródło enzymu	Ciężar cząsteczkowy	Metoda oznaczania	Piśmiennictwo
człowiek wątroba	22 900	sączenie Sephadex G-100	58
wół wątroba			
nerki			
świnia mózg	23 000	sączenie Sephadex G-75	18
wątroba			
nerki			
świnka wątroba	22 400	sączenie Sephadex G-100	18
morska nerki	21 420	ultrawirowanie	
mózg			
mysz wątroba	23 000	sączenie Sephadex G-75	28
nerki			
wątrobiak Morrisa 5123 D			
szczur wątroba	23 000	sączenie Sephadex G-75	28
mózg			
wątrobiak Kirkmana-Rob-			
kurczę wątroba	23 000	sączenie Sephadex G-75	28
nerki			
wątrobiak Ehrlicha			

Tabela 8

Wartości stałej Michaelisa (K_M) gliksalazy II

Substrat	Źródło enzymu	K_M (mol/l)	V_{max}	Piśmiennictwo
S-laktoilo-GSH	wątroba wołu	1,00	1,0	55
		0,50	1,0	35
S-hydroksyglutarylo-GSH	wątroba ludzka	0,25	0,45	33
S-acetylo-GSH		1,16	—	60
S-laktoilo-GSH		0,19	1,0	58
S-glicerylo-GSH		0,10	0,62	58
S-glikolilo-GSH		0,07	0,39	58
S-acetoacetylo-GSH		0,30	0,56	58
S-sukcynylo-GSH		0,20	0,29	58
S-formylo-GSH		0,15	0,38	58

Substratami gliksalazy II są acylowe pochodne glutationu. Wartości stałej Michaelisa i specyficzność substratową enzymu z wątroby wołu oraz wątroby ludzkiej przedstawia Tabela 8.

Niewątpliwie najlepszym substratem gliksalazy II jest S-laktoilglutation (33, 35, 58). Porównywano szybkość hydrolizowania różnych

S-acylowych pochodnych glutationu i wykazano, że wszystkie stereoizomery „D” są prawie dwukrotnie szybciej hydrolizowane niż odmiany „L” (35).

Inhibitory chelatujące: EDTA, EGTA i 8-hydroksychinolina nie wywierają większego wpływu na aktywność glioksalazy II. Dodatek soli, takich jak: $MgSO_4$, $MnSO_4$, $NiCl_2$, $Co(NO_3)_2$, $(CH_3COO)_2Zn$ również nie wpływa na aktywność enzymu. $NaCl$, KCl , NH_4Cl oraz fosforany (58) hamują glioksalazę II. Inhibitory grup SH powodują utratę aktywności glioksalazy II, szczególnie $HgCl_2$ (10 $\mu mol/l$ — 82% hamowania). Przypuszcza się więc, że grupy SH występują w centrum aktywnym enzymu (58). Naturalny inhibitor glioksalazy II zawarty w trzustce, zwany również antyglioksalazą jest białkiem o masie cząsteczkowej 18 500 daltonów i powoduje postępujący w czasie inkubacji zanik aktywności glioksalazy II (55).

IV. Oznaczanie aktywności enzymów systemu glioksalazy

Do pomiaru aktywności enzymów systemu glioksalazy stosowane są metody spektrofotometryczne (6, 58, 62). Najbardziej specyficzną metodą kinetyczną jest metoda opracowana przez Rackera (6) oparta na pomiarze stężenia S-laktoiloglutationu, który posiada maksimum absorpcji przy 233—238 nm, $\epsilon_{240\text{ nm}} = 3370\text{ l/mol} \cdot \text{cm}^{-1}$. Aktywność glioksalazy I mierzy się przez przyrost ekstynkcji spowodowany tworzeniem S-laktoiloglutationu, a aktywność glioksalazy II przez spadek ekstynkcji przy 240 nm spowodowany rozkładem S-laktoiloglutationu do kwasu D(-)mlekowego i glutationu.

Dawniej stosowane metody — manometryczna (8, 63, 64) i kolorymetryczna (65) mają już dziś tylko znaczenie historyczne. Zastosowanie przez Galzignę i wsp. (66) metody opartej na pomiarze przyrostu ilości wolnych grup SH do oznaczenia aktywności całego systemu enzymatycznego glioksalaz wydaje się błędem. Metoda ta w zasadzie może tylko służyć do określenia aktywności glioksalazy II; ponadto jest wysoce nieswoista.

V. Biologiczna rola glioksalaz

Mimo wielu prac poświęconych glioksalazom biologiczna rola tych enzymów nie jest jeszcze całkowicie poznana. Jako wyjaśnienie roli glioksalaz przytacza się dwie hipotezy: udział glioksalaz w procesie odtruwania tkanek z toksycznego metyloglioksalu oraz udział tych enzymów w regulacji podziałów komórkowych.

Według pierwszej z tych hipotez glioksalazy potrzebne są do detoksyfikacji tkanek z metyloglioksalu, którego „trujące” działanie wynika

z silnej elektrofilności (22, 71). Ten α -ketoaldehyd posiada dwie sprzężone nienasycone grupy C=O i w związku z tym stanowi silnie oddziaływujący akceptor elektronów. Metylogliksal wytwarza się podczas przemian biochemicznych w organizmie żywym (67—69). W *Escherichia coli*, *Pseudomonas saccharofila* i *Proteus vulgaris* substratem do jego syntezy jest fosforan dwuhydroksyacetonu, produkt szlaku glikolitycznego (70). Metylogliksal uwalniany przez te bakterie do przewodu pokarmowego przedostaje się do krwi i do wątroby przez żyłę wrotną. Detoksykacyjna funkcja gliksalazy może wyjaśnić wysoką aktywność tego enzymu w erytrocytach i w wątrobie (14).

Obecnie wiadomo, że metylogliksal w organizmach żywych powstaje z trioz (67, 72—78), z acetoctanu (79, 80), z aminoacetonu (81—84) i z aldehydu mlekowego (57, 85). Związek ten ulega przemianom: pod wpływem gliksalaz do D(-)mleczanu (1, 6), w reakcji bezpośredniego utleniania do pirogronianu (86—90), a w reakcji redukcji do aldehydu mlekowego (29, 57). Schemat przemian metylogliksalu w powiązaniu z innymi szlakami metabolicznymi przedstawili Urata i Granick (91), a szczegółowe drogi przemian tego związku zostały też omówione w artykule Koneckiej i Rytki (92).

Badania izotopowe (93) nie potwierdziły obecności wolnego metylogliksalu w materiale biologicznym, co może wynikać z wielkiej reaktywności tego α -ketoaldehydu (94). Ostatnio wykazano jednak obecność metylogliksalu związanego z białkami strukturalnymi w wątrobie wołu; izolowano go pod postacią 2,4-dwunitrofenylohydrazonu (95).

Zupełnie inne spojrzenie na rolę gliksalaz reprezentuje Szent-Györgyi. Wysunął on hipotezę, że w tkankach znajdują się dwa zasadnicze czynniki regulujące podziały komórkowe, mianowicie „retina” i „promina”. Substancją hamującą podziały komórkowe — „retiną” w myśl jego hipotezy jest metylogliksal lub inne α -ketoaldehydy, podczas gdy substancją pobudzającą podziały komórkowe przez zwolnienie hamowania — „prominą”, jest system gliksalaz (37, 96, 97, 98). Założenia teoretyczne tej hipotezy są oparte na koncepcji oddziaływań donorowo-akceptorowych związanych z istnieniem tzw. kompleksów z przeniesieniem ładunku (71, 98, 99, 100). Oddziaływania te mają odgrywać zasadniczą rolę w dziedzinie regulacji podziału komórek, różnicowania i transformacji nowotworowej. Zgodnie z hipotezą Szent-Györgyiego komórka przechodzi ze stanu normalnego w nowotworowy z chwilą zaburzenia wewnętrznego uporządkowania pod wpływem różnych niespecyficznych czynników. Komórka taka jest niezdolna do inaktywacji swojej gliksalazy, która rozkłada ketoaldehydy utrzymujące stan spoczynku komórkowego. Stan ten cechuje się między innymi występowaniem białek w postaci rodnikowej, powstającej na skutek połączenia się białek z metylogliksalem. Katalizatorem reakcji przeniesienia elektronów z azotu grup aminowych białek na silnie elektrofilne grupy ketonowe metylogliksalu

są grupy SH glutationu. Natomiast białka komórek nowotworowych nie są zdolne do przejścia w stan rodnikowy (100). Hipoteza ta wydaje się być wysoce spekulatywna, jakkolwiek jest częściowo poparta dowodami chemicznymi (71, 98).

Wyrazem rosnącego w ostatnich latach zainteresowania rolą glioksalaz w procesie proliferacji mogą być liczne prace z dziedziny genetyki, dotyczące ustalenia „locus” genu glioksalazy I i poszukiwanie różnych wariantów genetycznych tego enzymu (101—103). „Locus” genu glioksalazy I u człowieka znaleziono na krótkim ramieniu chromosomu 6 (104—106) i stwierdzono, że glioksalaza I ma trzy fenotypy.

VI. Glioksalazy w nowotworach

Ukazało się wiele prac dotyczących aktywności glioksalaz w tkankach nowotworowych i powiązania tych enzymów z procesami nowotworzenia i proliferacji.

Aktywność glioksalazy w tkankach nowotworowych badano znacznie wcześniej zanim stwierdzono, że glioksalaza jest w rzeczywistości systemem składającym się z dwóch enzymów. Wyniki były bardzo różnorodne, w większości wskazujące na brak różnic w aktywności enzymu w porównaniu z tkankami normalnymi. Przeglądowe piśmiennictwo na ten temat podane jest w pracach *Cohen*a (11, 107). Badania wykonane w późniejszym okresie wykazały niższą aktywność glioksalaz, a zwłaszcza glioksalazy II w tkankach i komórkach nowotworowych w porównaniu z wartościami mierzonymi dla enzymu tkanek normalnych (10, 108). Charakter zaobserwowanych zmian aktywności glioksalaz w wątrobie z rozwijającym się nowotworem wywołanym podawaniem dwumetyloaminoazobenzenu pozwala przypuszczać, że związek rakotwórczy w pierwszym okresie może aktywować glioksalazę I, indukować nowotwór, a następnie powoduje spadek aktywności glioksalazy I i II w tkance, w której się rozwija (109). Obserwuje się również spadek aktywności glioksalaz w wątrobie myszy z rozwijającym się poza tym narządem mięsakiem limfatycznym, mięsakiem-180 i białaczką 1210 (110—112). To obniżenie aktywności glioksalaz mogłoby prowadzić do zwiększenia stężenia inhibitora proliferacji — metyloglioksalu, a tym samym być wyrazem obrony organizmu przed rozwijającym się nowotworem (111). Ewentualny wpływ poprzez toksohormon na aktywność glioksalaz w wątrobach myszy zdają się potwierdzać wyniki uzyskane przez *Winter* i wsp. (113).

Strzinek i wsp. (112) stwierdzili, że glioksalaza I z wątroby myszy z mięsakiem limfatycznym miała większą masę cząsteczkową (67 000 daltonów) niż enzym z wątroby zdrowej myszy. Wydawało się zatem możliwe, że w niektórych rodzajach nowotworów zmienia się wielkość cząsteczki glioksalazy I. Badania innych nowotworów (wątrobiak *Morrisa*

5123 D, 7777, Kirkmana-Robbinsa, guz Guerin, mięsak 180, białaczka 1210, rak Ehrlicha, mięsak Yoshidy, czerniak melanotyczny i amelanotyczny) nie potwierdziły jednak tego przypuszczenia (28).

Według Szent-Györgyiego selektywne zahamowanie gliksalazy I może doprowadzić do zwiększenia stężenia metylogliksalu w tkankach, a w konsekwencji do kontrolowanego hamowania podziałów komórkowych. Możliwość wpływu na ten proces, przez zahamowanie aktywności gliksalazy I za pomocą analogów substratu — glutationu, wydaje się być bardzo prawdopodobna (32, 114). Hall i wsp. (115) syntetyzowali serię estrów α -hydroksytiolowych jako inhibitorów gliksalazy I i potencjalnych czynników przeciwnowotworowych. Okazały się one inhibitorami kompetencyjnymi gliksalazy I, lecz jako czynnik przeciwbiałaczkowy nie wywierały istotnego działania, prawdopodobnie na skutek szybkiej hydrolizy.

Metylogliksal podany zwierzętom z nowotworami doświadczalnymi wykazuje właściwości przeciwnowotworowe (64, 116). Obniżenie aktywności gliksalaz w nowotworach może być przyczyną wyższej ich wrażliwości na cytostatyczne działanie metylogliksalu (64).

Zaakceptowano 29.2.1980

PIŚMIENICTWO

1. Dakin H. D., Dudley H. W., (1913), *J. Biol. Chem.*, **14**, 155—162.
2. Neuberg C., (1913), *Biochem. Z.*, **49**, 502—506.
3. Lohmann K., (1932), *Biochem. Z.*, **254**, 332—354.
4. Knox W. E., (1960) w *The Enzymes*, wydanie drugie, red. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., New York, N.Y., Academic Press str. 253.
5. Platt M. E., Schroeder E. F., (1934), *J. Biol. Chem.*, **104**, 281—285.
6. Racker E. J., (1951), *J. Biol. Chem.*, **190**, 685—696.
7. Dakin H. D., Dudley H. W., (1913), *J. Biol. Chem.*, **15**, 463—474.
8. Hopkins F. G., Morgan E. J., (1945), *Biochem. J.*, **39**, 320—324.
9. Hopkins F. G., Morgan E. J., (1948), *Biochem. J.*, **42**, 23—27.
10. Jerzykowski T., Winter R., Matuszewski W., Piskorska D., (1978), *Int. J. Biochem.*, **9**, 853—860.
11. Cohen P., (1945), *Cancer Res.*, **5**, 626—631.
12. McKinney G. R., (1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 246—248.
13. Davis K. A., Williams G. R., (1969), *Can. J. Biochem.*, **47**, 553—556.
14. Aronsson A. Ch., Mannervik B., (1977), *Biochem. J.*, **165**, 503—509.
15. Han L-P. B., Davison L. M., Vander Jagt D. L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **445**, 486—499.
16. Kester M. V., Norton S. J., (1975), *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 212—221.
17. Oray B., Norton S. J., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 203—209.
18. Jerzykowski T., Matuszewski W., Winter R., (1968), *FEBS Letters*, **1**, 159—162.
19. Uotila L., Koivusalo M., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **52**, 493—503.
20. Strzinek R. A., Norton S. J., (1972), *Texas J. Science*, **24**, 3—11.
21. Marmstal E., Mannervik B., (1978), *FEBS Letters*, **85**, 275—278.
22. Mannervik B., Lindström L., Bártfai T., (1972), *Eur. J. Biochem.*, **29**, 276—281.

23. Marmstal E., Mannervik B., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **566**, 362—370.
24. Aronsson A. Ch., Tibbelin G., Mannervik B., (1979), *Anal. Biochem.*, **92**, 390—393.
25. Ekwall K., Linbström L., Mannervik B., (1971), Abstr. Commun. 7th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc. 107.
26. Koivusalo H., Uotila L., (1971), 7th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc. 117.
27. Winter R., Jerzykowski T., Matuszewski W., Tarnawski R., (1972), *Streszczenia prac X Zjazdu PT. Bioch.*, 114—115.
28. Piskorska D., (1976), *Rozprawa doktorska. Śl. AM. Katowice.*
29. Willets A. J., Turner J. M., (1970), *Biochim. Biophys. Acta*, **222**, 668—670.
30. Vander Jagt D. L., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 1155—1158.
31. Vander Jagt D. L., Daub E., Krohn J. A., Han L-P. B., (1975), *Biochemistry*, **14**, 3669—3675.
32. Vince R., Wadd W. B., (1969), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 593—599.
33. Jerzykowski T., Winter R., Matuszewski W., (1973), *Biochem. J.*, **135**, 713—719.
34. Vander Jagt D. L., Han L-P. B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 5161—5167.
35. Wieland T., Pfeleiderer G., Lau H. H., (1956), *Biochem. Z.*, **327**, 393—406.
36. Weaver R. H., Lardy H. A., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 313—317.
37. Sparkes B. G., Kenny C. P., (1969), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 920—922.
38. Rose J. A., (1957), *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 214—215.
39. Franzen W., (1956), *Chem. Ber.*, **89**, 2154—2158.
40. Kermack W. O., Matheson N. A., (1957), *Biochem. J.*, **65**, 48—58.
41. Cliffe E. E., Waley S. C., (1961), *Biochem. J.*, **79**, 475—481.
42. Vander Jagt D. L., Han L-P. B., Lehman Ch. H., (1972), *Biochemistry*, **11**, 3735—3740.
43. Hall S. S., Doweiko H., Jordan F., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7460—7461.
44. Bártfai T., Ekwall K., Mannervik B., (1973), *Biochemistry*, **12**, 387—391.
45. Han L-P. B., Schimandle Ch. M., Davison L. M., Vander Jagt D. L., (1977), *Biochemistry*, **16**, 5478—5484.
46. Mannervik B., Bártfai T., Góna-Hall B., (1974), *J. Biol. Chem.*, **219**, 901—903.
47. Davis K. A., Williams G. R., (1966), *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 393—395.
48. Aronsson A. Ch., Marmstal E., Mannervik B., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1235—1240.
49. Ekwall K., Mannervik B., (1970), *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 128—132.
50. Mannervik B., Marmstal E., Ekwall K., Góna-Hall B., (1975), *Eur. J. Biochem.*, **53**, 327—333.
51. Kester M. V., Reese J. A., Norton S. J., (1973), *J. Med. Chem.*, **17**, 413—416.
52. Lyon F. A., Vince R., (1976), *J. Med. Chem.*, **20**, 77—80.
53. Girsavicius J. O., (1933), *Biochem. Z.*, **260**, 278—312.
54. Revell J. P., Ball E. G., (1959), *J. Biol. Chem.*, **234**, 577—582.

55. Winter R., (1968), *Rozprawa doktorska*, AM. Poznań.
56. Cliffe E. E., Waley B. C., (1959), *Biochem. J.*, **73**, 25p.
57. Ting S. M., Miller O. N., Sellinger D. Z., (1965), *Biochem. Biophys. Acta*, **97**, 407—415.
58. Uotila L., (1973), *Biochemistry*, **12**, 3944—3951.
59. Drummond G. J., Stern J. R., (1961), *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 323—328.
60. Wieland T., Sandmann B., Pfleiderer G., (1956), *Biochem. Z.*, **328**, 239—244.
61. Jerzykowski T., Piskorska D., Ostrowska M., (1976), *J. Chromatography*, **116**, 225—229.
62. Alexander N. M., Boyer J. L., (1971), *Anal. Biochem.*, **41**, 29—38.
63. Crook M., Law K., (1952), *Biochem. J.*, **52**, 429—439.
64. Jerzykowski T., Matuszewski W., Otrzonsek N., Winter R., (1974), *Neoplasma*, **17**, 25—35.
65. McKinney G. R., Gocke D. J., (1956), *J. Biol. Chem.*, **216**, 605—610.
66. Galzigna L., Nyandieka H. S., Burlina A., (1973), *Experientia*, **30**, 317—318.
67. Meyer R., (1953), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 1395—1400.
68. Racker E. J., (1954), *Glutathione, a Symposium*, New York, Academic Press, 165—183.
69. Neifakh S. A., Zdrodovskaia E. P., (1961), V. Intern. Congress of Biochem. Moscow Symposium IV, Preprint No 10.
70. Tsai P-K. M., Gracy R. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, **251**, 364—367.
71. Szent-Györgyi A., (1973), *Bioenergetics*, **4**, 533—562.
72. Riddle V., Lorenz F. W., (1968), *J. Biol. Chem.*, **243**, 2718—2723.
73. Salem H. M., (1961), *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **96**, 10—13.
74. Salem H. M., Crook E. M., (1950), *Biochem. J.*, **46**, XXXVii.
75. Hopper D. J., Cooper R. A., (1971), *FEBS Letters*, **13**, 213—216.
76. Youan P. M., Gracy R. W., (1977), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 1—6.
77. Cooper R. A., (1974), *Eur. J. Biochem.*, **44**, 81—86.
78. Leoncini G., Maresca M., Bonsignore A., (1977), *Ital. J. Biochem.*, **26**, 467—472.
79. Milligan L. P., Baldwin R. L., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 1095—1101.
80. Vidigal C. C., Cilento G., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 184—190.
81. Elliott W. H., (1959), *Nature*, **183**, 1051—1052.
82. Urata G., Granick S., (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **4**, 96—107.
83. Green M. L., Lewis J. B., (1968), *Biochem. J.*, **106**, 267—273.
84. Morris J. G., (1969), *Biochem. J.*, **111**, 251—253.
85. van Eys J., (1961), *J. Biol. Chem.*, **236**, 1531—1533.
86. Monder C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 573—575.
87. Monder C., (1967), *J. Biol. Chem.*, **242**, 4603—4609.
88. Dunkerton J., James S. P., (1975), *Biochem. J.*, **149**, 609—617.
89. Dunkerton J., James S. P., (1976), *Biochem. J.*, **153**, 503—504.
90. Vander Jagt D. L., Davison L. M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **484**, 260—267.
91. Urata G., Granick S., (1963), *J. Biol. Chem.*, **238**, 811—820.
92. Konecka A. M., Rytka J., (1970), *Post. Biochem.*, **16**, 513—525.
93. Walten D. J., McLean S. A., (1971), *Anal. Biochem.*, **43**, 472—480.
94. Jerzykowski T., Matuszewski W., Tarnawski R., Winter R., Herman Z., Sokoła A., (1975), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **23**, 549—560.

95. Fodor G., Mujumdar R., Szent-Györgyi A., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4317—4319.
96. Szent-Györgyi A., Hegeli A., McLaughlin J. A., (1962), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **48**, 1439—1442.
97. Szent-Györgyi A., Együd L. D., McLaughlin J. A., (1967), *Science*, **155**, 539—546.
98. Szent-Györgyi A., (1973), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **8**, 117—127.
99. Szent-Györgyi A., (1968), *Science*, **161**, 988—990.
100. Szent-Györgyi A., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2844—2847.
101. Kömpf J., Bissbort S., Gussmann S., Ritter H., (1975), *Hummangenetik* **27**, 141—143.
102. Meera Khan P., Doppert B. A., (1976), *Hummangenetik*, **34**, 53—56.
103. Bagster I. A., Parr C. W., (1976), *J. Physiol. (London)*, **256**, 56P—57P.
104. McBrean P., Engel E., Croce C. M., (1977), *Cytogenet. Cell Genet.* **19**, 208—214.
105. Meera Khan P., Volkens U. S., Doppert B. A., Bijnen A. B., Schreuder J., van Rood J. J., (1976), *Cytogenet. Cell Genet.* **16**, 328—330.
106. Pretorius A. M., Scholz S., Kuntz B., Albert E. D., (1976), *Ann. Med. Interne (Paris)*, **127**, 759—761.
107. Cohen P. P., Sober E. K., (1945), *Cancer Res.*, **5**, 631—633.
108. Jerzykowski T., Winter R., Matuszewski W., Szczurek Z., (1975), *Experientia*, **31**, 32—33.
109. Jerzykowski T., Matuszewski W., Winter R., (1974), *Neoplasma*, **21**, 679—683.
110. Strzinek R. A., Vela G. R., Scholes V. E., Norton S. J., (1970), *Cancer Res.* **30**, 334—337.
111. Winter R., Piskorska D., Jerzykowski T., (1978), *Neoplasma*, **25**, 465—470.
112. Strzinek R. A., Scholes V. E., Norton S. J., (1972), *Cancer Res.*, **32**, 2359—2364.
113. Winter R., Piskorska D., Grabowska M., Jerzykowski T., *Pat. Pol.*, (1980) **31**.
114. Vince R., Daluge S., Wadd W. B., (1971), *J. Med. Chem.*, **14**, 402—406.
115. Hall S. S., Dowejko L. M., Dowejko A. M., Zilenowski J. S., (1977), *J. Med. Chem.*, **20**, 1239—1242.
116. Apple M. A., Greenberg D. M., (1967), *Cancer Chemother. Rep.*, **51**, 455—464.

BARBARA RZESZOTARSKA ^{*)}, IRENA KOZŁOWSKA ^{**)}

Struktura i funkcja luliberyny

Structure and Function of Luliberin

Spis treści

- I. Wstęp
- II. Neurosekrecja luliberyny
- III. Konformacja luliberyny
- IV. Rola poszczególnych reszt aminokwasowych luliberyny w uwalnianiu gonadotropin
- IV-1. Kwas piroglutaminowy¹ ^{***)}
- IV-2. Histrydina²
- IV-3. Tryptofan³
- IV-4. Seryna⁴
- IV-5. Tyrozyna⁵
- IV-6. Glicyna⁶
- IV-7. Leucyna⁷

^{*)} prof. dr hab.; ^{**)} mgr, Instytut Chemii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, ul. Oleska 48, 45-052 Opole.

^{***)} Wskaźnik liczbowy po nazwie aminokwasu oznacza pozycję aminokwasu w łańcuchu peptydowym hormonu lub jego analogu.

Wykaz stosowanych skrótów: LHRH — luliberyna; LH — hormon luteinizujący; FSH — hormon dojrzewania pęcherzyków; Do skrótego oznaczania analogów luliberyny stosowano reguły słownictwa zalecane przez Komisję Słownictwa Biochemicznego ([1974], Polskie Słownictwo Biochemiczne, red. Morawiecki A., str. 15—28, 33—37, PWN, Warszawa) oraz reguły słownictwa proponowane przez Wünscha (Wünsch E., [1974], Methoden der organischen Chemie [Houben-Weyl]). Synthese von Peptiden tom XV/1, str. 1—27; George Thieme Verlag, Stuttgart);

□ Glu — kwas L-piroglutaminowy; Nva — norwalina; Nic⁺ — kation nikotynamidyniowy; Aka — kwas 6-aminokapronowy; 4-Pyr — kwas 2-pirolidono-4-karboksyłowy; Cpc — kwas cyklopentanokarboksyłowy; Hyp — L-hydroksyprolina; For — formyl; Ac — acetyl; PrCO — propionyl; Me — metyl; Sar — sarkozyna; Ihi — jodo-L-histrydina; Pir — pirazolil; Bal — β -(3-benzo/b/-tienylo)-L-alanina; Naf — naftyl; tBu — tert-butyl; Ity — 3'-jodo-L-tyrozyna; Dit — 3',5'-dwujodo-L-tyrozyna; AK — reszta aminokwasowa; Nle — L-norleucyna; BOC — tert-butyloksykarbonyl; Har — L-homoarginina; Nar — L-norarginina; Cyt — L-cytrulina; Orn — L-ornityna; Bz — benzoil; BZL — benzyl; Thi — β -2-tienyloalanina; Agly-(aza-1) — glicyna.

- IV-8. Arginina⁸
- IV-9. Prolina⁹
- IV-10. Amid glicyny¹⁰
- V. Superagonistyczne analogi luliberyny
- VI. Inhibitory luliberyny
- VII. Uwagi końcowe

Contents

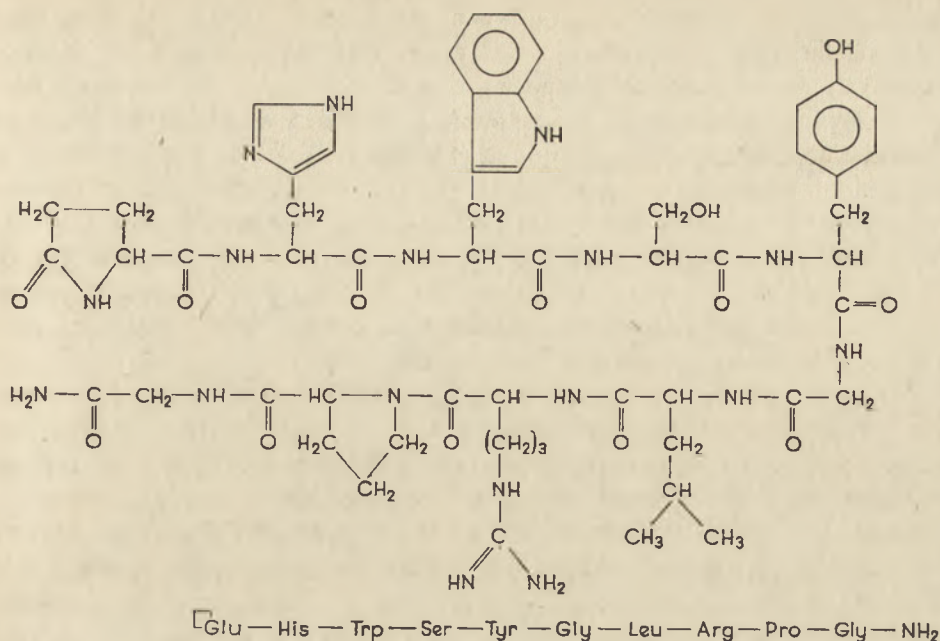
- I. Introduction
- II. Hypothalamic secretion of luliberin
- III. Conformation of luliberin
- IV. Role of luliberin amino acid residues in releasing of gonadotropins
- IV-1. Pyroglutamic acid^{1 ***}
- IV-2. Histidine²
- IV-3. Tryptophan³
- IV-4. Serine⁴
- IV-5. Tyrosine⁵
- IV-6. Glycine⁶
- IV-7. Leucine⁷
- IV-8. Arginine⁸
- IV-9. Proline⁹
- IV-10. Glycine amide¹⁰
- V. Superagonistic analogues of luliberin
- VI. Inhibitors of luliberin
- VII. Concluding remarks

I. Wstęp

Luliberyna (GnRH lub LHRH/FSHRH lub LHRH), jeden z hormonów podwzgórza, jest czynnikiem stymulującym uwalnianie gonadotropin z przedniego płata przysadki: hormonu luteinizującego (LH) i hormonu dojrzewania pęcherzyków (FSH). Wyizolowano ją na początku lat siedemdziesiątych z podwzgórzy różnych zwierząt: świń (1—4), owiec (5) i bydła rogatego (3, 6). Podobnie jak i inne hormony podwzgórza jest ona peptydem, a jej budowę pierwszorzędową (3, 6—9) przedstawia rycina 1.

Czynnik uwalniający gonadotropiny najprawdopodobniej nie jest gatunkowo specyficzny, gdyż struktura hormonu otrzymanego z różnych gatunków jest jednakowa. Ponadto, zarówno hormon izolowany z jednego gatunku, jak i syntetyczny uwalniają gonadotropiny u wszystkich badanych gatunków zwierząt (10).

Nie rozstrzygnięto do tej pory czy fizjologiczną rolą luliberyny jest uwalnianie obydwu gonadotropin, czy tylko stymulacja uwalniania LH, a zdolność uwalniania FSH — jedynie jej dodatkową właściwością. Z jednej bowiem strony stwierdzono, że u zwierząt wielu gatunków hormon stymuluje owulację, co przyjmuje się za dowód, że uwalnia on FSH



Ryc. 1. Struktura pierwszorzędowa luliberyny (3, 6—9)

w ilości fizjologicznie dostatecznej do dojrzewania pęcherzyka Graafa (10). Z drugiej zaś strony jest wiele faktów sugerujących istnienie dwóch oddzielnych hormonów: jednego uwalniającego tylko LH i drugiego uwalniającego tylko FSH. I tak, izolowano z podwzgórzy świńskich i częściowo oczyszczono frakcję o znacznie większej od luliberyny zdolności uwalniania FSH (11, 12). Izolowano także frakcje immunologicznie i biologicznie identyczne z luliberyną, jednak o innej charakterystyce chromatograficznej (13). Obserwowano sekrecję hormonu uwalniającego tylko FSH po selektywnym uszkodzeniu niektórych regionów podwzgórza lub selektywnym wprowadzeniu do pewnych jego obszarów inhibitorów syntezy białek (14, 15). Uważa się, że istnienie jednego tylko czynnika uwalniającego obydwie gonadotropiny nie tłumaczy patologicznych dysproporcji poziomu LH i FSH, które obserwuje się nieraz u ludzi (12). Otrzymano syntetyczne analogi luliberyny o zdecydowanie różnym od niej stosunku uwalnianych gonadotropin LH/FSH (16, 17).

Luliberyna kontroluje wiele procesów fizjologicznych takich jak: dojrzewanie płciowe, cykl menstruacyjny, spermatogenezę oraz klimakterium. Celowe więc było uzyskanie obrazu molekularnego mechanizmu działania hormonu. Możliwości takie stworzyła przede wszystkim chemiczna synteza luliberyny i jej analogów. Obecnie w dużym stopniu rozpoznano już rolę poszczególnych reszt aminokwasowych w uwalnianiu gonadotropin. Z kolei, dzięki temu, stało się możliwe otrzymanie analogów o silnym działaniu agonistycznym lub antagonistycznym, o właści-

wościach pozwalających na praktyczne stosowanie związków. Sam hormon macierzysty wykorzystuje się przede wszystkim w testach diagnostycznych pozwalających w znacznej liczbie przypadków odróżnić nieprawidłowości występujące na poziomie podwzgórzowo-przysadkowym od nieprawidłowości na poziomie gonad (18, 19). Luliberynę i jej agonistyczne analogi stosuje się także w terapii, np. w przypadku braku menstruacji u kobiet lub dysfunkcji podwzgórzowo-przysadkowej u mężczyzn (20). W dalszym ciągu trwają kliniczne badania hormonu i jego analogów do celów diagnostycznych, terapeutycznych i antykoncepcyjnych. W weterynarii bada się możliwość stosowania luliberyny i jej agonistów do reprodukcji zwierząt domowych.

Na temat zależności między strukturą i funkcją luliberyny jest wiele prac przeglądowych (najważniejsze z nich to: 16, 21—30). Ujmują one jednak problem fragmentarycznie lub jednostronnie, albo w formie abstraktowej, i nie są wolne też od sprzeczności. Celem niniejszego opracowania jest próba przedstawienia możliwie spójnego i pełnego obrazu zależności między strukturą i funkcją luliberyny, ze szczególnym uwzględnieniem molekularnego kontaktu hormonu z receptorem. W artykule przede wszystkim omówiono obecny stan wiedzy o biologicznie aktywnej konformacji luliberyny oraz rolę jej poszczególnych reszt aminokwasowych w uwalnianiu gonadotropin. Następnie scharakteryzowano cechy struktury i właściwości biologiczne superagonistycznych i superantagonistycznych analogów hormonu z punktu widzenia ich praktycznego wykorzystania. Na zakończenie przedstawiono hipotetyczny mechanizm oddziaływania luliberyny i jej aktywnych analogów z receptorem.

II. Neurosekrecja luliberyny

Badanie procesu neurosekrecji hormonów podwzgórza jest trudne ze względu na fakt występowania tych związków w niezwykle małych ilościach i w różnych obszarach podwzgórza (31).

W ostatnich latach przyjmuje się, że luliberyna powstaje przede wszystkim w trzech regionach podwzgórza: obszarze nadwzrokowym, w obszarze łukowatym i w obszarze przykomorowym (14, 15, 32—34). Jednakże, według niektórych autorów (14), w dwóch pierwszych obszarach ma miejsce synteza hormonu uwalniającego tylko LH, a w trzecim natomiast — hormonu uwalniającego tylko FSH. W obszarze nadwzrokowym luliberynę produkują komórki o długich aksonach, pobudzanych estrogenami, powodującymi przedowulacyjny wzrost LHRH. W obszarze łukowatym natomiast stwierdzono występowanie hormonu w znacznie mniejszej koncentracji niż w obszarze pierwszym, w komórkach o krótkich aksonach, hamowanych estrogenami. Magazynem luliberyny są ziar-

nistości wydzielnicze w zakończeniach aksonów wchodzących do środkowej wypukłości w bliskim sąsiedztwie naczyń wrotnych (15).

Ponadto na uwagę zasługuje fakt, że luliberynę znaleziono w zakończeniach nerwowych organum *vasculosa lamina terminalis*, zbudowanego z wyspecjalizowanych komórek ependymalnych. Sugeruje to, że obok klasycznej drogi transportu hormonu do środkowej wypukłości przez akson, istnieje druga droga — przez płyn trzeciej komory do jej dna i stąd do tanycytów, których wypustki wchodzą do zewnętrznej warstwy środkowej wypukłości (15).

Ze środkowej wypukłości hormon przemieszcza się do przedniego płata przysadki przez pierwotny kapilarny splot żył wrotnych (15).

W bliskim sąsiedztwie zakończeń aksonów wydzielniczych luliberyny znajdują się zakończenia aksonów noradrenergicznych i dopaminoergicznych. Ze względu na ten fakt wiele uwagi poświęca się domniemanej roli przekaźników synaptycznych w kontroli uwalniania hormonu (14, 15, 35—38). I tak, noradrenalina w niektórych obszarach podwzgórza najprawdopodobniej pobudza uwalnianie luliberyny, ponieważ zahamowanie jej syntezy lub zablokowanie α -adrenergicznych receptorów w tych obszarach hamuje wydzielanie hormonu. Występowanie synaps noradrenergicznych stwierdzono w przedniej części podwzgórza i w obszarze nadwzrokowym. Możliwe jest, że przedowulacyjny wzrost LH następuje po zwiększonym impulsie biegnącym wzdłuż noradrenergicznej synapsy w jednym lub w obydwu tych obszarach. Natomiast sygnał ujemny, o wstrzymaniu uwalniania gonadotropin, odbierany jest bliżej centralnej części podwzgórza (14). Pobudzenie wydzielania luliberyny *in vitro* obserwowano także pod wpływem innych synaptycznych przekaźników: dopaminy (38) i acetylocholiny (14). Ich rola nie jest jednak jasna, gdyż np. pod wpływem dopaminy odnotowano również *in vitro* hamowanie uwalniania hormonu (37).

III. Konformacja luliberyny

W luliberynie wszystkie wiązania peptydowe, włącznie z Arg-Pro, mają konfigurację *trans* (39—42). Hormon jest liniowym deka-peptydem, dla którego liczba stopni swobody konformacyjnej w roztworze jest potencjalnie bardzo duża. Z większości badań fizykochemicznych wynika, że jego cząsteczka w obojętnym roztworze wodnym w temperaturze 20°C nie wykazuje uporządkowania strukturalnego (40—48). W luliberynie ruchliwy jest zarówno łańcuch peptydowy, jak i boczne rodniki aminokwasów alifatycznych (40—44). Zgodnie z faktem dużej swobody konformacyjnej cząsteczki luliberyny w roztworze wodnym nie stwierdza się oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Brak zależności temperaturowej widma H¹NMR wyklucza silne wiązania wodorowe (41). Od-

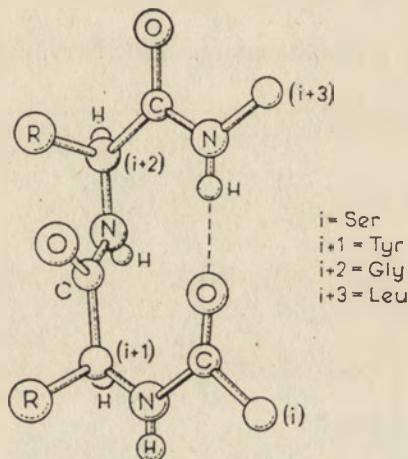
działywania między pierścieniami aromatycznymi histydyny, tyrozyny i tryptofanu, o ile są, to również niezwykle słabe, ponieważ przesunięcia chemiczne protonów aromatycznych są typowe (41). W peptydzie brak także wzajemnych oddziaływań elektrostatycznych między ugrupowaniem imidazolowym, fenolowym i guanidynowym, czego dowodzą normalne wartości pKa tych grup (46). Podobną swobodę konformacyjną w roztworze jak luliberyna mają jej analogi zarówno aktywne, jak i nieaktywne (44, 46). Stan nieuporządkowania strukturalnego hormonu i jego hiper- lub hipoaktywnych analogów wskazuje, że czynność biologiczna nie jest determinowana konformacją uprzywilejowaną w roztworze wodnym (44, 46). Tak więc konformacja aktywna jest dopiero wyselekcjonowana lub wyidukowana z populacji konformerów przez receptor i/lub jego środowisko.

Jedno z podejść do uzyskania informacji o konformacji aktywnej luliberyny polega na indukowaniu bardziej uporządkowanych struktur przez warunki eksperymentalne, takie jak: pH, temperatura czy obecność rozpuszczalników organicznych. Według niektórych autorów, już w roztworach wodnych wraz ze wzrostem pH do 11 lub ze wzrostem temperatury do 36°C obserwuje się wzrost uporządkowania cząsteczki luliberyny. W pierwszym przypadku tłumaczy się to jonizacją grupy fenolowej, sprzyjającą zbliżeniu aromatycznych pierścieni reszty tyrozylowej i tryptofylowej, a w drugim — spadkiem sił solwatacji, co ułatwia oddziaływania hydrofobowe (47). Inni autorzy (46), zjawiska porządkowania cząsteczki hormonu pod wpływem pH i temperatury nie obserwowali. Istnieje natomiast zgodność poglądu co do wzrostu uporządkowania luliberyny pod wpływem rozpuszczalników ograniczających możliwość zmian konformacyjnych w peptydzie, np. trójfluoroetanolu lub sześćfluoroizopropanolu, które wypierając cząsteczki wody z mikrootoczenia hormonu sprzyjają tworzeniu wiązań wodorowych wewnątrzcząsteczkowych. W tych warunkach przede wszystkim stwierdzano w środkowym rejonie cząsteczki luliberyny fragment struktury β (46—48). Ponadto, według niektórych autorów (47), w rejonie N-końca peptydu można zaobserwować strukturę typu α -heliks.

Sugeruje się, że konformacja aktywna cząsteczki luliberyny jest podobna do litery U, tj. N-koniec peptydu znajduje się w bliskim sąsiedztwie C-końca (49). Taki kształt miały najniższej energetyczne konformery hormonu obliczone na drodze minimalizacji energii (26, 27, 50). Zdaniem M o m a n y' e g o (26, 27), jeden z najniższej energetycznych konformerów luliberyny (Ryc. 3A) powinien być biologicznie aktywny ze względu na podobieństwo do najniższej energetycznego konformera aktywnego cztero-peptydu \square Glu—Tyr—Arg—Trp—NH₂ (Ryc. 3B). Również dane eksperymentalne z modyfikacji chemicznych hormonu wskazują na możliwość występowania w roztworze wodnym cząsteczek luliberyny w kształcie litery U i aktywność tej konformacji. W [Nva(Nic⁺Cl⁻)⁰]LHRH

stwierdzono występowanie wewnątrzcząsteczkowego kompleksu z przeniesieniem ładunku między zmodyfikowaną resztą aminokwasową a tryptofylową (51, 52). Dzięki wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji dez-NH_2^{10} - $[\beta\text{-Ala}^i, \text{D-Ala}^j]\text{LHRH-OH}$ i dez-NH_2^{10} - $[\text{Aka}^i, \text{D-Ala}^j]\text{LHRH-OH}$, analogów nieaktywnych w formie liniowej, uzyskano analogi aktywne (53). Też o możliwości przybrania przez cząsteczkę hormonu kształtu litery U zdaje się także popierać pseudosymetria cząsteczki, mianowicie podobieństwo aminokwasów jednego ramienia litery U: od $\square\text{Glu}^1$ do Ser^4 , do aminokwasów drugiego ramienia: od Gly^6 do Pro^9 , po zgrupowaniu ich w pary: $\square\text{Glu}^1\text{—Pro}^9$, $\text{His}^2\text{—Arg}^8$, $\text{Trp}^3\text{—Leu}^7$ i $\text{Ser}^4\text{—Gly}^6$. Wymiana aminokwasu w danej parze na podobny daje analogi aktywne, a na niepodobny — analogi nieaktywne (54).

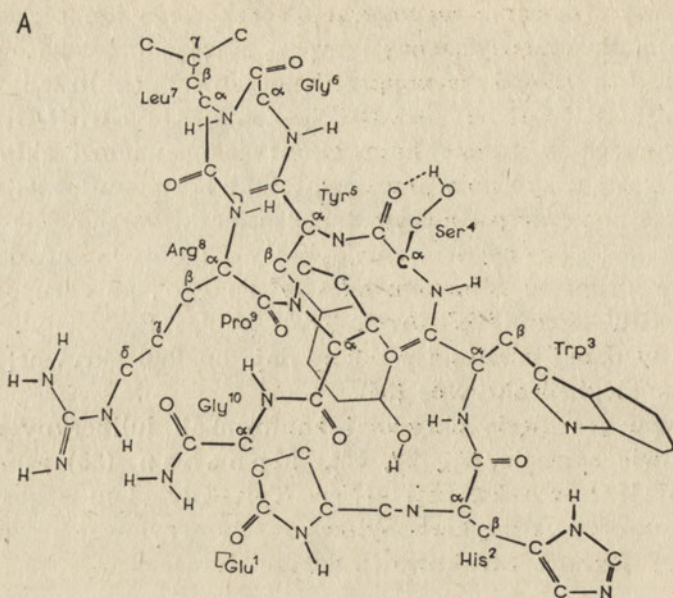
Co do typu przegięcia aktywnej konformacji luliberyny są przede wszystkim dwie sugestie (26, 27, 55). *M o n a h a n* (55) zaproponował tzw. β -zwój II^{*)} w sekwencji —Ser—Tyr—Gly—Leu— z wiązaniem wodorowym między grupą karbonylową reszty serylowej a azotem reszty leucylowej (Ryc. 2). Struktura ta dobrze tłumaczy wysoką aktywność



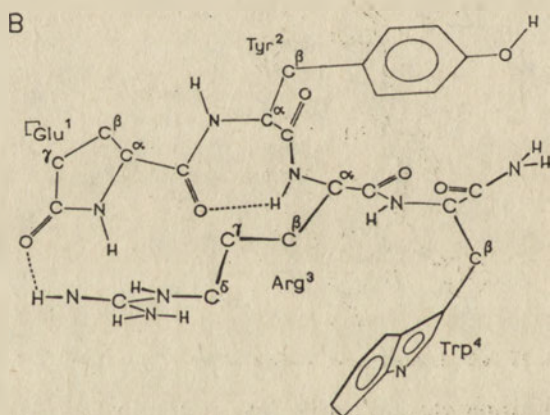
Ryc. 2. β -zwój II we fragmencie —Ser—Tyr—Gly—Leu— luliberyny (55)

analogów z D -aminokwasami⁶. Nie jest natomiast w jej świetle zrozumiała — mimo wyższej odporności na degradację enzymatyczną (59) — równorzędna z $[\text{D-Ala}^6]\text{LHRH}$ aktywność $[\text{D-Ala}^6]\text{N}^7\text{—Me—LHRH}$, analogu, w którym sugerowane wiązanie wodorowe nie może się utworzyć (60). *M o m a n y* (26, 27) (Ryc. 3A) zaproponował w luliberynie inne przegięcie, a mianowicie β -zwój w sekwencji —Tyr—Gly—Leu—

^{*)} β -zwojem nazwano fragment struktury białkowej o dziesięciocłonowym pierścieniu z wiązaniem wodorowym między aminokwasem „i” a „i+3”, gdzie w pozycji „i+2” jest reszta glicylowa. β -zwój I różni się od β -zwoju II położeniem wiązania CO—NH między aminokwasem „i+1” a „i+2” (56, 57). β -zwój II stabilizowany jest przez zamianę w pozycji „i+2” reszty glicylowej na resztę α -amino-kwasową (58).



Ryc. 3. A. Aktywna konformacja lutealiberyny (26, 27)



Ryc. 3. B. Aktywna konformacja Glu—Tyr—Arg—Trp—NH₂ (26, 27)

—Arg—, tzw. zmodyfikowany, gdyż do jego utworzenia nie jest konieczne wiązanie wodorowe między aminokwasem „i” a „i+3” oraz reszta glicylowa w pozycji „i+2”. Dlatego N—metylowanie reszty leucylowej nie powinno przeszkadzać w przyjęciu przez analog konformacji aktywnej naturalnego hormonu, jak i N—metylowanie reszty arginyłowej nie powinno wpłynąć na czynność biologiczną. W modelu M o m a n y’ego ułożenie pierścieni reszt aromatycznych wyklucza oddziaływania między nimi. Korekta tego modelu, jak i wiele badań eksperymentalnych, pro-

wadzi jednak do wniosku, że wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania między pierścieniami aromatycznymi wydają się ważnym czynnikiem stabilizującym aktywną konformację hormonu (50, 61—66).

IV. Rola poszczególnych reszt aminokwasowych luliberyny w uwalnianiu gonadotropin

IV-1. Kwas piroglutaminowy¹

Dez- \square Glu¹-LHRH jest nieaktywny i nie stymuluje również tworzenia cyklicznego adenozyonomonofosforanu (67). Reszta piroglutaminowa bierze więc udział w mechanizmie efektorowym. Zamiana kwasu piroglutaminowego na homologiczny sześciocłonowy kwas piroaminoadypinowy daje [\square Ad¹]LHRH o aktywności 12,5% aktywności naturalnego hormonu (68). Analogi z pięciocłonowymi pierścieniowymi aminokwasami lub kwasami, takie jak: [4-Pyr¹]LHRH, [⁰= \square Ser¹]LHRH, [⁰= \square Thr¹]LHRH, [cPc¹]LHRH, [D- \square Glu¹]LHRH, [Pro¹]LHRH i [Hyp¹]LHRH wykazują od 19% do 0,001% aktywności luliberyny (69—74). W pierścieniu najbardziej istotne jest ugrupowanie atomów —CO—NH—CH—, gdyż nawet analogi z acylowaną niewielkim rodnikiem glicyną, takie jak: [For-Gly¹]LHRH, [Ac-Gly¹]LHRH i [PrCO-Gly¹]LHRH, zachowują niedużą aktywność, zmniejszającą się w kolejności jak je wyżej wymieniono (71, 75). Metylowanie azotu zmodyfikowanej reszty aminokwasowej w pozycji 1, a zwłaszcza reszty aminokwasu acyklicznego, w sposób zasadniczy podnosi aktywność analogu. I tak: [N—Me—4—Pyr¹]LHRH ma 59% aktywności macierzystego hormonu, [Ac-Sar¹]LHRH — 64%, a [For-Sar¹]LHRH — 72% (73). Metylowanie natomiast azotu reszty piroglutaminowej, przeciwnie, obniża aktywność hormonu do 50% (76). Dane te wskazują na istotne znaczenie w działaniu reszty piroglutamylowej, laktamowej grupy karbonylowej, a zwłaszcza gęstości elektronewej na jej tlenie. Ponadto wskazują na niekorzystny wpływ steryczny grupy metylowej na azocie laktamowym reszty piroglutamylowej.

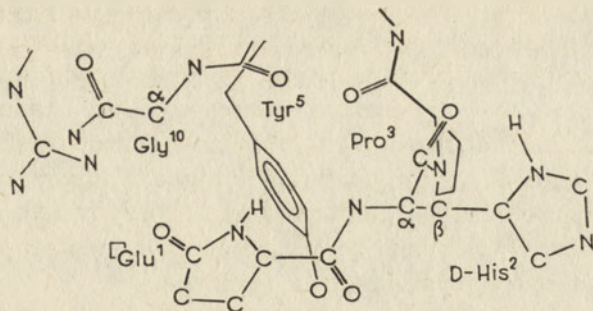
Do podobnych wniosków prowadzą badania konformacyjne. W wyliczonych niskoenergetycznych konformerach luliberyny grupa laktamowa reszty piroglutamylowej jest zawsze wyeksponowana na zewnątrz cząsteczki, podczas gdy fragment metylenowy — schowany w jej wnętrzu (26, 27), (Ryc. 3A). Natomiast prawie we wszystkich niskoenergetycznych konformerach inhibitorów jest odwrotnie: grupa laktamowa wewnątrz, a fragment metylenowy zewnątrz cząsteczki (77) (Ryc. 4). Wydaje się więc, że w oddziaływaniu hormonu z receptorem uczestniczy laktamowa grupa karbonylowa reszty piroglutamylowej (53, 73). Być może grupa ta tworzy wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe z jed-

nym z azotów w pozycji 10 (53), co wskazywałoby na jej udział w stabilizacji konformacji aktywnej. Reszcie piroglutamyłowej przypisuje się również funkcję ochrony hormonu przed szybką degradacją enzymatyczną.

IV-2. Histrydyna²

Dez-His²-LHRH i dez-His², Gly¹⁰-LHRH-C₂H₅ są w warunkach *in vitro* (drugi także *in vivo*) antagonistami luliberyny (78—84). Analogi te, jak i analogi z N⁶-Me-His² doskonale konkurują z luliberyną o miejsca wiążące receptora (83, 85). Histrydyna nie jest więc zaangażowana — jak początkowo sądzono (79) — w rozpcznawanie receptora, ale w proces efektorowy. Dla funkcji tej wydają się istotne zarówno właściwości aromatyczne, jak i kwasowo—zasadowe histydy, a także zdolność tworzenia przez nią wiązań wodorowych. Zastąpienie histydy aminokwasem alifatycznym powoduje spadek aktywności analogów do dziesiątych lub setnych procenta aktywności hormonu naturalnego. Zastąpienie natomiast pierścienia imidazolowego innym ugrupowaniem aromatycznym prowadzi do analogów o bardziej znaczącej aktywności. Np. [Ihi²]LHRH ma 13—16% aktywności luliberyny, [Trp²]LHRH — 5—10%, [Tyr²]LHRH — 5% i [Phe²]LHRH — 1,4% (70, 86, 87). Być może, dzięki właściwościom aromatycznym histydy tworzy kompleks z przeniesieniem ładunku z inną resztą aromatyczną luliberyny lub z resztą aromatyczną receptora (48). Niektóre dane eksperymentalne wskazują np. na istnienie w luliberynie kompleksu między histydyną² i tryptofanem³ (48, 51). O znaczeniu dla procesu efektorowego właściwości kwasowo—zasadowych imidazolu wnioskuje się z aktywności analogów pirazolowych, [Ala(β-Pir-3)²]LHRH ma 19% aktywności naturalnego hormonu, a [Ala(β-Pir-1)²]LHRH — tylko 1% (88, 89). W roztworze \square Glu-His-Trp-NH₂ w dioksanie, rozpuszczalniku sprzyjającym tworzeniu wiązań wodorowych, wykryto wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe z udziałem histydy, mianowicie między jej karbonyłem a grupą amidową (48). Być może w luliberynie w warunkach fizjologicznych grupa karbonyłowa histydy tworzy takie wiązanie z azotem reszty serylowej (48) lub innej (66).

Badania konformacyjne dez-His²-LHRH prowadzą do wniosku, że w analogu tym, w wyniku znacznego uelastycznienia N-końca, pierścien reszty piroglutamyłowej zbliża się do łańcucha bocznego tryptofanu i zajmuje pozycję podobną do pozycji w najniższej energetycznym, lecz nieaktywnym konformerze luliberyny. Grupa laktamowa skierowana jest wówczas bardziej do wewnątrz cząsteczki, mniej w kierunku receptora (26, 27). Na jej ułożenie jeszcze silniej niż brak histydy wpływa obecność w pozycji 2 niektórych D-aminokwasów np. D-histrydyny lub D-fe-



Ryc. 4. Ułożenie pierścienia laktamowego reszty kwasu piroglutaminowego w niskoenergetycznym konformerze (D-His²,Pro³)LHRH (77)

nyloalaniny (Ryc. 4). Na skutek tego, analogi z D-izomerami² są dobrymi antagonistami luliberyny (77). Wydaje się więc prawdopodobnym, że istotna w procesie efektorowym rola histydyny polega na „nastawianiu” w cząsteczce hormonu laktamowej grupy karbonylowej reszty kwasu piroglutaminowego w pozycję skierowaną do receptora.

IV-3. Tryptofan³

[Gly³]LHRH (16), [Ala³]LHRH (16), [Tyr³]LHRH (74), [D-Trp³]LHRH (16, 90) i (Phe³)LHRH (16, 91) mają aktywność od 0,001⁰% do 4⁰% aktywności hormonu naturalnego. O dwu ostatnich wiadomo, że efektywnie konkurują z luliberyną w wiązaniu z receptorem (92, 93). Niektóre modyfikacje hormonu w pozycji 3 zwiększają antyowulacyjne działanie inhibitorów wywodzących się z [D-Phe²]LHRH (92). Tryptofan jest więc kolejnym aminokwasem efektorowym luliberyny. Dla jego funkcji ważną wydaje się gęstość elektronowa układu aromatycznego, gdyż modyfikacje pozycji 3 zmniejszające tę gęstość zmniejszają również aktywność analogów. Mniejszą aktywność niż hormon macierzysty ma więc [Trp(For)³]LHRH (94) i [Bal(O₂)³]LHRH (95). [Trp(5F)³]LHRH, wobec bardzo niewielkiej różnicy stereochemicznej między fluorem a wodorem, wykazuje drastyczny spadek aktywności (96), wynikający najprawdopodobniej z silnego ściągania elektronów przez fluor. Z drugiej strony, analog [Phe(Me)₃]³]LHRH, mimo dużych sterycznych i chemicznych różnic między pięciometylofenyloalaniną a tryptofanem, ma 34—70% aktywności hormonu macierzystego (96). Obydwa aminokwasy charakteryzują się natomiast istotnym podobieństwem w tworzeniu kompleksów π—π z niektórymi cząsteczkami aromatycznymi (97). Grupa —NH— indolu i zdolność tworzenia przez nią wiązań wodorowych, zdają się odgrywać nieznaczną rolę, gdyż [Bal³]LHRH (95) i [Ala(β—Naf—2)³]LHRH (68) mają bardzo wysoką aktywność, odpowiednio 74⁰% i 52⁰% aktywności luliberyny.

Na podstawie badań aktywności [Tyr³,Trp⁵]LHRH i [Trp²,His³]LHRH sformułowano pogląd, że do efektu biologicznego luliberyny potrzebne jest oddziaływanie międzycząsteczkowe między tryptofanem a tyrozyną (65, 66, 90). Tezę tę potwierdzają fluorescencyjne badania *Marche* (62), który wykazał możliwość wyindukowania w środowisku alkalicznym kompleksu π — π między tymi resztami. Natomiast dotychczasowe obliczenia najniższej energetycznych konformerów luliberyny (26, 27, 50) i fluorescencyjne badania *Shinitzky'ego* (61) nie wskazują na istnienie oddziaływania między tryptofanem a tyrozyną.

IV-4. Seryna⁴

[Gly⁴]LHRH ma 1% aktywności luliberyny (16), [Ala⁴]LHRH — 5—10% (69, 91, 98, 99) a [Thr⁴]LHRH — 19% (69, 74). [Ser(tBu)⁴]LHRH ma aktywność bardzo niską, a [Leu⁴]LHRH jest jej w ogóle pozbawiona (100). Z badań konformacyjnych wynika, że, w tym ostatnim przypadku, przyczyną braku aktywności nie powinny być przeszkody steryczne (26, 27). Dane te zdają się świadczyć o tym, że skuteczne działanie związku wymaga obecności w pozycji 4, reszty aminokwasu o charakterze hydrofilowym. Sugeruje się, że seryna ma znaczną rolę konformacyjną, a mianowicie, że razem z leucyną stabilizuje pofałdowanie hormonu we fragmencie — Ser—Tyr—Gly—Leu— przez tworzenie wiązania wodorowego między jej tlenem karbonylowym a wodorem NH reszty leucylowej (55, 101, 102) (Ryc. 2).

IV-5. Tyrozyna⁵

[Gly⁵]LHRH (16), [D-Tyr⁵]LHRH (90) i [Ser⁵]LHRH (46) mają od 0,001% do 1% aktywności luliberyny. [Phe⁵]LHRH zachowuje 50—64% aktywności naturalnego hormonu (98, 103—105), a analog [Phe(NO₂)⁵]LHRH ma już tylko 5% aktywności (106). Powyższe dane wskazują na ważną w działaniu luliberyny rolę układu aromatycznego i jego gęstości elektro nowej w pozycji 5 peptydu. W miejscu tym również ważna wydaje się być wielkość aromatycznej reszty aminokwasowej. [Ity⁵]LHRH, analog o jednym dużym podstawniku w pozycji orto pierścienia fenylowego, ma 2—4% aktywności macierzystego hormonu, a [Dit⁵]LHRH, z dwoma takimi podstawnikami, jest jej zupełnie pozbawiony (87). Jednak należy odnotować, że analog z alicykliczną resztą w pozycji 5: [Ala(β -c-C₆H₁₁)⁵]LHRH ma 22% aktywności luliberyny (105). Fakt ten stawia pod znakiem zapytania hipotezę o oddziaływaniu międzycząsteczkowym tryptofan-tyrozyna, potrzebnym do efektu biologicznego hormonu.

IV-6. Glicyna⁶

Zastąpienie glicyny⁶ w luliberynie przez L-aminokwasy prowadzi do analogów o małej aktywności agonistycznej (55, 107). Zastąpienie glicyny⁶ w hormonie przez D-aminokwasy o bardzo różnym charakterze: zasadowe (107, 108), kwasowe (109), aromatyczne (107, 109, 110) i alifatyczne (za wyjątkiem D-waliny i D-proliny) (55, 109, 111, 112) prowadzi do analogów o znacznie wyższej aktywności agonistycznej (tabela 1), a w dez-His²-LHRH do analogów o wyższej aktywności antagonistycznej (55, 107, 109, 113). Tak np. [D-Ala⁶]LHRH ma siedmiokrotnie wyższą aktywność

Tabela 1

Wpływ budowy konstytucyjnej i konfiguracji aminokwasu w pozycji 6 luliberyny na aktywność jej analogów

Analog	Aktywność w % ^{x)}			
	<i>in vitro</i>	Lit.	<i>in vivo</i>	Lit.
[D-Pro ⁶]LHRH	10	(55)	3.3	(55)
[Pro ⁶] LHRH	3	(55)	1.5	(55)
[D-Val ⁶] LHRH	30	(55)	32	(55)
[Val ⁶] LHRH	<0.001	(55)	<0.1	(55)
[D-Glu ⁶] LHRH	92	(107)	180	(109)
[D-Leu ⁶] LHRH	300	(107)	900	(109)
[D-Ala ⁶] LHRH	357	(55)	700	(109)
[Ala ⁶] LHRH	4	(55)	4.3	(55)
[D-Lys ⁶] LHRH	383	(107)		
[Lys ⁶] LHRH	1.8	(107)		
[D-Arg ⁶] LHRH	387	(107)		
[D-Phe ⁶] LHRH	750	(107)	1000	(109)
[D-Tyr ⁶] LHRH	1350	(107)		
[D-Trp ⁶] LHRH			1300	(109)

x) Aktywność luliberyny = 100%

ność niż hormon macierzysty, a dez-His²-[D-Ala⁶]LHRH trzykrotnie wyższą aktywność antagonistyczną niż dez-His²-LHRH (55, 109). W każdej parze analogów: [D-AK⁶]LHRH-[L-Ak⁶]LHRH (tabela 1) aktywność pierwszego jest większa (55, 114). Fakty powyższe świadczą przede wszystkim o tym, że rodniki reszt aminokwasowych w pozycji 6 nie wchodzą w oddziaływania z receptorem. Glicyna⁶ nie bierze więc udziału w procesie efektorowym, wpływa natomiast w sposób istotny na powinowactwo hormonu do receptora.

O aktywności modyfikowanego analogu decyduje zasadniczo nie budowa konstytucyjna rodnika reszty aminokwasowej w pozycji 6, ale konfiguracja tej reszty. Wyższą aktywność analogów z D-aminokwasami⁶ w porównaniu z jednoimiennymi analogami L, tłumaczyć można, mię-

dzy innymi^{*)}, stabilizacją energetyczną konformerów zawierających β -zwój — w przypadku analogów [D-AK⁶]LHRH, i destabilizacją tych konformerów — w przypadku analogów [L-AK⁶]LHRH (58). Duża różnica energii między D⁶ i L⁶ analogami wynika z jednej strony z tendencji L-izomerów do rozwierania kątów φ_6 , ψ_6 , co prowadzi do cząsteczki o formie bardziej rozciągniętej (mniej aktywnej), a z drugiej strony z tendencji D-izomerów do zmniejszania tych kątów, co prowadzi do cząsteczki bardziej zwartej (bardziej aktywnej) (26, 27). Glicyna jest szczególnym aminokwasem: nie posiadającym centrum asymetrii. Można więc przyjąć, że zajmuje ona miejsce pośrednie między D— i L—aminokwasami. Jej obecność w pozycji 6 luliberyny najprawdopodobniej maksymalnie ogranicza swobodę konformacyjną cząsteczki hormonu zbudowanej z aminokwasów białkogennych. Glicyna⁶ spełnia wobec tego istotną rolę strukturotwórczą. Za tezę tą przemawia fakt, że wprowadzenie w pozycję 6 hormonu lub jego analogów reszty aminokwasowej N^α-metylowanej, znacznie obniża aktywność. [Sar⁶]LHRH ma 2⁰/o aktywności luliberyny (71), a [N-Me-D-Ala⁶]LHRH — 1,4⁰/o aktywności [D-Ala⁶]LHRH (106). Podobnie, zastąpienie glicyny⁶ przez (aza-1)-glicynę daje analog o aktywności porównywalnej z aktywnością hormonu rodzimego, mimo wyższej odporności na degradację enzymatyczną peptydów z azaaminokwasami (117, 118).

IV-7. Leucyna⁷

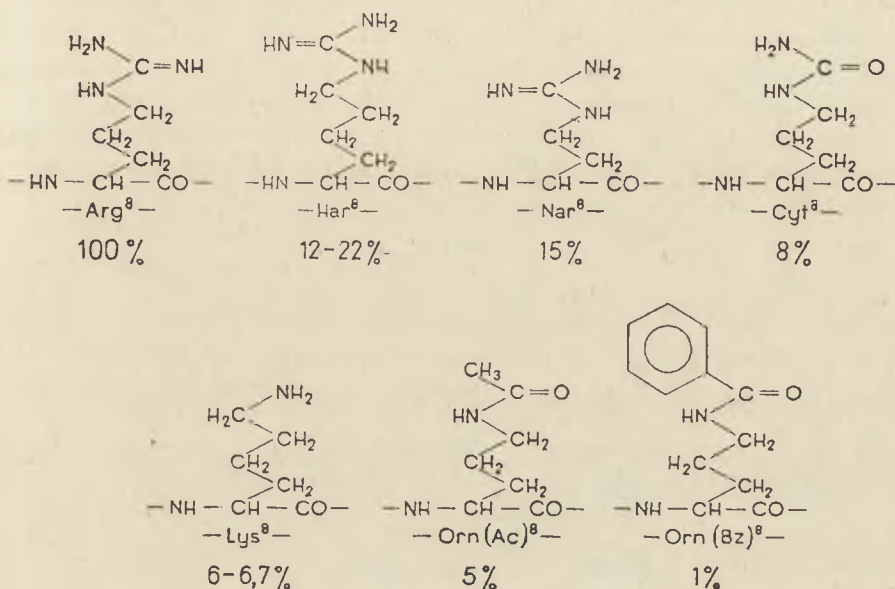
Dez-Arg⁸,Pro⁹,Gly¹⁰-LHRH jest 2,5 raza bardziej aktywny niż dez-Leu⁷,Arg⁸-LHRH (63). [Gly⁷]LHRH ma 0,2⁰/o (16, 69) aktywności macierzystego hormonu, [D-Leu⁷]LHRH — 1⁰/o (90) i [Ala⁷]LHRH — 5⁰/o (16, 69). Im dłuższa i bardziej rozgałęziona grupa przy węglu β w pozycji 7 analogu luliberyny, tym jego aktywność większa. Np. [Val⁷]LHRH ma 16⁰/o aktywności naturalnego hormonu, [Nle⁷]LHRH — 30⁰/o, [Ile⁷]LHRH — 45⁰/o (69). Wysoką aktywność mają analogi: [Ser(tBu)⁷]LHRH, [Glu(OtBu)⁷]LHRH i [Lys(BOC)⁷]LHRH (119, 120). Dane te zdają się świadczyć o tym, że skuteczne działanie luliberyny wymaga obecności w pozycji 7, reszty aminokwasowej o charakterze hydrofobowym. O sugerowanej konformacyjnej roli leucyny wspomniano w rozdziale IV-4.

IV-8. Arginina⁸

[Gly⁸]LHRH ma 0,1⁰/o aktywności macierzystego hormonu (16), a [D-Arg⁸]LHRH — 0,3⁰/o (90). Każda zmiana w pozycji 8 luliberyny, na-

^{*)} Wyższą aktywność analogów z D-aminokwasami⁶ tłumaczy się także ich większą odpornością na hydrolizę enzymatyczną niż odpowiednich L-analogów (59, 115, 116).

wet na aminokwasy bardzo podobne, powoduje znaczny spadek aktywności. Wskazuje to na ważny udział reszty arginylowej w działaniu luliberyny i potrzebę wszystkich elementów jej budowy. Wydłużenie łańcucha metylenowego arginyliny daje analog (Har⁸)LHRH o 12–22% aktywności naturalnego hormonu, a skrócenie łańcucha — analog (Nar⁸)LHRH o 15% aktywności (Ryc. 5). O ważności parametrów geometrycznych

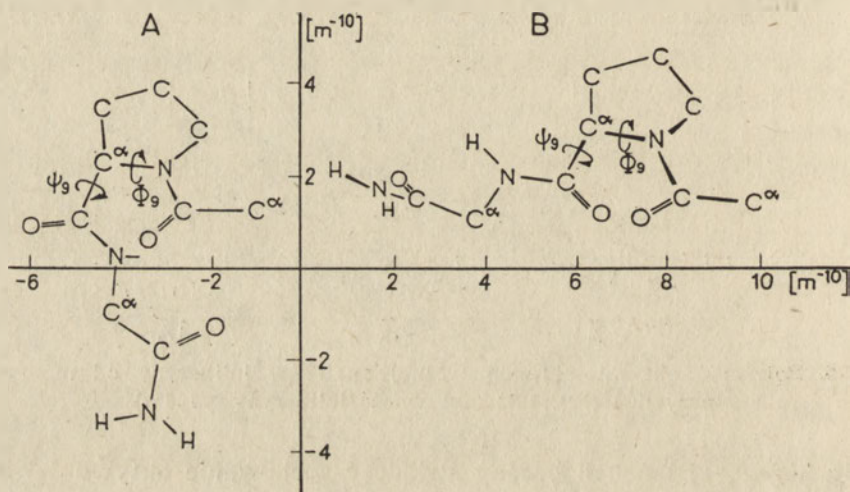


Ryc. 5. Zależność aktywności agonistycznej analogów luliberyny od modyfikacji pozycji 8 (121, 122) (aktywność luliberyny = 100%)

grupy kończącej łańcuch boczny świadczy zachowanie aktywności przez analogi [Cyt⁸]LHRH i [Orn(Ac)⁸]LHRH na poziomie, odpowiednio 8% i 5% aktywności luliberyny, i jej spadek do poziomu już tylko 1% w przypadku [Orn(Bz)⁸]LHRH. (Lys⁸)LHRH, mimo braku parametrów geometrycznych ugrupowania guanidynowego, ma prawie taką samą aktywność co [Cyt⁸]LHRH. Świadczy to z kolei o udziale funkcji zasadowej w mechanizmie działania reszty aminokwasowej w pozycji 8 (121, 122). Nie stwierdzono roli konformacyjnej reszty arginylowej (48), ale ruchliwość węgla jej łańcucha bocznego jest najprawdopodobniej mniejsza niż ruchliwość węgla innych reszt alifatycznych hormonu (44). W nisko energetycznych konformerach luliberyny i w nisko energetycznym konformerze aktywnego czteropeptydu \square Glu-Tyr-Arg-Trp-NH₂ funkcję guanidynową umiejscawia się w pobliżu grupy laktamowej kwasu piroglutaminowego (26, 27). Powyższe dane wydają się prowadzić do wniosku, że reszta arginylowa ma istotny udział w rozpoznawaniu receptora (85), i, najprawdopodobniej, wspomaga proces efektorowy (64).

IV-9. Prolina⁹

W otoczeniu reszty prolilowej luliberyny wyliczono dwa typy nisko energetycznych struktur lokalnych łańcucha peptydowego: skurczoną (Ryc. 6, A) i rozciągniętą (Ryc. 6, B) (26, 27). Sugeruje się, że aktywną formą jest pierwsza, gdyż najniżej energetyczny konformer [Ala⁹]LHRH, analogu o 65% aktywności macierzystego hormonu (16), ma również formę skurczoną (26, 27). Wydaje się, że taki typ struktury skutecznie zmniejsza ruchliwość łańcucha bocznego argininy. Efekt powyższy nie może najprawdopodobniej wystąpić w [Pro⁸,Arg⁹]LHRH, i analog jest prawie całkowicie nieaktywny (123). Prolina najprawdopodobniej odgrywa więc w cząsteczce luliberyny lokalną rolę konformacyjną polegającą na „nastawianiu” łańcucha bocznego argininy w pozycję skierowaną do receptora.



Ryc. 6. Forma skurczona (A) i rozciągnięta (B) łańcucha peptydowego luliberyny w otoczeniu Pro⁹ (26, 27)

IV-10. Amid glicyny¹⁰

Glicyna w pozycji 10 nie jest konieczna do biologicznego działania hormonu, gdyż dez-Gly¹⁰-LHRH ma jeszcze stosunkowo wysoką aktywność — 10% aktywności luliberyny (124, 125). Dez-NH₂¹⁰-LHRH-OH wykazuje natomiast nieznaczną aktywność (115, 126). W przeciwieństwie do samej reszty glicylowej w pozycji 10, funkcja amidowa na końcu cząsteczki jest więc istotna. Niektóre analogi z alkilowaną grupą amidową proliny mają nawet większą aktywność niż hormon rodzimy, np. dez-Gly¹⁰-LHRH-C₂H₇ — 200—300% i dez-Gly¹⁰-LHRH-C₂H₅ — 300—500% (125, 127). Wydaje się, że na C-końcu po reszcie prolilowej najbardziej

korzystne jest ugrupowanie atomów N—C—C lub N—C—C—C (127). Wprawdzie uelastycznia ono C-koniec, ale nie wpływa na ruchliwość tej reszty (45). Dłuższy łańcuch natomiast zbyt uelastycznia peptyd (127) i, być może, utrudnia utrzymanie w pobliżu siebie jego końców. W konsekwencji, maleć będzie populacja konformerów o kształcie litery U. Przy optymalnej do aktywności biologicznej liczbie atomów węgla w łańcuchu alkilowym amidu proliny obserwuje się — znowu do pewnej granicy — wzrost aktywności wraz ze wzrostem hydrofobowości (128). Np. dez-Gly¹⁰-LHRH-C₂H₄OH ma aktywność równą aktywności luliberyny, a 'dez-Gly¹⁰-LHRH-CH₂CF₃ — aktywność dwukrotnie większą od aktywności dez-Gly¹⁰-LHRH-CH₂CH₃ (125, 129). Niezbyt długie hydrofobowe ugrupowania na C-końcu cząsteczki zmniejszają degradację enzymatyczną (115) i poza tym mogą ułatwiać tworzenie wiązania wodorowego między tlenem laktamowym reszty piroglutamylowej a azotem zmodyfikowanej reszty w pozycji 10 hormonu (45, 53). Rolą Gly-NH₂¹⁰ w luliberynie wydaje się więc ochrona peptydu przed szybką degradacją enzymatyczną i udział w stabilizacji konformacji aktywnej.

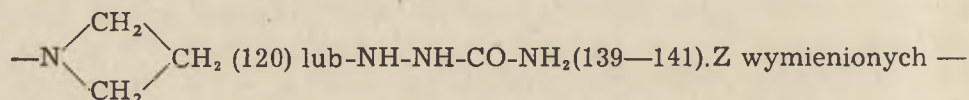
V. Superagonistyczne analogi luliberyny

Znana jest obecnie bardzo duża grupa analogów luliberyny o superagonistycznym działaniu. Większość z nich to związki mające podwójną modyfikację w strukturze hormonu rodzimego, a mianowicie alkiloamid w miejsce Gly¹⁰ i D-aminokwas w pozycji 6. Wprowadzenie do cząsteczki trzeciej modyfikacji w pozycji 5 (112, 130) lub 7 (131—134) nie podwyższało aktywności. Natomiast dez-Gly¹⁰-[N^α-Me-His²,D-Ala⁶]LHRH miał aktywność o 50% wyższą niż analog z resztą histydylową niemetylowaną (85). Wzrost aktywności agonistycznej hormonu, wskutek wprowadzenia zarówno modyfikacji C-końca (IV—10), jak i D-aminokwasu⁶ (IV—6), wynika tak ze wzrostu powinowactwa do receptora (wzrost populacji konformerów o kształcie litery U i wzrost hydrofobowości C-końca), jak i zwiększonej odporności na degradację enzymatyczną (59, 115, 116). W przypadku analogów zawierających D-aminokwas⁶ stwierdzono prostą zależność między szybkością hydrolizy enzymatycznej, a aktywnością analogu (59, 116)*. Wyższe powinowactwo analogu do receptora znajduje odzwierciedlenie w jego wyższej aktywności *in vitro* i większej ilości uwalnianych gonadotropin w każdym momencie działania *in vivo* (135). Z kolei, bezpośrednim skutkiem większej odporności na degrada-

* Wprawdzie budowa konstytucyjna rodnika D-aminokwasu w pozycji 6 w sposób zasadniczy nie wpływa na powinowactwo analogu do receptora (IV—6), ale w istotny sposób może wpływać na zmianę szybkości hydrolizy enzymatycznej.

cję enzymatyczną jest dłuższe działanie związku, a w konsekwencji, zwiększona zintegrowana ilość uwalnianych gonadotropin (115, 116, 135).

Do najbardziej efektywnych modyfikacji C-końca należą podstawienia Gly-NH₂ przez -NH-CH₂CF₃ (129), -NH-C₂H₅ (125, 127, 136—138),



najczęściej, jak do tej pory, stosowano podstawienie przez -NH-C₂H₅. Dez-Gly¹⁰-LHRH-C₂H₅ ma *in vitro* trzykrotnie wyższą od luliberyny zdolność uwalniania LH i FSH oraz *in vivo* pięciokrotnie i siedmiokrotnie wyższą zdolność uwalniania, odpowiednio LH i FSH (125, 127, 136—138). Czas jego działania szacuje się na 2 do 4 godzin, podczas gdy luliberyny tylko na 0,5 godziny (137). Również w badaniach klinicznych wywołuje on wzmożone wydzielanie LH i FSH u mężczyzn, a u kobiet FSH (142, 143). Najbardziej skutecznymi modyfikacjami pozycji 6 okazały się podstawienia przez D-aminokwasy aromatyczne: D-tryptofan, D-fenylalaninę i D-tyrozynę (107, 109, 110). Np. [D-Trp⁶]LHRH wykazuje *in vitro* stukrotnie wyższą od luliberyny zdolność uwalniania LH i FSH (110) oraz *in vivo* trzynastokrotnie i dwudziestokrotnie wyższą zdolność uwalniania, odpowiednio LH i FSH (109). Bardzo skuteczne jest zastąpienie glicyny⁶ przez D-aminokwasy o dużym rozgałęzieniu na węglu β: D-Leu, D-Nva, D-Ser(tBu), D-Cys(tBu), D-Asp(OtBu), D-Lys(BOC), D-Gln(c-C₆H₁₁) i D-Gln(BZL) (119, 120, 131—133). Suma efektów obydwu powyższych typów modyfikacji, tj. C-końca i pozycji 6, daje najczęściej wzrost aktywności agonistycznej i wzrost właściwości owulacyjnych (111, 112, 120, 130, 131, 135, 144), co przykładowo ilustruje tabela 2. Jedynie w przypadku [D-Trp⁶]LHRH i [D-Phe⁶]LHRH otrzymano sprzeczne wyniki. Mianowicie, według niektórych autorów, aktywność analogów po przekształceniu C-końca spada *in vitro* około sześciokrotnie (110) i około dwukrot-

Tabela 2

Wpływ modyfikacji pozycji 6 i C-końca luliberyny na aktywność agonistyczną i owulacyjną

Analog	Aktywność agonistyczna <i>in vivo</i> ^{x)} zintegrowana ilość gonadotropin po 6 godz. (111)		Aktywność owulacyjna ^{x)} (112)
	LH	FSH	
[D-Ala ⁶] LHRH	7.0	3.0	28.3
Dez-Gly ¹⁰ -[D-Ala ⁶] LHRH-C ₂ H ₅	43.0	17.2	82.7
[D-Leu ⁶] LHRH	9.0	5.0	29.0
Dez-Gly ¹⁰ -[D-Leu ⁶] LHRH-C ₂ H ₅	53.6	14.5	82.7

x) Aktywność agonistyczna i owulacyjna luliberyny = 1

nie *in vivo* (109). Sugeruje to przekroczenie pewnego progu hydrofobowości cząsteczki, co może wywierać niekorzystny wpływ na powinowactwo analogu do receptora. Brak zmiany aktywności $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Ala}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$ po wprowadzeniu trzech atomów fluoru do końcowego alkilu (129, 133), można tłumaczyć podobnie — osiągnięciem optimum hydrofobowości.

Spośród analogów superagonistycznych najwięcej uwagi poświęcono $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Ala}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$, $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Leu}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$ (111, 112, 114, 130, 135, 144—153), [D-Trp]LHRH (154—156) i $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Ser(tBu)}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$ (116, 132, 133, 157—164). Zwłaszcza obiecujące są dwa ostatnie związki. $\text{[D-Trp}^6\text{]LHRH}$ ma nie tylko szczególnie wysoką aktywność agonistyczną, ale też zdolność stymulowania owulacji w różnych warunkach eksperymentalnych (156), predysponującą go do terapii klinicznej. U kobiet, u których brak było jajczkowania, daje on pozytywne rezultaty w połowie przypadków (154). Wysoka aktywność uwalniania testosteronu i wydłużony do około 8 godzin czas działania wydają się wskazywać na spermatogenetyczne właściwości analogu (154). **Dez-Gly¹⁰-[D-Ser(tBu)⁶]LHRH-C₂H₅ (HOE 766)** jest w chwili obecnej jednym z najwyższej *in vivo* agonistycznych związków, z zachowaną specyficznością hormonalną i nietoksycznym. W badaniach klinicznych i weterynaryjnych jego zdolność uwalniania gonadotropin szacuje się jako dwudziesto- do czterdziestokrotnie wyższą od luliberyny. Do stymulacji dojrzewania pęcherzyków wystarcza dawka czterdziestokrotnie niższa, a do wywołania owulacji — dawka ośmiokrotnie niższa niż hormonu macierzystego. Stosunek uwalnianych gonadotropin jest taki sam, jak po podaniu luliberyny. Oprócz tego, przedowulacyjne maksimum gonadotropin występuje już po jednorazowym podaniu analogu, czego nie można osiągnąć po jednorazowej dawce luliberyny. Maksimum to jest podobne do przedowulacyjnego, fizjologicznego wyrzutu gonadotropin (czas trwania wyrzutu, wysokość i powierzchnia rejestrowanych maksimumów). Pod wpływem $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Ser(tBu)}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$ odpowiedź gonad jest również znacznie wyższa, co daje dobre rokowania co do użyteczności związku w terapii klinicznej. Ponadto, analog może znaleźć zastosowanie w przypadkach nieprawidłowości układu immunologicznego, gdyż nie reaguje z przeciwciałami hormonu naturalnego, a jego przeciwciała nie reagują z hormonem. Szczególnie cenna jest możliwość stosowania HOE 766 doustnie lub doodbytniczo (131, 132).

Ostatnio otrzymano analog $\text{[D-Ser(tBu)}^6\text{,Agly-NH}^{10}\text{]LHRH}$ o trzykrotnie wyższej aktywności agonistycznej od $\text{dez-Gly}^{10}\text{-[D-Ser(tBu)}^6\text{]LHRH-C}_2\text{H}_5$, wykazujący ponadto właściwości przeciwnowotworowe (141, 165).

Długotrwałe traktowanie superagonistycznymi analogami luliberyny zwierząt niedojrzałych płciowo opóźnia proces dojrzewania. U zwierząt dojrziałych powoduje zatrzymanie cyklu płciowego oraz atrofię jajników i macicy. Objawy te są prawdopodobnie wynikiem dużego ujemnego

sprężenia zwrotnego z hormonami płciowymi (166). Ostatnio zwrócono uwagę na możliwość antykoncepcyjnego zastosowania luliberyny lub jej superagonistycznych analogów. Podanie jednego z analogów po kopulacji, ale przed zagnieżdżeniem zapłodnionego jaja w macicy, opóźnia przedimplantacyjny wzrost LH, co utrudnia i wydłuża okres implantacji. Podanie po implantacji powoduje zanik ciała żółtego i spadek poziomu testosteronu. Obserwowano także przerywanie ciąży. Efekt zależał od czasu jej trwania, dawki i rodzaju analogu. Po przerwaniu ciąży następował nienaturalnie szybki powrót do stanu płodności. Przypuszcza się, że przyczyną antykoncepcyjnych właściwości superagonistycznych analogów luliberyny w początkowym okresie ciąży są powodowane przez nie duże zmiany hormonalne, takie jak: dysproporcja wydzielania LH i FSH, obniżenie poziomu prolaktyny i progesteronu oraz opóźnienie wydzielania przedimplantacyjnego estradiolu i obniżenie jego poziomu. Wydaje się więc prawdopodobnym, że luliberyna i jej superagonistyczne analogi mogą znaleźć zastosowanie nie tylko jako środki koncepcyjne, ale także antykoncepcyjne (134), których działanie polegałoby na zapobieganiu implantacji zapłodnionego jaja (a nie na zapobieganiu owulacji).


VI. Inhibitory luliberyny

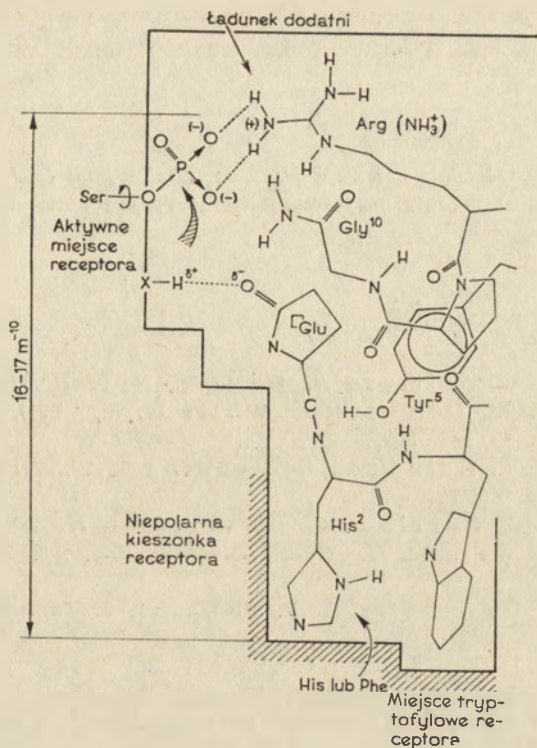
Obok superagonistycznych analogów luliberyny znana jest również duża grupa związków o właściwościach blokowania *in vitro* uwalniania LH i FSH. Wszystkie inhibitory są analogami modyfikowanymi w pozycji 2 (77). Związki znacznie skuteczniejsze mają modyfikacje w pozycji 2 i 3 (77). Ostatnio otrzymano analogi o wyjątkowo dobrych właściwościach antyowulacyjnych, modyfikowane w pozycjach 1, 2 i 3 (167—169). Oprócz tego, wszystkie inhibitory mają D-aminokwas⁸ (107, 170) i, czasami, na C-końcu alkiloamid lub amid (aza-1)-glicyny (139, 140, 171). Modyfikacje w części N-końcowej peptydu nadają analogowi właściwości antagonistyczne, a w części dalszej — przez wzrost powinowactwa do receptora i odporności na degradację enzymatyczną — właściwości te potęgują. Najważniejsze dla inhibitorów właściwości: antyowulacyjne, nie zawsze są jednak proporcjonalne do właściwości antagonistycznych *in vitro*, i nie zawsze — odwrotnie proporcjonalne do właściwości agonistycznych (170, 172, 173). Ponadto, ze względu na inny mechanizm owulacji spontanicznej i pokopulacyjnej, skuteczność antyowulacyjna tych samych inhibitorów w tych dwóch przypadkach jest różna (92, 174). Przewidywanie właściwości antyowulacyjnych inhibitorów luliberyny jest więc trudniejsze niż przewidywanie biologicznych właściwości analogów superagonistycznych.

Najefektywniejszą modyfikacją pozycji 2, jak dotąd, okazało się zastąpienie histydyny przez D-feniloalaninę lub 4'-chloro-D-feniloalaninę

(86, 168, 169). Już pojedynczo modyfikowany analog [D-Phe²]LHRH hamuje działanie luliberyny *in vitro* pięciokrotnie silniej niż dez-His²-LHRH, który jest najprostszym inhibitorem (86, 113). Podanie [D-Phe²]LHRH szczurom w dawce $6 \cdot 10^{-3}$ g na zwierzę blokuje owulację w 20% przypadków (170). Jako agonista ma on tylko 0,001% aktywności macierzystego hormonu (86, 113). Zastąpienie D-feniloalaniny przez 4'-chloro-D-feniloalaninę prowadziło do analogów o wyższej aktywności antyowulacyjnej, niekiedy aż dziesięciokrotnie (169). Modyfikowanie pozycji 3 jest najbardziej skuteczne, gdy tryptofan zastępuje się proliną (175—178) (pod warunkiem niezmienionej pozycji 1 (179)), D-tryptofanem (77, 92, 174) lub β -2-tienylo-D-alaniną (168). O dwóch pierwszych aminokwasach wiadomo, że obniżają właściwości agonistyczne analogu bez zmniejszenia jego powinowactwa do receptora (92). Najbardziej efektywnymi, z punktu widzenia właściwości antyowulacyjnych, modyfikacjami pozycji 1 są podstawienia kwasu piroglutaminowego przez N^α-acetylowane D-aminokwasy, N^α-acetylo-L-prolinę lub kwas D-piroglutaminowy (167—169). Tak np. wprowadzenie tego ostatniego do [D-Phe²,D-Trp³,D-Phe(NH-Ala)⁶]LHRH daje analog o dwukrotnie wyższej aktywności antyowulacyjnej niż związek wyjściowy (169).

Niezwykle skutecznymi modyfikacjami pozycji 6, podobnie jak w przypadku agonistów, jest zastąpienie glicyny przez D-tryptofan lub D-feniloalaninę (107). Ostatnio otrzymano bardzo dobre rezultaty podstawiając glicynę β -2-tienylo-D-alaniną (168). Wprowadzenie natomiast alkiloamidu na C-koniec inhibitora modyfikowanego w pozycji 6, poza niektórymi związkami wywodzącymi się ze słabych antagonistów typu [L-AK², L-AK³, D-AK⁶]LHRH (171), nie daje wzrostu właściwości inhibitorowych (113, 180). Czasami powoduje nawet obniżenie właściwości antyowulacyjnych, mimo wzrostu właściwości antagonistycznych. Np. analog dez-Gly¹⁰-[D-Phe²,D-Ala⁶]LHRH-C₂H₅ ma stukrotnie wyższą aktywność antagonistyczną *in vitro* niż analog [D-Phe²,D-Ala⁶]LHRH, ale jednocześnie co najmniej dziesięciokrotnie niższą aktywność antyowulacyjną (173). Wprowadzenie do inhibitora modyfikowanego w pozycji 6 D-aminokwasem, w miejsce amidu glicyny, amidu (aza-1)-glicyny, przeciwnie — w większości przypadków, podnosi właściwości antyowulacyjne (140).

Inhibitorem o obecnie najwyższej aktywności antyowulacyjnej jest analog [D-Phe^{2,6},Gly-NH¹⁰]LHRH. U szczurów blokuje on całkowicie owulację w dawce $15 \cdot 10^{-6}$ g/zwierzę (140). Do wysoko aktywnych analogów antyowulacyjnych należą [Ac-D-Thi¹,D-Phe²,D-Thi^{3,6}]LHRH (168), [Ac-D-Phe¹,D-Phe(Cl)²,D-Trp^{3,6}]LHRH (169), (Ac-Pro¹,D-Phe²,D-Trp^{3,6})LHRH, [D- Glu¹,D-Phe²,D-Trp^{3,6}]LHRH (167) oraz niektóre związki dimeryczne (169, 181, 182), jak np.



Ryc. 7. Schemat hipotetycznego mechanizmu oddziaływania luliberyny i jej aktywnych analogów z receptorem (184)

między grupą zasadową bocznego łańcucha reszty aminokwasowej⁸ a pierścieniem aromatycznym reszty aminokwasu² — była stała ($16-17 \times 10^{-10}$ m). Tą stałą odległość w giętkiej cząsteczce luliberyny może zapewnić, z jednej strony wiązanie grupy zasadowej reszty aminokwasowej⁸ hormonu lub jego analogu z kwaśną grupą fosforanową ufosforylowanej reszty serylowej receptora, oraz z drugiej strony — zakotwiczenie pierścienia aromatycznego reszty² związku w niepolarnej kieszonce receptorowej. Reakcji tworzenia soli między luliberyną a receptorem może towarzyszyć przesunięcie grupy fosforanowej i, w konsekwencji, odsłonięcie obszaru receptora normalnie przesłoniętego. W przypadku cząsteczki hormonu lub jego agonistycznego analogu zakłada się dalej, że do odsłoniętego obszaru przesuwają się karbonył ugrupowania bocznego reszty piroglutamyellowej, co doprowadza do aktu efektorowego.

Reasumując. Mimo jeszcze wielu niejasności, wiedza o zależności między strukturą i funkcją luliberyny wydaje się znaczna. Potwierdzeniem tego jest fakt, że otrzymano kilka superagonistycznych i superantagonistycznych analogów hormonu o właściwościach pozwalających na ich kliniczne zastosowanie. Ostatnie osiągnięcia tak w dziedzinie inhibito-

rów, jak i związków superagonistycznych dają ponadto nadzieję na dalsze analogi luliberyny o lepszych lub innych niż dotychczas właściwościach praktycznych.

Autorki pracy serdecznie dziękują panu dr. Andrzejowi Lipkowskiemu za wiele cennych uwag i udostępnienie najnowszej literatury przedmiotu.

Zaakceptowano 31.3.1980

PIŚMIENICTWO

- Schally A. V., Arimura A., Baba Y., Nair R. M. G., Matsuo H., Redding T. W., Debeljuk L., White W. F., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 393—399.
- Schally A. V., Nair R. M. G., Redding T. W., Arimura A., (1971), *J. Biol. Chem.*, **246**, 7230—7236.
- Bogentoft C., Currie B. C., Sievertsson H., Chang J.-W., Folkers K., Bowers C. Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 403—408.
- Nair R. M. G., Schally A. V., (1972), *Int. J. Peptide Protein. Res.*, **4**, 421—430.
- Amoss M., Burgus R., Blackwell R., Vale W., Fellows R., Guillemin R., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 205—210.
- Currie B. L., Sievertsson H., Bogentoft C., Chang J. W., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 1180—1184.
- Baba Y., Matsuo H., Schally A. V., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 459—463.
- Matsuo H., Baba Y., Nair R. M. G., Arimura A., Schally A. V., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334—1339.
- Burgus R., Butcher M., Amoss M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Blackwell R., Vale W., Guillemin R., (1972), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 278—282.
- Schally A. V., Coy D. H., Arimura A., Vilchez J., Redding T. W., Kastin A. J., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 1—12; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
- Currie L., Johansson K. N. G., Folkers K., Bowers C. Y., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 14—19.
- Bowers C. Y., Currie B. L., Johansson K. N. G., Folkers K., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 20—26.
- Fawcett C. P., Beezley A. E., Wheaton J. E., (1975), *Endocrinology*, **96**, 1311—1314.
- Martini L., (1975), w *Hypothalamic Hormones-Structure-Synthesis- and Biological Activity*, red. Gupta D., Voelter W., str. 119—133; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
- McCann S. M., (1977), *Phys. Med.*, **296**, 797—802.
- Rivier J., Brown M., Rivier C., Ling N., Vale W., (1976), w *Peptides 1976. Proceedings of the Fourteenth European Peptide Symposium Wépion, Belgium, April 11—17, 1976*, red. Loffet A., str. 427—449; Editions de l'Université de Bruxelles, Bruksela.
- Folkers K., Knudsem R., Lam Y. K., Humphries J., Wan Y. P.,

- Bowers Y. C., Frick W., Daves G. D., Barofsky D. F., Barofsky E., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 47—58; Verlag-Chemie, Weinheim-New York.
18. Schindler A. E., Keller E., Göser R., Friedrich E., Etzrodt A., Bohnet H. G., Hanker J. P., Schneider H. P. G., Butz F., Wyss H. I., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 565—575, Verlag Chemie, Weinheim-New York.
 19. Crasignani P. G., Lombroso G. C., Attanasio A., Trojsi L., Alberton A. D., Reschini E., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 577—587, Verlag Chemie, Weinheim-New York.
 20. Besser G. M., Mortimer C. H., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 497—507; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
 21. Sievertsson H., (1972), *Acta Pharm. Suecica*, 9, 19—46.
 22. Schally A. V., Arimura A., Kastin A. J., Coy D. H., Coy E. J., Vilchez-Martinez J., Redding T. W., Geiger R., König W., Wissman H., (1974), *Pure App. Chem.*, 37, 315—328.
 23. Law H. D., (1974), w *Amino-acids, Peptides and Proteins*, tom 5, red. Sheppard R. C., str. 384—447; The Chemical Society, Burlington House, London.
 24. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1975), *Res. Methods. Neuroch.*, 3, 393—406.
 25. Camble R., Dutta A. S., (1975) w *Amino-acids, Peptides and Proteins*, tom 6, red. Sheppard R. C., str. 419—485; The Chemical Society, Burlington House, London.
 26. Momany F. A., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 2990—2996.
 27. Momany F. A., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 2996—3000.
 28. Schafer D. J., Szelke M., (1976) w *Amino-acids, Peptides and Proteins*, tom 8, red. Sheppard R. C., str. 339—437; The Chemical Society, Burlington House, London.
 29. Voelter W., (1977), w *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, red. Herz W., t. 34, str. 439—505; Springer-Verlag, Wien-New York.
 30. Ludescher U., Studer R. O., Gillessen D., (1978) w *Amino-acids, Peptides and Proteins*, tom 9, red. Sheppard R. C., str. 427—445; The Chemical Society, Burlington House, London.
 31. *Peptides in Neurobiology* (1977), red. Geiner H., str. 1—464, Plenum Press, New York and London.
 32. Leonardelli J., Barry J., Dubois M. P., (1973), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 276, 2043—2046.
 33. Barry J., Dubois M. P., Poulain P., Leonardelli J., (1973), *C. R. Acad. Sci. Paris*, 276, 3191—3193.
 34. Baker B. L., Dermody W. C., Reel J. R., (1974), *Am. J. Anat.*, 139, 129—134.
 35. McCann S. M., Krulich L., Cooper K. J., Kalra P. S., Kalra S. P., Libertun C., Negro-Vilar A., Orias R., Roennekleiv O. K., Fawcett C. P., (1973), *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 20, 43—59.
 36. McCann S. M., Moss R. L., (1973), *Life Sci.*, 16, 833—852.
 37. Miyachi Y., Mecklenburg R. S., Lipsett M. B., (1973), *Endocrinology*, 93, 492—496.
 38. Kamberi A., Schneider H. P. G., McCann S. M., (1970), *Endocrinology*, 86, 278—284.

39. Deslauriers R., Walter R., Smith I. C. P., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 244—250.
40. Deslauriers R., Levy G. C., McGregor W. H., Sarantakis D., Smith I. C., (1975), *Biochemistry*, **14**, 4335—4343.
41. Wessels P. L., Feeny J., Gregory H., Gormley J. J., (1973), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1691—1698.
42. Smith I. C. P., Deslauriers R., Saito H., Walter R., Garrigou-Lagrange C., McGregor W. H., Sarantakis D., (1973), *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **222**, 597—627.
43. Deslauriers R., Somorjai R. L., (1976), *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1931—1939.
44. Deslauriers R., Komoroski R., Levy G. C., Seely J. H., Smith I. C. P., (1976), *Biochemistry*, **15**, 4672—4675.
45. Deslauriers R., Levy G. C., McGregor W. H., Sarantakis D., Smith I. C. P., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **75**, 343—346.
46. Mabrey S., Klotz I. M., (1976), *Biochemistry*, **15**, 234—242.
47. Marche P., Morgat J. L., Fromageot P., (1973), *Eur. J. Biochem.*, **40**, 513—518.
48. Marche P., Montenay-Garestier T., Hélène C., Fromageot P., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5730—5737.
49. Grant G., Vale W., (1972), *Nature New Biol.*, **237**, 182—183.
50. Achriem A. A., Gołubowicz W. P., Kirnarskij Ł. I., Gałaktionow S. G., (1978), *Bioorg. Chim.*, **4**, 838—840.
51. Donzel B., Gilon C., Blagdon D., Erisman M., Burnier J., Goodman M., (1975), w *Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium*, red. Walter R., Meienhofer J., str. 165—173, Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor Michigan.
52. Donzel B., Rivier J., Goodman M., (1977), *Biochemistry* **16**, 2611—2618.
53. Seprodi J., Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Pedroza E., Huang W. V., Schally A. V., (1978), *J. Med. Chem.*, **21**, 993—995.
54. Beddell Ch. R., Fraser P. J., Gilbert D., Goodford P. J., Lowe L. A., Wilkinson S., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 417—423.
55. Monahan M. W., Amoss M. S., Anderson H. A., Vale W., (1973), *Biochemistry*, **12**, 4616—4620.
56. Geddes A. J., Parker K. D., Atkins E. D. T., Beighton E., (1968), *J. Mol. Biol.*, **32**, 343—358.
57. Venkatachalam C. M., (1968), *Biopolymers*, **6**, 1425—1436.
58. Némethy G., Printz M. P., (1972), *Macromolecules*, **5**, 755—758.
59. Koch Y., Baram T., Hazum E., Fridkin M., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 488—491.
60. Ling N., Vale W., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 801—806.
61. Shinitzky M., Fridkin M., (1976), *Biochim. Biophys. Acta*, **434**, 137—143.
62. Marche P., Montenay-Garestier T., Fromageot P., Hélène C., (1976), *Biochemistry*, **15**, 5738—5742.
63. Chang J.-K., Humphries H. J., Williams R. H., Sivertsson H., Folkers K., Bowers C. Y., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 1256—1261.
64. Chang J.-K., Williams R. H., Humphries A. J., Johansson N. G., Folkers K., Bowers C. Y., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 727—732.
65. Humphries J., Fischer G., Wan Y. P., Folkers K., Bowers C. Y.,

- (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 569—571.
66. Humphries J., Wan Y. P., Fischer G., Folkers K., Bowers C. Y., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 675—682.
67. Yanaihara N., Yanaihara C., Sakagami M., Tsuji K., Hashimoto T., Kanako T., Oka H., Schally A. V., Arimura A., Redding T. W., (1973), *J. Med. Chem.*, **16**, 373—377.
68. Prasad K. U., Roeske R. W., Weitzl F. L., Vilchez-Martinez J. A., Schally A. V., (1976), *J. Med. Chem.*, **19**, 492—495.
69. Fujino M., Kobayashi S., Obayashi M., Fukuda T., Shinagawa S., Yamazaki I., Nakayama R., White W. F., Rippel R. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 698—705.
70. Yanaihara N., Tsuji K., Yanaihara C., Hashimoto T., Kaneko T., Oka H., Arimura A., Schally A. V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 165—173.
71. Arnold W., Flouret G., Morgan R., Rippel R., White W., (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 314—319.
72. Yajima H., Kurobe M., Yo I., Fujii N., Baba Y., (1975), *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1622—1624.
73. Nikolics K., Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Coy E. J., Schally A. V., (1977), *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **9**, 57—62.
74. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1973), *J. Med. Chem.*, 1140—1143.
75. Okada Y., Kitamura K., Baba Y., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1180—1186.
76. Okada Y., Horikosh. H., Baba Y., (1974), *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 721—723.
77. Momany F. A., (1978), *J. Med. Chem.*, **21**, 63—68.
78. Monahan M. W., Rivier J., Vale W., Guillemin R., Burgus R., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 551—556.
79. Vale W., Grant G., Rivier J., Monahan M., Amoss M., Blackwell R., Burgus R., Guilleimin R., (1972), *Science*, **176**, 933—434.
80. Schally A. V., Kastin A. J., Arimura A., Coy D. H., Coy E. J., Debeljuk L., Reeding T. W., (1973), *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **20**, 119—136.
81. Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Coy E. J., Arimura A., Schally A. V., (1973), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**, 331—333.
82. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., Vilchez-Martinez J. A., Debeljuk L., Carter W. H., Arimura A., (1974), *Biochemistry*, **13**, 323—326.
83. Spona J., (1974), *FEBS Letters*, **48**, 88—92.
84. Bajew W. W., Mirosznikow A. P., Bakalkin G. Ja., Komissarowa E. N., Isaczenkow W. A., (1978), *Bioorg. Chim.*, **4**, 489—499.
85. Nair R. M. G., Sagel J., Colwell J. A., Mathur R. S., Powers J. M., Luborsky-Moore J. L., Worthington W. C., (1978), w *Hypothalamic Hormones—Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 21—43; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
86. Rees R. W. A., Foel T. J., Chais S.-Y., Grant N., (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 1016—1019.
87. Terada S., Nakagawa S., Yang D. Ch., Lipkowski A., Flouret G., (1980) *Biochemistry* **19**, 2572—2576.
88. Coy D., Coy E. J., Hirotsu Y., Schally A. V., (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 140—142.
89. Coy D. H., Hirotsu Y., Reeding T. W., Coy E. J., Schally A. V., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 948—949.

90. Hirotsu Y., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 277—282.
91. Yanaihara N., Hashimoto T., Yanaihara C., Tsuji K., Kenmochi Y., Ashizawa F., Kaneko T., Oka H., Saito S., Arimura A., Schally A. V., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 64—73.
92. Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Schally A. V., (1976), w *Peptides 1976. Proceedings of the Fourteenth European Peptide Symposium, Wèpion, Belgium, April 11—17, 1976*; red. Loffet A., str. 463—469; Editions de l'Universite de Bruxelles, Bruksela.
93. de la Cruz A., Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Arimura A., Schally A. V., (1976), *Science*, **191**, 195—197.
94. Hazum E., Fridkin M., Meidan R., Koch Y., (1977), *Eur. J. Biochem.*, **79**, 269—273.
95. Yabe Y., Miura Ch., Horikoshi H., Baba Y., (1976), *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 3149—3157.
96. Coy D. H., Coy E. J., Hirotsu Y., Vilchez-Martinez J. A., Schally A. V., van Nispen J. W., Tesser G. I., (1974), *Biochemistry*, **13**, 3550—3553.
97. Carrion J. P., Deranleau D. A., Donzel B., Esko K., Moser P., Schwyzer R., (1968), *Helv. Chim. Acta*, **51**, 459—481.
98. Immer H., Nelson V. R., Revesz C., Sestanjk K., Götz M., (1974), *J. Med. Chem.*, **17**, 1060—1065.
99. Geiger R., Wissmann H., König W., Sandow J., Schally A. V., Redding T. W., Debeljuk L., Arimura A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1467—1473.
100. Schafer D. J., Black A. D., Bower J. D., Crighton D. B., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 613—619.
101. Donzel B., Rivier J., Goodman M., (1977), *Biopolymers*, **16**, 2587—2590.
102. Donzel B., Sakarellos C., Goodmann M., (1977), w *Peptides. Proceedings of the Fifth American Peptidem Symposium*, red. Goodman M., Meienhofer J., str. 171—175; John Wiley, New York.
103. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1973), *J. Med. Chem.*, **16**, 83—84.
104. Kastin A. J., Schally A. V., Gonzales-Barcelona D., Coy D. H., Miller C., Porias H., Schalch D. S., (1974), *J. Clin. Metab.*, **38**, 801—804.
105. Künzi H., Gillessen D., Trzeciak A., Studer R. O., Kerdelhué B., Jutisz M., Lotz W., (1974), *Helv. Chim. Acta*, **57**, 2131—2139.
106. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1973), *J. Med. Chem.*, **16**, 827—829.
107. Rivier J., Ling N., Monahan M., Rivier C., Brown M., Vale W., (1975), w *Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium*, red. Walter R., Meienhofer J., str. 863—70, Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor Michigan.
108. Ling N. C., Rivier J. E., Monahan M. W., Vale W. W., (1976), *J. Med. Chem.*, **19**, 937—941.
109. Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Coy E. J., Schally A. V., (1976), *J. Med. Chem.*, **19**, 423—425.
110. Coy D. H., Labrie F., Savary M., Coy E. J., Schally A. V., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 576—581.
111. Vilchez-Martinez J. A., Coy D. H., Arimura A., Coy E. J., Hirotsu Y., Schally A. V., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1226—1232.
112. Fujino M., Fukuda T., Shinagawa S., Kobayashi S., Yamaza-

- ki I., Nakayama R., Seely J. H., White W. F., Rippel R. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 406—412.
113. Labrie F., Savary M., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1976), *Endocrinology*, **98**, 289—294.
114. Rippel R. H., Johnson E. S., White W. F., Fujino M., Fukuda T., Kobayashi S., Kimura E. T., (1975), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **148**, 1193—1197.
115. Marks N., Stern F., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **61**, 1458—1463.
116. Clayton R. N., Sheakspear R. A., (1978), *J. Endocrinol.*, **77**, 34 P.
117. Dutta A. S., Morley J. S., (1975), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 1712—1720.
118. Dutta A. S., Furr B. J. A., Giles M. B., Morley J. S., (1976), *Clin. Endocrinol., Suppl.*, **5**, 291—298.
119. König W., Sandow J., Geiger R., (1975), w *Peptides: Chemistry Structure and Biology. Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium*, red. Walter R., Meienhofer J., str. 883—888; Ann Arbor Sciences Publishers Inc., Ann Arbor, Michigan.
120. König W., Sandow J., Geiger R., (1978), w *Hypothalamic Hormones—Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 13—19; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
121. Geiger R., König W., Sandow J., Schally A. V., (1974), *Z. Physiol. Chem.*, **335**, 1526—1534.
122. Yabe Y., Kitamura K., Miura Ch., Baba Y., (1974), *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2557—2564.
123. Yanaihara N., Yanaihara C., Hashimoto T., Kenmochi Y., Kaneko T., Oka H., Saito S., Schally A. V., Arimura A., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1280—1291.
124. Rivier J., Monahan M., Vale W., Grant G., Amoss M., Blackwell R., Guillemin R., Burgus R., (1972), *Chimia*, **26**, 300—303.
125. Fujino M., Kobayashi S., Obayashi M., Shinagawa S., Fukuda T., Kitada C., Nakayama R., Yamazaki I., White W. F., Rippel R. H., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 863—869.
126. Sievertsson H., Chang J. K., Bogentoft C., Currie B. L., Folkers K., Bowers C. Y., (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1566—1571.
127. Fujino M., Shinagawa S., Obayashi M., Kobayashi S., Fukuda T., Yamazaki I., Nakayama R., White W. F., Rippel R. H., (1973), *J. Med. Chem.*, **16**, 1144—1146.
128. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., Vilchez-Martinez J. A., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 275—277.
129. Coy D. H., Vilchez-Martinez J. A., Coy E. J., Nishi N., Arimura A., Schally A. V., (1975), *Biochemistry*, **14**, 1848—1851.
130. Fujino M., Yamazaki I., Kobayashi S., Fukuda T., Shinagawa S., Nakayama R., White W. F., Rippel R. H., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 1248—1256.
131. Crighton D. B., (1978), w *Hypothalamic Hormones—Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 387—393; Verlag Chemie, Weinheim-New York.
132. Siddal B., Crighton D. B., (1977), *J. Endocrinol.*, **75**, 49—57.
133. Sandow J., v. Rechenberg W., König W., Hahn M., Jerzabek G., Fraser H., (1978), w *Hypothalamic Hormones—Chemistry, Physiology, and*

- Clinical Applications, red. Gupta D., Voelter W., str. 307—326; Verlag-Chemie, Weinheim-New York.
134. Corbin A., Beattie C. W., Tracy J., Jones R., Foell T. J., Yardley J., Rees R. W. A., (1978), *Int. J. Fertil.*, **23**, 81—92.
 135. Arimura A., Vilchez-Martinez J. A., Coy D. H., Coy E. J., Hirotsu Y., Schally A. V., (1974), *Endocrinology*, **95**, 1174—1177.
 136. Rippel R. H., Johnson E. S., White W. F., Fujino M., Yamazaki I., Nakayama R., (1973), *Endocrinology*, **93**, 1449—1452.
 137. Arimura A., Vilchez-Martinez J. A., Schally A. V., (1974), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **146**, 17—20.
 138. Fujino M., Shinagawa S., Yamazaki I., Kobayashi S., Obayashi M., Fukuda T., Nakayama R., White W. F., Rippel R. H., (1973), *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**, 488—489.
 139. Dutta A. S., Furr B. J. A., Giles M. B., (1979), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 379—388.
 140. Dutta A. S., Furr B. J. A., Giles M. B., (1979), *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1**, 389—398.
 141. Dutta A. S., Furr B. J. A., Giles M. B., Valcaccia B., (1978), *J. Med. hem.*, **21**, 1018—1024.
 142. Nakano R., Takekida H., Kotsuji F., Miyazaki Y., Tojo S., (1974), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39**, 802—804.
 143. Nakano R., Takekida H., Kotsuji F., Tojo S., (1975), *Obst. Gynecol.*, **45**, 263—266.
 144. Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., Vilchez-Martinez J., Hirotsu Y., Arimura A., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 335—340.
 145. Vilchez-Martinez J. A., Pedroza E., Coy D. H., Arimura A., Schally A. V., (1977), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **154**, 427—430.
 146. Kastin A. J., Arimura A., Gonzales-Barcena D., Coy D. H., Miller M. C., Nishi N., Lee L., Duron-Huerta H., Schalch D. S., Schally A. V., (1974), *Int. J. Fertil.*, **19**, 202—206.
 147. Soria J., Zarate A., Canales E. S., Ayala A., Schally A. V., Coy D. H., Coy E. J., Kastin A. J., (1975), *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **123**, 145—146.
 148. Kinder J. E., Adams T. E., Nett T. M., Coy D. H., Schally A. V., Reeves J., (1976), *J. Anim. Sci.*, **42**, 1220—1226.
 149. Gonzales-Barcena D., Kastin A. J., Escalente-Herrera A., Gonzales-Martinez A., Coy D. H., Schally A. V., (1976), *Int. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **374**, 300—306.
 150. Comaru A. M. M., Rodrigues J., Poroa L. C., Franco S., Dimetz T., Coy D. H., Schally A. V., (1976), *Inter. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **374**, 307—312.
 151. Zarate A., Canales E. S., Ayala A., Soria J., Schally A. V., Kastin A. J., Coy D. H., Coy E. J., (1976), *Inter. Congr. Ser. — Excerpta Medica*, **374**, 288—290.
 152. Yamazaki I., Nakagawa H., Yoshida K., Kobayashi S., Hirai S., Fujino M., Matzuzawa T., Shimamoto K., (1977), *Takeda Kenkyusho Ho*, **36**, 64—70.
 153. Schwarzstein L., Aparicio N. J., Turner D., De Turner E. A., Schally A. V., Coy D. H., (1978), *Andrologia*, **10**, 59—65.
 154. Botella-Zlusia J., Charro-Salgado A., (1977), *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **56**, 337—341.

155. Jaramillo C., Perez-Infante V., Lopez M. A., Charro-Salgado A., Coy D. H., Schally A. V., (1977), *Int. J. Fertil.*, **22**, 77—84.
156. Banik U. K., Givner M. L., (1977), *Fertil. Steril.*, **28**, 1243—1249.
157. Kuhl H., Kaplan H. G., Taubert H. D., (1976), *Dtsch. Med. Wschr.*, **101**, 361—364.
158. Dericks-Tan J. S. E., Hammer E., Taubert H. D., (1977), *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **45**, 597—600.
159. Willius S. J., Wide L., (1977), *Upsala J. Med. Sci.*, **82**, 21—26.
160. Fraser H. M., Sandow J., (1977), *J. Endocrinol.*, **74**, 291—296.
161. Wiegelmann W., Solbach H. G., Kley H. K., Krueskemper H. L., (1977), *Horm. Metab. Res.*, **9**, 521—522.
162. Wiegelmann W., Solbach H. G., Kley H. K., Nieschlag E., Rüdorff K. H., Kruskemper H. L., (1978), w *Hypothalamic Hormones-Chemistry, Physiology, and Clinical Applications*, red. Gupta D., Voelter W., str. 327—333; Verlag-Chemie, Weinheim-New York.
163. Sandow J., von Rechenberg W., Jerzabek G., Stoll W., (1978), *Fertil. Steril.*, **30**, 205—209.
164. Friedrich E., Etzrodt A., Becker H., Hanker J. P., Keller E., Kleisl P., Pinto V., Schindler A. E., Schneider H. P. G., Vnderbeke O., Warder H., Wyss H. I., (1978), *Acta Endocrinol., Copenhagen*, **87**, 19—27.
165. Dutta A. S., Furr B. J. A., Giles M. B., Valcaccia B., Walpole A. L., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 382—390.
166. Johnson E. S., Gendrich R. L., White W. F., (1976), *Fertil. Steril.*, **27**, 853—860.
167. Humphries J., Wasiak T., Wan Y.-P., Folkers K., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 709—713.
168. Channabasavaiah K., Alvares F., Steward J. M., Bowers C. Y., (1980), w *Proceedings of the Sixth American Peptide Symposium*, Washington D. C., June 1979, red. Gross E., Meienhofer J., str. 803—806, Pierce Chemical Corp., Rockford.
169. Coy D. H., Mezo I., Pedroza E., Nekola M. V., Vilchez J., Pijachaturavat P., Schally A., Seprodi J., Teplan I., (1980), w *Proceedings of the Sixth American Peptide Symposium*, Washington D. C., June 1979, red. Gross E., Meienhofer J., str. 775—779, Pierce Chemical Corp., Rockford.
170. Beattie C. W., Corbin A., Foell T. J., McKinley W. A., Rees R. W. A., Sarantakis D., Yardley J. P., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 1247—1250.
171. Humphries J., Wan Y.-P., Folkers K., Bowers C. Y., (1977), *J. Med. Chem.*, **20**, 1674—1677.
172. Beattie C. W., Corbin A., Foell T. J., Garsky V., Rees R. W. A., Yardley J., (1976), *Contraception*, **13**, 341—353.
173. Yardley J. P., Foell T. J., Beattie C. W., Grant N. H., (1975), *J. Med. Chem.*, **18**, 1244—1247.
174. Phelps Ch. P., Coy D. H., Schally A. V., Sawyer Ch. H., (1977), *Endocrinology*, **100**, 1526—1532.
175. Humphries J., Wan Y.-P., Folkers K., Bowers C. Y., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 939—944.
176. Bowers C. Y., Folkers K., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **72**, 1003—1007.
177. Humphries J., Wan Y.-P., Folkers K., Bowers C. Y., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 506—509.

178. Humphries J., Wan Y.-P., Folkers K., Bowers C. Y., (1978), *J. Med. Chem.*, **21**, 120—123.
179. Humphries J., Wan Y.-P., Wasiak T., Folkers K., (1979), *J. Med. Chem.*, **22**, 774—777.
180. Ferland L., Labrie F., Coy D. H., Coy E. J., Schally A. V., (1975), *Fertil. Steril.*, **26**, 889—893.
181. Seprödi J., Coy D. H., Teplan I., Schally A. V., (1979), w *Peptides 1978. Proceedings of the Fifteenth European Peptide Symposium Gdańsk, Poland, September 1978*, red. Siemion I. Z., Kupryszewski G., str. 499—502, Wrocław University Press, Wrocław.
182. Nicolics K., Bieglmayer Ch., Seprödi J., Teplan I., Spona J., (1979), w *Peptides 1978. Proceedings of the Fifteenth European Peptide Symposium, Gdańsk, Poland, September 1978*, red. Siemion I. Z., Kupryszewski G., str. 507—510; Wrocław University Press, Wrocław.
183. Gonzales-Barcena D., Kastin A. J., Coy D. H., Nicolics K., Schally A. V., (1977), *Lancet*, **8046**, 997—998.
184. Momany F. A., Bowers C. Y., Chang J. K., (1977), w *Peptides. Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium*, red. Goodman M., Meienhofer J., str. 292—295; John Wiley, New York.

ANNA MARIA KONECKA *)

Enkefalin — aktywne biologicznie związki ośrodkowego układu nerwowego

Enkephalins — Biologically Active Compounds of Central Nervous System

Spis treści

- I. Wstęp**
- II. Odkrycie, występowanie i metabolizm enkefalin**
 - II-1. Odkrycie i wyizolowanie enkefalin**
 - II-2. Rozmieszczenie enkefalin w ośrodkowym układzie nerwowym**
 - II-3. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie**
 - II-4. Degradacja enkefalin**
 - II-5. Biosynteza enkefalin**
- III. Udział enkefalin w niektórych funkcjach ośrodkowego układu nerwowego**
 - III-1. Działanie przeciwbólowe enkefalin**
 - III-2. Wpływ enkefalin na czynności oddechowe oraz układ krążenia**
 - III-3. Wpływ enkefalin na sekrecję hormonów przysadki**
- IV. Wpływ enkefalin na aktywność cyklazy adenylowej i poziom cyklicznych nukleotydów**
- V. Aktywność biologiczna enkefalin a struktura chemiczna**
- VI. Uwagi końcowe**

Contents

- I. Introduction**
- II. Discovery, distribution and metabolism of enkephalins**
 - II-1. Discovery and isolation of enkephalins**
 - II-2. Distribution of enkephalins in central nervous system**
 - II-3. Intracellular localization**
 - II-4. Breakdown of enkephalins**
 - II-5. Biosynthesis of enkephalins**
- III. Participation of enkephalins in certain functions of central nervous system**

* Dr, Zakład Fizjologii Zachowania się Zwierząt, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, PAN, 05-551 Jastrzębiec

Polskie odpowiedniki łacińskich nazw anatomicznych podano według Bochenka A., Reichera M., (1963), Anatomia człowieka, t. 6, PZWL, Warszawa.

III-1. Analgesic action of enkephalins**III-2. The influence of enkephalins on respiratory function and cardiovascular system****III-3. The influence of enkephalins on pituitary hormones secretion****IV. The influence of enkephalins on adenylate cyclase activity and cyclic nucleotides level****V. Biological activity of enkephalins and their chemical structure****VI. Final remarks****I. Wstęp**

W ośrodkowym układzie nerwowym ważną rolę odgrywają neuroregulatory (1). Są nimi neurotransmitery (przekazniki chemiczne, mediatory), czyli substancje, które przenoszą informacje nerwowe z pre- do postsynaptycznych elementów neuronów oraz neuromodulatory. Do związków występujących w ośrodkowym układzie nerwowym i spełniających ogólnie przyjęte kryteria stawiane mediatorom (1) należą między innymi: dopamina (DA), acetylocholina (ACh), serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), kwasy asparaginowy, glutaminowy, γ -aminomasłowy (GABA).

Według teorii transmisji chemicznej, przekazywanie impulsu nerwowego pomiędzy dwoma neuronami za pośrednictwem neurotransmitera odbywa się w synapsie.

Synapsa składa się z błony presynaptycznej, stanowiącej część neuronu dostarczającego impuls, szczeliny synaptycznej i błony postsynaptycznej tj. fragmentu neuronu odbierającego impuls. Mediator syntetyzowany najczęściej, ale nie tylko, w cytoplazmie perikarionu (ciała komórki), przemieszcza się do odchodzącej od ciała komórki wypustki osiowej zwanej neurylem lub aksonem i gromadzi w pęcherzykach, w końcowej, bulwkowatej części aksonu tzw. kolbce synaptycznej, stanowiącej zakończenie synaptyczne. Pod wpływem impulsu dochodzącego do zakończenia synaptycznego, przekaznik zostaje uwolniony do szczeliny. Następnie cząsteczki mediatora wiążą się ze swoistymi miejscami receptorowymi, znajdującymi się w błonie postsynaptycznej. Wywołuje to krótkotrwałe zmiany przepuszczalności błony komórkowej dla różnych jonów, a co za tym idzie powstanie potencjału elektrycznego i pobudzenie elementu postsynaptycznego. Po krótkim czasie następuje zahamowanie działania mediatora.

Proces ten odbywa się na drodze inaktywacji przez enzymy występujące w szczelinie lub błonach synaptycznych, bądź też jak np. w przypadku dopaminy (1) przez wychwycenie i aktywny transport zwrotny do zakończenia nerwowego (ang. reuptake). Pewną rolę w usuwaniu mediatora przypisuje się również komórkom gleju (2).

Według propozycji Barchasa (1), neuromodulatory różnią się od mediatorów przede wszystkim tym, iż nie biorą bezpośredniego udziału w transsynaptycznym przekazywaniu impulsów nerwowych. Natomiast zmieniają aktywność neuronu wpływając na syntezę, uwalnianie, metabolizm oraz wiązanie neurotransmitera z receptorem. Ponadto, neuromodulator, w przeciwieństwie do mediatora, może łączyć się z różnymi receptorami, powodując wielorakie efekty.

Ostatnio wykryto w ośrodkowym układzie nerwowym grupę związków peptydowych, o morfinopodobnym działaniu, dla których zaproponowano ogólnie przyjętą nazwę endorfiny (z połączenia słów: endogenne morfiny), (3). W skład tej grupy, zwanej też peptydami morfinopodobnymi (ang. *opioid peptides*), wchodzi α -, β - i γ -endorfina oraz enkefalin. Enkefaliny i dyskusyjna wciąż jeszcze ich rola jako neurotransmiterów lub neuromodulatorów ośrodkowego układu nerwowego jest przedmiotem niniejszego artykułu.

II. Odkrycie, występowanie i metabolizm enkefalin

II-1. Odkrycie i wyizolowanie enkefalin

Do odkrycia enkefalin przyczyniły się prowadzone niezależnie przez Goldsteina i wsp. (4), Perta i Snydera (5, 6), Simona i wsp. (7) oraz Tereniusa (8) badania nad mechanizmem działania narkotyków — morfiny i jej pochodnych. W ośrodkowym układzie nerwowym łączą się one ze specyficznymi miejscami neuronu zwanymi receptorami narkotyków lub receptorami opiatowymi (ang. *opioid receptors*), (5—8). Takie cechy jak stereospecyficzne wiązanie narkotyków (5, 7, 9), nierównomierne rozmieszczenie w różnych strukturach ośrodkowego układu nerwowego (9—11) oraz występowanie w błonach synaptycznych (8, 12) nasunęły przypuszczenie, iż receptory mogą być miejscem łączenia się nie tylko z narkotykami egzogennymi, lecz przede wszystkim z nieznanym jeszcze wówczas endogennym ligandem. Przypuszczenie sformułowane w 1972 r. przez Colliera (13) a następnie przez Goldsteina (14) zapoczątkowało intensywne poszukiwania hipotetycznego związku i doprowadziło do wykrycia w ośrodkowym układzie nerwowym dwóch peptydów (15—21), nazwanych przez Hughesa i wsp. enkefalinami (18). Jednym z kryteriów aktywności biologicznej narkotyków jest hamowanie, wywołanego drażnieniem elektrycznym, skurczu izolowanego jelita świnki morskiej lub nasieniowodu myszy. Enkefaliny spełniają ten warunek (22—27). Wykazują powinowactwo do receptorów opiatowych (15—21, 28—39) i jak sugeruje wielu autorów prawdopodobnie uczestniczą w procesie transsynaptycznego przenoszenia

informacji (1, 17, 19—22, 40—42). Wskazuje się również na szerszą, neuro-modulatorową rolę enkefalin (17, 18, 20, 22, 41, 43, 44).

Po raz pierwszy obecność w ośrodkowym układzie nerwowym substancji o działaniu morfinopodobnym, zidentyfikowanych nieco później właśnie jako enkefaliny, wykryli w 1974 r. Terenius i Wahlstrom (15). Autorzy zaobserwowali, że kwaśne ekstrakty z mózgu szczura zawierają czynniki hamujące łączenie się dwuhydromorfiny z receptorem. Obecność związków o takim samym działaniu stwierdzono również w płynie mózgowo-rdzeniowym człowieka (16). W 1975 r. Pasternak wykazał (19), że w częściowo oczyszczonych ekstraktach mózgu szczura i cielęcia znajduje się niskocząsteczkowy czynnik o własnościach morfinopodobnych, wrażliwy na działanie aminopeptydazy leucynowej (E.C. 3.4.1.1) oraz karboksypeptydazy A (E.C. 3.4.2.1), co wskazywało na związek o charakterze oligopeptydu. Jednak otrzymanie enkefalin w postaci czystych związków i ustalenie budowy chemicznej przypadło grupie badaczy z Hughesem na czele (17, 18, 45). Jako źródło enkefalin posłużyły zamrożone w stałym CO₂ mózgi świni, świnki morskiej, królika lub szczura, z których po dokładnym rozdrobieniu, związki ekstrahowano acetonem zakwaszonym HCl. Po odparowaniu rozpuszczalnika i ponownej ekstrakcji powstałego osadu metanolem, dalsze etapy oczyszczania polegały na zastosowaniu chromatografii jonowymiennej i sączenia molekularnego przez Sephadex G-15 (17, 18). Autorzy, podobnie jak poprzedni badacze, stwierdzili, że otrzymana substancja jest wrażliwa na działanie aminopeptydazy leucynowej i karboksypeptydazy A, nie obserwowano natomiast zmian aktywności biologicznej po potraktowaniu preparatu trypsyną, α -chymotrypsyną i karboksyoesterazą (E.C. 3.1.1.1). Wstępne oznaczenie ciężaru cząsteczkowego sugerowało, iż jest to prawdopodobnie niskocząsteczkowy peptyd (17, 18).

Chociaż istniały już pewne przesłanki, określenie budowy chemicznej enkefalin było zadaniem niełatwym, gdyż ich stężenie jest małe i wynosi w mózgu szczura zaledwie 79 ng/g i 150 ng/g w mózgu królika (20). Jednak głównie dzięki zastosowaniu metody spektrometrii masowej wykazano, że wyizolowane z mózgu enkefaliny są mieszaniną dwóch penta-peptydów o jednakowej sekwencji w pozycjach 1—4 (H—Tyr¹—Gly²—Gly³—Phe⁴), a różniących się tylko C-końcowym aminokwasem (45). Metionina w jednym, a leucyna w drugim peptydzie jest C-końcowym aminokwasem i stąd nazwy odkrytych peptydów — metionino—enkefalina (Met-enkefalina) i leucyno—enkefalina (Leu-enkefalina). Sekwencję aminokwasów w Met- i Leu-enkefalinie przedstawia ryc. 1.

Prowadzone niezależnie prace nad izolowaniem enkefalin pozwoliły otrzymać je z mózgu wielu gatunków ssaków (17, 19, 20, 28, 31, 46—50), ptaków, gadów i ryb (48). Nie udało się natomiast stwierdzić ich obecności w układzie nerwowym bezkręgowców (48).

w korze mózgowej (20, 30, 52, 54). W tym obszarze wahają się one u szczura od 0,35 ng Met—enkefalin/mg białka (54) do 0,98 ng/mg białka (52). Mimo, iż wyniki ilościowe wahają się w szerokich granicach, wykazują zgodność względnych stosunków enkefalin pomiędzy poszczególnymi obszarami ośrodkowego układu nerwowego.

Większość przeprowadzonych badań nie wykazała obecności enkefalin w mózdku (40, 49, 52, 55, 57). Jedynie nieznaczne ilości występują w tej strukturze mózgu u małpy (47) i krowlika (22).

Ilościowy stosunek obu peptydów, aczkolwiek różny w poszczególnych obszarach ośrodkowego układu, wskazuje na około 5—10-krotnie większą zawartość Met—enkefalin niż leucynowego analogu (22, 58, 63). Odmienne zależności zaobserwował Simantov w mózgu wołu (21, 28), gdzie zawartość Leu—enkefalin około 4-krotnie przewyższała ilość peptydu metioninowego. Na podkreślenie zasługuje również fakt jednoczesnego występowania enkefalin i receptorów opiatowych w tych samych obszarach ośrodkowego układu nerwowego (38, 46, 64—68).

Badania ostatnich lat wskazują ponadto na występowanie enkefalin poza ośrodkowym układem nerwowym, a mianowicie w splotach Auerbacha i Meissnera jelita (20, 49, 60, 69, 75), zwojach nerwowych szyjnym górnym (*ganglion cervicale superior*) i słonecznym (*ganglion coeliacum*), (76, 77), zakończeniach nerwu trzewnego (*n. splanchnicus*) unerwiających rdzeń nadnerczy (78, 79), a także w komórkach rdzenia nadnerczy u szczura, świnki morskiej i kota (78—80). To ostatnie jest jedynym, obecnie znanym miejscem występowania enkefalin poza komórką nerwową.

II-3. Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie

Podczas homogenizacji tkanki mózgowej w izotonicznym roztworze sacharozy lub mannitolu zakończenia nerwowe ulegają oderwaniu od aksonu tworząc zamknięte, otoczone błoną plazmatyczną struktury zwane synaptosomami. Synaptosomy zawierają pęcherzyki synaptyczne zwykle wypełnione mediatorem, mitochondria i synaptoplazmę. Stwierdzono, że we frakcji synaptosomalnej otrzymanej techniką wirowania różnicowego znajduje się około 60% enkefalin zawartych w homogenacie mózgu szczura (19, 21, 36, 47, 49, 81, 82). Rozmieszczenie enkefalin w obrębie synaptosomów było przedmiotem badań Simantova i wsp. (82). Po rozdzieleniu frakcji synaptosomalnej przez wirowanie w nieciągłym gradiencie stężeń sacharozy na podfrakcje zawierające pęcherzyki synaptyczne i błony plazmatyczne, enkefaliny znajdowano głównie w tej ostatniej. Autorzy stwierdzili jednak, iż są one słabo związane z błonami plazmatycznymi i łatwo przechodzą do supernatantu podczas wirowania przy obrotach 100.000×g.

Synaptosomy są także strukturami dogodnymi do badania takich procesów charakterystycznych dla zakończeń nerwowych jak aktywny transport jonów, synteza oraz uwalnianie mediatora do środowiska zewnętrznego, które zachodzi w warunkach powodujących depolaryzację błon plazmatycznych. Zaobserwowano (83), że tej samej zasadzie podlega uwalnianie enkefalin. W wyniku depolaryzacji błon plazmatycznych we-ratrydyną lub jonami potasu o odpowiednio dużym stężeniu (50 mM) następowało uwalnianie Met- i Leu-enkefalin z frakcji synaptosomalnej homogenatów ciała prądkowanego królika oraz skrawków prądkowia świnki morskiej. Uzyskane rezultaty potwierdzili inni badacze (84—86). Autorzy wyrażają zgodny pogląd iż te wyniki mogą świadczyć o roli enkefalin jako neurotransmiterów ośrodkowego układu nerwowego.

Badania wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia enkefalin prowadzono nie tylko metodami biochemicznymi. Przy pomocy techniki histoimmunofluorescencyjnej (72, 87—92) stwierdzono obecność Met— i Leu—enkefalin zarówno w aksonach jak i ich zakończeniach w wielu strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Aksony, a właściwie ich zakończenia, nie są jedynym miejscem występowania Met— i Leu—enkefalin w neuronach (92—94). Po uprzednim podaniu szczurom kolchicyny, w badanych obszarach mózgu i rdzenia kręgowego znajdowano enkefalinę głównie w perikarionach. Ponieważ kolchicina hamuje transport z ciał komórkowych do aksonów (95), uzyskane wyniki nabierają istotnego znaczenia dla wyjaśnienia roli enkefalin w ośrodkowym układzie nerwowym, jak też prawdopodobnego miejsca ich syntezy w neuronie.

II-4. Degradacja enkefalin

Już w pierwszych pracach związanych z izolowaniem i identyfikacją enkefalin sugerowano, że są to związki o krótkotrwałym działaniu, a szybki zanik aktywności biologicznej wiązano z ich rozkładem przez enzymy proteolityczne (17—19, 21, 29, 46).

Pierwszą próbę wyjaśnienia mechanizmu enzymatycznego rozkładu enkefalin podjął Hambrook i wsp. (96). Po 10 minutowej inkubacji znakowanej trytem Met—enkefalin z osoczem krwi szczura, wyodrębniono i identyfikowano powstające metabolity. Stwierdzono, że głównym produktem rozpadu jest nieaktywny biologicznie tetrapeptyd o sekwencji H—Gly—Gly—Phe—Met—OH(dez-Tyr¹—Met—enkefalina). Przedłużenie czasu inkubacji powodowało całkowity rozpad Met—enkefalin do wolnych aminokwasów. Podobne wyniki otrzymano po inkubacji Leu—enkefalin z osoczem krwi szczura lub człowieka (96).

Na tej podstawie zaproponowano jednakowy mechanizm rozkładu obu peptydów w osoczu krwi (96). Pierwszym i najważniejszym etapem prowadzącym do utraty aktywności biologicznej jest rozerwanie wiąza-

nia peptydowego między Tyr¹ a Gly². Wskazują na to również wyniki doświadczeń prowadzonych *in vitro* przez innych badaczy (97, 98). Podobny rozkład Met—enkefalin, podanej dożylnie, zaobserwował Dupont u szczurów *in vivo* (99). Rozbicie wiązania między Tyr¹ a Gly², jako pierwszy etap degradacji enkefalin, zachodzi także w mózgu *in vitro* podczas inkubacji Met— lub Leu—enkefalin ze skrawkami (100), homogenatami (44, 96, 101—105) i frakcjami subkomórkowymi (39, 99, 106—111). Wykazano że degradacja enkefalin w mózgu *in vivo* nie różni się od przedstawionej powyżej *in vitro* (109). Okazało się bowiem, że już po 30 sekundach od wprowadzenia szczurom znakowanej trytem Leu—enkefalin do bocznej komory mózgu ponad 90% radioaktywności odnajdywano w tyrozynie jako głównym produkcie rozkładu peptydu. Podobne zjawisko zaobserwowano również dla Met—enkefalin.

Zidentyfikowanie tyrozyny jako głównego produktu rozkładu enkefalin wskazuje na udział aminopeptydaz (39, 44, 96—99, 104, 107—110, 112), wykazujących szeroką specyficzność substratową i występujących powszechnie w wielu tkankach i narządach, w tym w osoczu krwi i mózgu. Wiele faktów doświadczalnych przemawia za tym, że rozkład wiązania między tyrozyną a glicyną katalizuje aminopeptydaza leucynowa (19, 39, 46, 54, 98, 107). Obie enkefalin (54) po inkubacji z tym enzymem tracą całkowicie aktywność biologiczną oraz zdolność łączenia się z przeciwciałem. Wyniki innych badań świadczą jednak, iż w homogenatach i frakcjach subkomórkowych mózgu, w przeciwieństwie do osocza krwi, bardziej prawdopodobny jest udział innego niż aminopeptydaza leucynowa enzymu. Zaobserwowano bowiem, że puromycyna nie ma żadnego wpływu na degradację enkefalin przez aminopeptydazę leucynową oraz osocze krwi, podczas gdy hamuje hydrolizę wiązania peptydowego między Tyr¹ a Gly² przez homogenaty mózgu (103, 105, 108). Co więcej, ostatnio uzyskano z frakcji postmitochondrialnej mózgu szczura około 2.000-krotnie oczyszczoną aminopeptydazę, która jak się wydaje, jest odpowiedzialna za rozkład tego właśnie wiązania w enkefalinach (113). Enzym różnił się od aminopeptydazy leucynowej specyficznością substratową, znacznie większym powinowactwem do enkefalin, ciężarem cząsteczkowym, optimum pH (około 7,0), a przede wszystkim wrażliwością na inhibitory. O-t-butylo-treonylo-fenylalanylo-prolina(H—(tBut)—Thr—Phe—Pro—OH), niezwykle silny i specyficzny inhibitor aminopeptydazy leucynowej, nie miała wpływu na jego aktywność (113), podczas gdy puromycyna wywierała działanie hamujące.

Kilku autorów zasygnalizowało tworzenie się, niezależnie od tyrozyny, innych produktów katabolizmu enkefalin. Dupont i wsp. (99) stwierdzili obecność tyrozylo-glicylo-glicyny. Podobnie Marks (101) i Jaquet (44) obserwowali pojawianie się glicylo-glicyny po 10 minutowej inkubacji Met— lub Leu—enkefalin z homogenatami mózgu szczura. Te dane wskazywałyby, że miejscem ataku enzymów proteoli-

tycznych jest także wiązanie peptydowe między Gly³ a Phe⁴. W ostatnich dwóch latach pojawiły się prace potwierdzające możliwość istnienia tego odmiennego niż dotychczas sugerowano sposobu degradacji Met— i Leu—enkefalin. Po inkubacji enkefalin z homogenatami mózgu szczura nie stwierdzono oprócz tyrozyny innych produktów rozpadu (114). Ponadto, kolejne supernatanty uzyskane z przemywania osadu odwirowanego homogenatu powodowały uwalnianie coraz mniejszych ilości tego aminokwasu, sugerując, iż proces katalizuje luźno związana ze strukturami komórkowymi i łatwo rozpuszczalna aminopeptydaza. Natomiast podczas inkubacji z frakcją kilkakrotnie przemywanych błon plazmatycznych powstawał jako główny produkt wspomniany już wyżej trójpeptyd Tyr¹—Gly²—Gly³ i nieznaczne tylko ilości tyrozyny. Craves (115) i Malfray (116) potwierdzili ten fakt. Nadto wykazano, że wysoce oczyszczone frakcje błon plazmatycznych ciała prądkowanego myszy zawierają peptydazy, silnie związane z błonami i charakteryzujące się niskim oraz wysokim powinowactwem do enkefalin (116). Pierwsza z nich, aminopeptydaza o K_m rzędu około 100 μM, katalizuje odłączanie tyrozyny. Druga — karboksypeptydaza dwupeptydylowa o wysokim powinowactwie do enkefalin, charakteryzuje się niską wartością K_m (90 nM) i powoduje tworzenie trójpeptydu Tyr¹—Gly²—Gly³ (116). Natury tego enzymu nie poznano jeszcze w dostatecznym stopniu, aczkolwiek niektóre dane kinetyczne wskazują, że jest on prawdopodobnie identyczny z enzymem przekształcającym angiotensynę I do angiotensyny II (E.C. 3.4.15.1). Wykazano (114, 119) ścisłą współzależność między obecnością i ilością receptorów opiatowych w różnych obszarach mózgu a aktywnością enzymu katalizującego tworzenie Tyr—Gly—Gly, natomiast nie stwierdzono takiej zależności dla aminopeptydaz. Ponadto wykazano (115), że metabolitem powstającym u szczurów *in vivo* nie jest tyrozyna, jak to sugerowano we wcześniejszych pracach ale głównymi, identyfikowanymi związkami są tyrozylo-glicylo-glicyna oraz tyrozylo-glicyna.

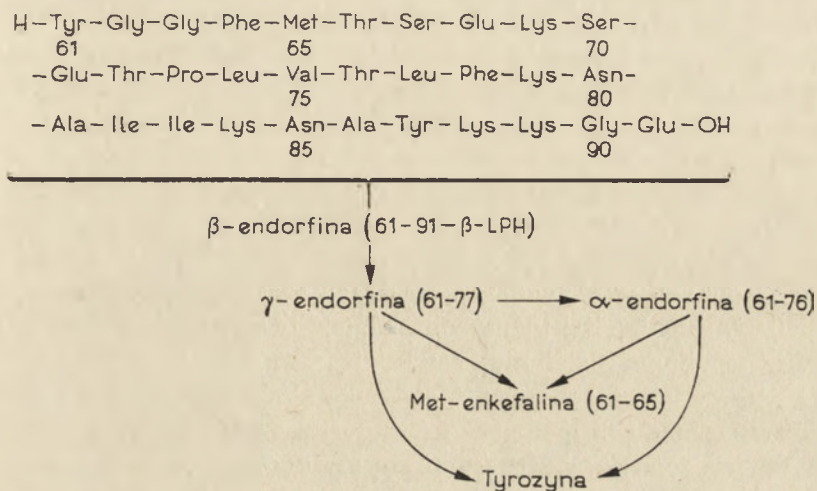
Autorzy powyższych badań są zgodni, iż ten właśnie sposób rozkładu odgrywa prawdopodobnie główną rolę w regulacji działania enkefalin w obrębie synapsy, podczas gdy degradacja katalizowana przez aminopeptydazy jest charakterystyczna raczej dla procesów zachodzących *in vitro* lub związana z wewnątrzkomórkowym metabolizmem Met— lub Leu—enkefalin (114—116, 119).

Utratę aktywności biologicznej enkefalin powodują również karboksypeptydazy A i B, odłączające C-końcowy aminokwas (19, 22, 46, 54).

II-5. Biosynteza enkefalin

Obecny stan badań nad biosyntezą enkefalin nie pozwala jeszcze na ustalenie ich pochodzenia w ośrodkowym układzie nerwowym. Po ich odkryciu, uwagę wielu badaczy skupiła β-lipotropina. Ten peptydowy

peptydazy mózgu szczura, których natury jeszcze dokładnie nie poznano przedstawia rycina 3. Brak jest dotychczas danych potwierdzających, że proces ten zachodzi *in vivo*.



Ryc. 3. Rozkład β-endorfiny przez endopeptydazy mózgu szczura *in vitro* (wg 162)

Większość niskocząsteczkowych peptydów powstaje u zwierząt w wyniku enzymatycznej hydrolizy dłuższych prekursorów. Brak jest jednak ostatecznych dowodów przemawiających za faktem, że również enkefaliny są produktem rozpadu dłuższych peptydów — endorfin, a nie związkami powstającymi w mózgu *de novo*. Pewne przesłanki sugerują inną, aczkolwiek nie w pełni poznaną drogę powstawania enkefalin w ośrodkowym układzie nerwowym. Kobayashi (57) i inni badacze (52, 53, 165) nie zaobserwowali spadku zawartości Met— i Leu—enkefaliny w różnych obszarach mózgu szczura po usunięciu przysadki, co sugeruje że związki te nie pochodzą z rozpadu przysadkowych endorfin. Z badań Kenessey i Gráfa (166) wynika, że wprowadzanie enzymy rozkładające β-endorfina występują zarówno w przysadce jak i mózgu, ale produktami hydrolizy są głównie α i γ-endorfina. Stężenie Met—enkefaliny uwalnianej z synaptosomów prądkowia królika, które stymulowano chemicznie jonami K⁺, nie wzrastało po dodaniu do środowiska inkubacyjnego β-endorfiny (83). Badania Blooma (167), Rossiera (51) i innych (59, 168) wskazują, że β-endorfina i Met—enkefalina występują prawdopodobnie w odrębnych neuronach. Tak więc wzajemne relacje między tymi dwoma związkami są nadal dyskusyjne. Natomiast, jeżeli β-lipotropina jest prekursorem Met—enkefaliny, to zapewne musi występować w ośrodkowym układzie nerwowym niezależna od przysadkowej, pula tego związku. Wprawdzie wykazano na podstawie badań immunohistochemicznych (169, 170) obecność β-lipotropiny w wielu obszarach

mózgu szczura, jednakże zagadnienie zależności między β -lipotropiną a Met—enkefaliną pozostaje nadal otwarte, gdyż nie wszędzie oba związki występują jednocześnie (170). Np. gałka biała charakteryzująca się dużą zawartością Met—enkefaliny nie zawiera β -lipotropiny (169).

β -Lipotropina i β -endorfina nie mogą być prekursorami Leu—enkefaliny, ponieważ nie zawierają w pozycji 65 leucyny. Niektórzy sądzą, że Leu—enkefalina powstaje *in vivo* w wyniku interkonwersji z Met—enkefaliny, aczkolwiek brak jest danych doświadczalnych potwierdzających ten pogląd (171).

Ostatnio, pojawiły się nowe dane o pochodzeniu Met—enkefaliny z innych prekursorów niż β -lipotropina i β -endorfina. Z ciała prądkowanego szczura, świnki morskiej i wołu otrzymano białka (172) nie wykazujące morfinopodobnych właściwości, o ciężarach cząsteczkowych około 40 000 i 100 000. W wyniku trawienia obu białek trypsyną uzyskano peptydy o morfinopodobnym działaniu, zawierające mniej niż 9 aminokwasów. Te przypuszczalne prekursory Met—enkefaliny różniły się jednak od produktów rozkładu β -lipotropiny i β -endorfiny przez endopeptydazy. Podobnie stwierdzono w jądrze ogoniastym (*nucleus caudatus*) wołu występowanie dwóch peptydów o morfinopodobnych właściwościach i ciężarze cząsteczkowym większym od Met—enkefaliny (173). Opierając się na zdolności wiązania przeciwciał wykluczono możliwość, że wykryte peptydy są α - lub β -endorfina.

Pewne światło na pochodzenie Leu—enkefaliny rzuciły badania K a n g a w y i wsp. (174). Z 30 000 podwzgórz świni autorzy wyizolowali 15—aminokwasowy peptyd o morfinopodobnym działaniu — α -neo-endorfinę. Określona metodą dansylową sekwencja 8 początkowych aminokwasów N-końca peptydu okazała się następująco: H—Tyr¹—Gly²—Gly³—Phe⁴—Leu⁵—Arg⁶—Lys⁷—Arg⁸. Obecność leucyny w pozycji 5 sugeruje, iż jest to być może, poszukiwany prekursor Leu—enkefaliny. W płynie mózgowo-rdzeniowym człowieka wykryto również (175) peptyd o działaniu morfinopodobnym, wiążący przeciwciała przeciw Leu—enkefalinie, ale o ciężarze cząsteczkowym większym niż pięciopeptyd.

Przedstawione dane dotyczące biosyntezy enkefali w ośrodkowym układzie nerwowym stanowią wciąż jeszcze niepełny i zmieniający się obraz. Należy się jednak spodziewać, że najbliższe lata powinny przynieść rozwiązanie tego problemu.

III. Udział enkefalin w niektórych funkcjach ośrodkowego układu nerwowego

Enkefaliny — endogenne ligandy receptorów opiatowych występują w szeregu struktur ośrodkowego układu nerwowego pełniących różne funkcje fizjologiczne. Mimo pewnych niejasności i rozbieżności wyników określających rolę enkefalin w ośrodkowym układzie nerwowym, wiele

danych wskazuje na bezpośredni lub pośredni — poprzez oddziaływanie na neurotransmitery np. acetylocholinę (176, 177) — udział enkefalin w takich funkcjach ośrodkowego układu jak: regulacja percepcji bólu, czynności oddechowe, reakcje stressowe organizmu (1, 178, 179), termoregulacja (180), wpływ na wydzielanie hormonów oraz na behavior (1, 44, 181—195). Stein i wsp. (193) sugerują, iż enkefaliny są prawdopodobnie ważnym czynnikiem w procesach zapamiętywania. Wskazywać na to mogą również badania Rigtera (198), który wykazał, że systematyczne wprowadzanie do mózgu niskich dawek enkefalin powoduje zmniejszenie sztucznie wywołanej amnezji u szczurów. Niektórzy badacze przypisują enkefalinom zdolność wywoływania napadów padaczkowych u zwierząt (196, 197). Podobnie do morfiny, ciągła, długotrwała infuzja enkefalin do mózgu powoduje u zwierząt tolerancję i zależność (191, 199, 200). Fakt ten ma istotne znaczenie, szczególnie dla prognozowania syntezy oraz ocenie działania nowych leków o budowie zbliżonej do enkefalin.

Ze względu na ograniczone ramy artykułu, tylko niektóre efekty działania enkefalin omówiono poniżej.

III-1. Działanie przeciwbólowe enkefalin

Występowanie enkefalin w istocie szarej środkowej śródmózgowia jest niezwykle interesujące ze względu na postulowany udział tego obszaru mózgu w percepcji bólu. Uśmierzające ból działanie enkefalin wykazali po raz pierwszy Belluzzi u szczurów (201) i Büscher u myszy (202). Po iniekcji Met— lub Leu—enkefaliny do bocznej komory mózgu w pobliżu istoty szarej zaobserwowano opóźnienie cofania ogona w odpowiedzi na termiczny bodziec bólowy. Nawet tylko częściowo oczyszczone preparaty enkefalin, uzyskane z mózgu wołu, po wprowadzeniu do istoty szarej śródmózgowia wywierały działanie przeciwbólowe (203). Przeciwbólowe działanie enkefalin potwierdzili inni badacze (197, 204—210). Niektórzy autorzy nie zaobserwowali jednak tego efektu (44, 211—214).

Poza istotą szarą środkową śródmózgowia w regulacji percepcji bólu uczestniczą prawdopodobnie jądra szwu (*nuclei raphe*) i jądro nerwu trójdzielnego (*nucleus nervi trigemini*) znajdujące się w pniu mózgu oraz rdzeń kręgowy (62, 87). Występowanie receptorów opiatowych w obrębie istoty galaretowatej (*substantia gelatinosa*) rogów tylnych (*cornu dorsalis*) rdzenia kręgowego (65, 215) przyczyniło się do wykazania przeciwbólowego działania enkefalin również w tym obszarze ośrodkowego układu nerwowego (216).

Mechanizmu przeciwbólowego działania enkefalin nie wyjaśniono jednoznacznie. Niektórzy badacze uważają, że mogą one odgrywać w per-

cepcji bólu rolę neurotransmiterów procesów hamowania tzn. blokować przekazywanie czy też powstanie nocycyptywnych impulsów (40, 62, 217—230). Pewne potwierdzenie tej hipotezy osiągnięto stosując mikrojontoforezę. Udało się bowiem wykazać, że po jontoforetycznym wprowadzeniu Met— lub Leu—enkefalin w pobliże pojedynczych neuronów istoty szarej śródkowej śródmózgowia szczura (218), rdzenia kręgowego kota (221—223) lub pnia mózgu szczura (224, 225) i kota (226, 227) następuje zahamowanie ich spontanicznej aktywności.

Sugeruje się także, iż przeciwbólowe działanie enkefalin polega na współdziałaniu z układem serotoninoergicznym (228, 229).

Obecnie coraz częściej przysuwa się rolę neurotransmitera przenoszącego doznania bólowe za pośrednictwem szlaku rdzeniowo-wzgórzowego bocznego (*tractus spino-thalamicus lateralis*) substancji P, uwalnianej prawdopodobnie na poziomie pierwszej synapsy z tzw. neuronów I rzędu, których perikariony znajdują się w zwojach rdzeniowych oraz zwoju półksiężycowatym (*ganglion semilunare*) Gassera (230—235). Sądzi się, że pierwsza synapsa znajduje się w obrębie istoty galaretowatej rogów tylnych rdzenia kręgowego i nerwu trójdzielnego pnia mózgu, a więc obszarów gdzie występują znaczne ilości substancji P, enkefalin oraz receptory opiatowe (232, 235—239). Na tym tle zależności między enkefalinami i substancją P wydają się interesujące. Uszkodzenie zwojów rdzeniowych (232) lub zwoju Gassera (235) powoduje spadek zawartości substancji P oraz ilości receptorów narkotyków w istocie galaretowatej nerwu trójdzielnego i rogów tylnych, natomiast nie obniża poziomu enkefalin, sugerując, iż oba związki występują w odrębnych neuronach. Badania immunohistochemiczne wskazują na istnienie w istocie galaretowatej akso—aksonowych połączeń, prawdopodobnie typu interneuronów, między enkefalinoergicznymi a neuronami zawierającymi substancję P (88, 215, 239). Ponadto wykazano, że enkefalin hamują *in vitro* uwalnianie substancji P ze skrawków jądra nerwu trójdzielnego (232). Cu ello (235) zaproponował hipotezę, iż działanie przeciwbólowe enkefalin polega na presynaptycznym hamowaniu uwalniania substancji P, co znajduje potwierdzenie w badaniach innych (88, 227, 240).

Zaobserwowano, iż intensywność przeciwbólowego działania Leu—enkefalin jest mniejsza niż Met—enkefalin, a oba związki, mimo stosowania wyższych dawek powodują efekt krótkotrwały i słabszy niż morfina (201, 202). Proponowana rola enkefalin jako mediatorów uzasadnia to krótkotrwałe działanie (241). Co więcej, w ośrodkowym układzie nerwowym występują funkcjonalnie różne receptory opiatowe — σ , κ i μ (242—244), przy czym efekty przeciwbólowe są prawdopodobnie udziałem tych ostatnich (197). Wykazano (245), iż powinowactwo enkefalin do receptorów μ jest znacznie mniejsze niż morfiny. Być może tym należy tłumaczyć słabszy, w porównaniu z morfiną, efekt przeciwbólowy Met— i Leu—enkefalin.

Enkefaliny nie wywierają działania przeciwbólowego po wprowadzeniu dożylnym (202). Nie wiadomo jednak czy wiąże się to tylko z szybkim rozkładem obu peptydów przez peptydazy krwi, czy też, jak sugerują niektórzy, również z trudnością przenikania przez barierę krew—mózg (246). W świetle badań Voigtlandera i wsp. (214) wykazujących, iż u myszy Met—enkefalina łatwo penetruje z krwi do mózgu, ta ostatnia interpretacja wydaje się kontrowersyjna. Nie wykluczone, iż działają tu inne, nie poznane jeszcze mechanizmy.

III-2. Wpływ enkefalin na czynności oddechowe oraz układ krążenia

Podanie Met—enkefaliny do IV komory mózgu kota powoduje obniżenie częstości oddechów (247). Specyficzny antagonistą enkefalin — nalokson znosi ten efekt, co sugeruje udział receptorów opiatowych. Miejscem bezpośredniego działania Met—enkefaliny są prawdopodobnie struktury mostu (248).

Enkefaliny wywierają także działanie na umiejscowiony w pniu mózgu ośrodek krążenia. Wprowadzenie szczyrom Met— lub Leu—enkefaliny do zbiornika wielkiego (*cisterna magna*) wywołuje odwracalny przez nalokson wzrost ciśnienia krwi (249). Leu—enkefalina okazała się aktywniejsza od Met—enkefaliny gdyż wywierała efekt już w stężeniach od 1,8 do 180 nmoli. Natomiast peptyd metioninowy w stężeniach od 17 do 520 nmoli. Podobne działanie obu peptydów wykazał Simon (250), natomiast Laubie (251) nie stwierdził tego efektu u psów po wprowadzeniu Met—enkefaliny do zbiornika wielkiego mózgu.

III-3. Wpływ enkefalin na sekrecję hormonów przysadki

Stwierdzenie obecności zakończeń neuronów enkefalinoergicznych w zewnętrznej warstwie wyniosłości pośrodkowej (*eninentia mediana*) podwzgórza (87) zapoczątkowało szereg badań dotyczących wpływu enkefalin na sekrecję hormonów przedniego płata przysadki.

Po wprowadzeniu Met—enkefaliny do III komory mózgu zaobserwowano (252) około 4-krotny wzrost stężenia prolaktyny w osoczu krwi szczurów. Podobne działanie zarówno Met—enkefaliny, jak i Leu—enkefaliny wykazali inni (60, 253—258). Syntetyczne analogi enkefalin z D-alaniną w pozycji 2 i amidem metioniny w położeniu 5 okazały się efektywniejszymi stymulatorami uwalniania hormonu i powodowały kilkanaście razy większy wzrost stężenia prolaktyny we krwi niż rodzime peptydy (255, 259—265).

Mechanizmy działania enkefalin nie są jeszcze w pełni poznane. Następujące jednak fakty sugerują udział receptorów opiatowych podwzgo-

rza. Po pierwsze — w doświadczeniach *in vitro* — w których przysadkę szczura inkubowano w środowisku zawierającym Met—enkefalinę, nie stwierdzono wzrostu sekrecji prolaktyny z gruczołu (260, 266). Wydaje się więc, że enkefaliny nie wywierają bezpośredniego wpływu na przysadkę. Po drugie — dożylna lub dokomorowa iniekcja szczurom naltreksonu znosi efekt działania enkefalin. Natomiast związek ten nie wpływa na sekrecję hormonu z przysadki *in vitro* (267). Wprawdzie powyższe wyniki wskazują na podwzgórze jako miejsce bezpośredniego działania enkefalin, nasuwa jednak się pytanie czy efekt stymulujący wiąże się ze wzrostem poziomu podwzgórzowego hormonu uwalniającego prolaktynę z przysadki (PRH), czy też obniżeniem stężenia czynnika hamującego uwalnianie prolaktyny (PIF), którym jest prawdopodobnie dopamina (268). Pewne światło na omawiany problem rzuciły badania Ferlanda i wsp. (256), którzy po dokomorowej iniekcji Met—enkefaliny szczurom zaobserwowali nagromadzenie się dopaminy w wyniosłości pośrodkowej i jednocześnie wzrost sekrecji prolaktyny z przysadki do krwi. Fakt ten autorzy tłumaczą zmniejszeniem liczby obrotów dopaminy oraz zahamowaniem jej uwalniania z neuronów.

Większość prac nad wzajemnymi relacjami enkefaliny-neurony dopaminoergiczne dotyczy ciała prążkowanego, obszaru mózgu o dużej zawartości obu typów związków. Mimo, iż niektóre wyniki nawzajem sprzeczne wymagają dalszego udokumentowania doświadczalnego, działające tu mechanizmy są lepiej poznane i mogą przyczynić się do wyjaśnienia zależności w podwzgórze. Uzasadnione jest więc przytoczenie badań w tym właśnie miejscu. I tak Calderini (269) zaobserwował, że w ciele prążkowanym i niektórych strukturach układu limbicznego (*nucleus accumbens*, ciało migdałowate) Met—enkefalina hamuje syntezę dopaminy z tyrozyny oraz zmniejsza liczbę obrotów, co przejawia się spadkiem poziomu katabolitów tego mediatora — DOPAC (kwas 3,4-dwuhydroksyfenylooctowy) i 3—MT (4-hydroksy-3-metoksyfenyloetyloamina). Podobne wyniki otrzymał Biggio (270). Natomiast Algeri (271) nie stwierdził ilościowych zmian metabolitów dopaminy. Jednoznaczne rezultaty uzyskano badając metabolizm dopaminy w ciele prążkowanym szczura pod wpływem analogu Met—enkefaliny — D—Ala²—Met—enkefalinamidu. Badania prowadzone niezależnie w kilku ośrodkach wykazały, iż po dokomorowym wprowadzeniu związku następuje zwiększenie stężenia katabolitów dopaminy — DOPAC i HVA (kwas 4-hydroksy-5-metoksyfenylooctowy) oraz wzrost poziomu bezpośredniego prekursora dopaminy — DOPA (3,4-dwuhydroksyfenyloalanina), (269—273).

Interesujące wnioski wynikają z badań nad umiejscowieniem receptorów opiatowych w ciele prążkowanym. Po selektywnym zniszczeniu neuronów dopaminoergicznych na skutek wprowadzenia 6-hydroksydopaminy lub elektrokoagulacji istoty czarnej, której neurony dają projekcję

do ciała prądkowanego, obserwowano w tym ostatnim obszarze zmniejszenie liczby receptorów narkotyków (274—276). Iniekcja do ciała prądkowanego kwasu kainowego, uszkadzającego perikariony, również powoduje zmniejszenie liczby miejsc receptorowych oraz spadek zawartości enkefalin, ale nie ma żadnego wpływu na wzrost stężenia metabolitów dopaminy, obserwowany po wprowadzeniu aktywnego analogu Met—enkefalin (273, 274). Charakter zmian nasuwa przypuszczenie, że część receptorów opiatowych ciała prądkowanego umiejscowiona jest prawdopodobnie presynaptycznie na neuronach dopaminoergicznych (171, 273—277). Aktywacja receptorów wpływa na wewnątrzkomórkowy metabolizm dopaminy i jednocześnie obniża lub hamuje uwalnianie mediatora z neuronów. To ostatnie znalazło potwierdzenie w doświadczenia *in vitro* (278).

Nie wykluczone, że stymulacja sekrecji prolaktyny z przysadki polega na aktywacji przez enkefaliny podobnie umiejscowionych receptorów opiatowych na neuronach dopaminoergicznych podwzgórza.

Należy ponadto odnotować pobudzający wpływ enkefalin i ich analogów na sekrecję hormonu wzrostu (GH), (253—255, 259, 262, 265) oraz hamujący uwalnianie z przysadki hormonu luteinizującego (LH), hormonu dojrzewania pęcherzyków (FSH) i tyreotropiny (TSH), (254, 265, 279). Prawdopodobnie regulacja sekrecji wiąże się z działaniem enkefalin na podwzgórzowe hormony uwalniające. W badaniach *in vitro* zaobserwowano np., że Met—enkefalina hamuje wydzielanie LH—RH (hormon uwalniający hormon luteinizujący) z części przysadkowej podwzgórza szczura (280).

Sugeruje się również bezpośredni udział enkefalin w regulacji wydzielania wazopresyny z części nerwowej (*pars nervosa*) przysadki (281). Ten 9-cio aminokwasowy peptyd o działaniu antydiuretycznym powstaje w jądrze nadwzrokowym (*nucleus supraopticus*) podwzgórza, skąd wzdłuż aksonów podwzgórzowo-przysadkowych następuje transport do części nerwowej przysadki. Doświadczenia prowadzone przez badaczy z pracowni Guillemina (281) wskazują, iż neurony enkefalinoergiczne jądra nadwzrokowego dają projekcję do części nerwowej przysadki i regulacja sekrecji wazopresyny do krwioobiegu zachodzi prawdopodobnie tą drogą (281). Zaobserwowano bowiem równoległość między zawartością enkefalin w zakończeniach neuronów a ilością hormonu w części nerwowej. Ponadto po dokomorowej iniekcji Met—enkefalin następowало u szczurów zmniejszone oddawanie moczu i jednoczesny wzrost stężenia wydalanej wazopresyny (282).

IV. Wpływ enkefalin na aktywność cykazy adenyłowej i poziom cyklicznych nukleotydów

Wiele danych przemawia za tym, iż interakcja enkefalin z receptorem opiatowym powoduje zmiany stężeń cyklicznych nukleotydów oraz

aktywności cyklazy adenylowej. W warunkach *in vitro* enkefalin, podobnie jak morfina, hamują aktywność cyklazy adenilowej i obniżają wewnątrzneuronalny poziom cyklicznego AMP, przy czym specyficzny antagonist — nalokson znosi ten efekt (283). Najsilniejszym inhibitorem okazała się Met—enkefalina. K_i wynosząca 12 nmoli jest około 3-krotnie niższa w porównaniu z wartością K_i dla Leu—enkefalin (40 nmoli) i około 125-razy mniejsza od stałej inhibitorowej morfiny. Oba peptydy wywierają jednak efekt krótkotrwały, co prawdopodobnie świadczy o ich rozkładzie w lub pobliżu miejsca receptorowego. Powyższe wyniki potwierdzili inni badacze (284—288). Wykazano ponadto, iż równolegle ze spadkiem aktywności cyklazy adenylowej i poziomu cAMP następuje wzrost stężenia cyklicznego GMP, jednakże w odróżnieniu od poprzedniego, Leu—enkefalina jest tu silniejszym aktywatorem niż metioninowy analog (284—286). Prawdopodobnie odmienne działanie na cykliczne nukleotydy jest wynikiem interakcji enkefalin z różnymi typami receptorów opiatowych, co w dalszej konsekwencji powoduje tak liczne efekty fizjologiczne.

V. Aktywność biologiczna enkefalin a struktura chemiczna

Fakt, iż Met— i Leu—enkefalina są pentapeptydami, umożliwiającą syntezę dużej ilości analogów zawierających w różnych położeniach aminokwasy zmodyfikowane lub wymienione na inne (289—306) pozwolił, w stosunkowo krótkim czasie od odkrycia enkefalin, ustalić zależności aktywności biologicznej od struktury chemicznej. Wykazano przede wszystkim, że łańcuch peptydowy złożony z pięciu aminokwasów jest najmniejszą, aktywną jednostką strukturalną (22, 40, 96, 202, 204, 217, 296, 307, 308), a usunięcie N-końcowego (22, 40, 96, 97, 99, 102, 110, 157, 204, 296, 308) lub C-końcowego aminokwasu (204, 217, 296, 308) prowadzi do całkowitej lub prawie całkowitej utraty aktywności.

Synteza analogów enkefalin zawierających chemicznie zmodyfikowaną tyrozynę, która jak się przypuszcza jest odpowiedzialna za interakcję z receptorem (28, 29, 36, 40, 97, 99, 102, 110, 204, 308—310) pozwoliła prześledzić jej wpływ na aktywność biologiczną peptydów. Zauważono (202, 204), że usunięcie grupy aminowej z tyrozyny prowadzi do zaniku właściwości przeciwbólowych Met—enkefalin. Analogi enkefalin ze zmetylowaną N-końcową grupą aminową wykazują nieznaczne zmniejszenie działania przeciwbólowego (295, 296). Poza grupą aminową o aktywności biologicznej enkefalin decyduje obecność grupy hydroksylowej tyrozyny. Usunięcie jej z cząsteczki w wyniku zastąpienia tyrozyny przez fenyloalaninę powoduje całkowitą utratę aktywności (204, 296, 308). Do tego samego efektu prowadzi metylacja grupy hydroksylowej (296). Nieaktywne peptydy otrzymuje się po zastąpieniu L-tyrozyny przez izomer D (290, 296, 297) lub jakikolwiek inny aminokwas (296, 309).

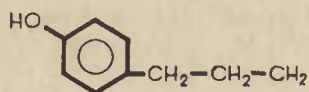
Pochodne enkefalin z L-alaniną w pozycji 2 lub 3 zamiast reszty glicylowej nie wykazują aktywności biologicznej (40). Natomiast wprowadzenie D-alaniny w położenie 2 powoduje wzrost aktywności obu peptydów (112, 216, 289, 296, 308). Wiąże się to zapewne z odpornością na działanie aminopeptydaz, gdyż analog Met—enkefalin zawierający L-alaninę w pozycji 2 ulega rozkładowi z taką samą szybkością jak związek rodzimy (112), a także, jak sugeruje Beddell i wsp. (296), możliwością przyjęcia dzięki obecności D-alaniny odpowiedniej konformacji, ułatwiającej łączenie z receptorem. Wydłużenie łańcucha D-aminokwasu przez wprowadzenie D-leucyny w położenie 2 obniża aktywność biologiczną w porównaniu z aktywnością D-alaninowych analogów i niemodyfikowanych enkefalin (296).

Niezbędność aromatycznej, hydrofobowej reszty fenyloalaninowej potwierdziło otrzymanie nieaktywnych pochodnych, w których aminokwas ten zastąpiono innymi — histydyną, tyroziną lub leucyną (296, 308). Istotne znaczenie ma także odległość między tyroziną a fenyloalaniną. Usunięcie jednej z reszt glicylowych lub wprowadzenie dodatkowej powoduje spadek aktywności biologicznej, co prawdopodobnie wynika z niemożliwości przyjęcia odpowiedniej konformacji przestrzennej podczas reakcji z receptorem (40, 308).

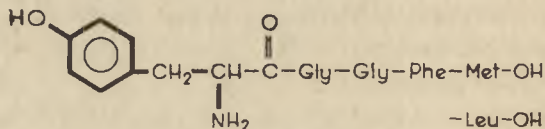
Obecność wolnej grupy karboksylowej C-końcowego aminokwasu nie jest warunkiem koniecznym dla zachowania aktywności biologicznej. Wśród zsyntetyzowanych analogów Met— i Leu—enkefalin z zablokowaną grupą karboksylową wiele różni się znacznie składem aminokwasowym od macierzystych peptydów i nie odegrało większej roli w ustaleniu zależności aktywności od struktury chemicznej (291, 292, 295, 296, 298). Najbardziej zbliżone budową do enkefalin pochodne, które oprócz D-alaniny w położeniu 2 zawierają resztę metioniloamidową lub leucyloamidową w pozycji 5 oraz estry metylowe D-Ala²—Met—enkefalin (Tyr—D-Ala—Gly—Phe—Met—OMe) lub D-Ala²—Leu—enkefalin (Tyr—D-Ala—Gly—Phe—Leu—OMe) charakteryzują się kilkakrotnie wyższą aktywnością i długotrwałym działaniem przeciwbólowym (27, 112, 216, 260, 262, 290, 291, 296), a niektóre np. ester metylowy D-Ala²—Leu—enkefalin wywołują ten efekt nawet po wprowadzeniu dożylnym (291). Zwiększona aktywność tych pochodnych oraz analogów zawierających, oprócz D-alaniny w pozycji 2, jako C-końcowy aminokwas D-metioninę lub D-leucynę (241, 296) wynika nie tylko z faktu, iż nie są rozkładane przez amino- i karboksypeptydazy, lecz prawdopodobnie odgrywają tu rolę także takie czynniki jak odmienna od enkefalin konformacja przestrzenna, zmiana własności fizyko-chemicznych np. lipofilności lub też zdolności łatwiejszego osiągnięcia miejsca receptorowego, (214, 241). Wraz ze skróceniem łańcucha C-końcowego aminokwasu, a więc osłabieniem lipofilności C-końca peptydu, obserwowano spadek aktywności biologicznej enkefalin (296). Dla zsyntetyzowanych analogów zawierających jako

C-końcowy aminokwas odpowiednio izoleucynę, norleucynę, walinę, alaninę i glicynę zmiany aktywności zachodziły w kierunku od najbardziej aktywnej izoleucynowej do prawie pozbawionej działania biologicznego pochodnej z alaniną i glicyną (296). Zastąpienie metioniny lub leucyny przez prolinę nie wpływa znacząco na aktywność biologiczną Pro⁵-enkefalin (304). Natomiast szczególnie aktywne okazały się te analogi enkefalin z proliną lub jej amidem jako C-końcowym aminokwasem, które ponadto zawierają w pozycji 2 D-alaninę, D-metioninę lub D-norleucynę (304), co podkreśla kluczową rolę tyrozyny dla aktywności biologicznej enkefalin.

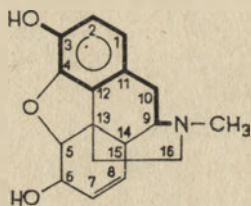
Porównując budowę chemiczną enkefalin oraz morfiny i jej pochodnych nasuwa się pytanie jak jest to możliwe, iż związki o tak odmiennej



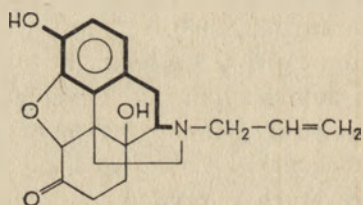
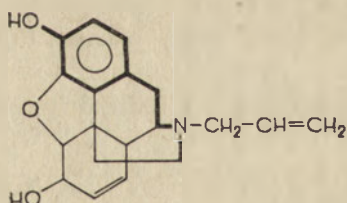
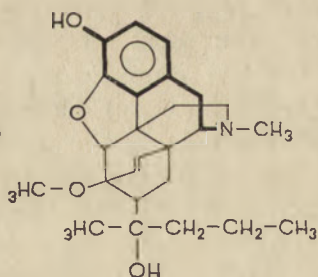
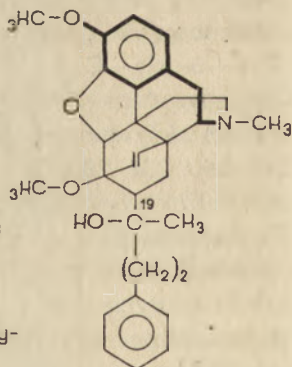
Tyramina



Met-(Leu)-enkefalina



Morfina

Nalokson
(N-allylo-7,8-dwuhydro-14-hydroksymorfinon)Nalorfina
(N-allylomorfina)Etorfina
(Tetrahydro-7-(1-hydroksy-
-1-metylo-butyl-1)-6,14-
-endoeteno-oripawina)Pet
(7-(1-fenyl-3-hydroksy-
-butyl-3)-6,14-endoete-
no-tetrahydrotebaina)

Ryc. 4. Wzory strukturalne enkefalin i morfiny

Linia grubszą zaznaczono ugrupowanie tyraminowe

strukturze łączą się z tym samym miejscem neuronu jakim jest receptor opiatowy. Badania nad wyjaśnieniem tego problemu skupiły się na intensywnym poszukiwaniu analogii w budowie enkefalin i narkotyków. Zwrócono uwagę, iż mimo istotnych różnic wspólną cechą jest obecność ugrupowania tyraminowego i podobne działanie obu typów związków należałoby wiązać z tym właśnie faktem (310—314), (Ryc. 4). Spostrzeżenie nabiera istotnego znaczenia w świetle badań wskazujących, iż w narkotykach ugrupowanie tyraminowe bierze bezpośredni udział w interakcji z receptorem (310, 315—317), podobnie jak reszta tyrozylowa enkefalin, a więc też zawierająca to ugrupowanie (28, 29, 36, 40, 97, 99, 102, 110, 204, 308—310).

Te odmienne grupy związków mają także zbliżoną budowę przestrzenną, określoną dla narkotyków obecnością sztywnego pierścienia fenantrenowego w cząsteczce. Zaproponowano kilka modeli opisujących przestrzenną konformację enkefalin. Przestrzenne podobieństwo do narkotyków zapewnia enkefalinom struktura β -zwoju, stabilizowana wiązaniem wodorowym między grupą karbonylową Tyr¹ a amidowym wodorem Phe⁴ jak sugerują jedni (318—320) lub dwoma naprzemianległymi wiązaniami wodorowymi między Tyr¹ a Phe⁴ jak stwierdzono na podstawie badań rentgenograficznych (321). Inny typ struktury β -zwoju zaproponowano na podstawie widma enkefalin wyznaczonego za pomocą jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR), (322—325). Peptyd przyjmuje konformację β_1 -zwoju z wiązaniem wodorowym utworzonym między grupą karbonylową Gly² a amidowym wodorem metioniny lub leucyny. Jeszcze inny model konformacji enkefalin zapewniającej podobieństwo do narkotyków przedstawił Khaled i wsp. (326). Nie wykluczone, że przyjmowanie wielu konformacji przestrzennych warunkuje oddziaływanie enkefalin z różnymi rodzajami receptorów opiatowych.

VI. Uwagi końcowe

Mimo niezwykle dynamicznie rozwijających się badań nad enkefalinami nie dają one jednoznacznej odpowiedzi na temat roli obu peptydów jako neurotransmiterów lub neuromodulatorów ośrodkowego układu nerwowego. Wiele przesłanek takich jak: nierównomierne rozmieszczenie w strukturach ośrodkowego układu nerwowego, występowanie w zakończeniach nerwowych, uwalnianie z neuronów w sposób typowy dla mediatorów, niezwykle szybka inaktywacja przez enzymy proteolityczne nie tylko nie wyklucza, ale wydaje się potwierdzać rolę enkefalin jako neurotransmiterów. Z drugiej strony, enkefaliny, w przeciwieństwie do typowych mediatorów, łączą się nie z jednym specyficznym lecz różnymi populacjami receptorów opiatowych (242—245, 327), powodując, jak wykazały między innymi doświadczenia Frenka i wsp. (196, 197), za-

leżny od typu receptora efekt fizjologiczny. Fakty te w powiązaniu z wpływem jaki wywierają enkefaliny na syntezę, metabolizm czy też uwalnianie neurotransmiterów zdają się wskazywać na neuromodulatorową rolę obu peptydów w ośrodkowym układzie nerwowym. Rozstrzygnięcie problemu wymaga jednak dalszych badań.

Zaakceptowano 15.3.1980

PIŚMIENNICTWO

1. Barchas J. D., Akil H., Elliott G. R., Holman R. B., Watson S. J., (1978), *Science*, **200**, 964—973.
2. Hutchinson H. T., Werbach K., Vance C., Haber B., (1974), *Brain Res.*, **66**, 265—274.
3. Goldstein A., (1976), *Science*, **193**, 1081—1086.
4. Goldstein A., Lowney L. L., Pol B. K., (1971), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1742—1747.
5. Pert C. B., Snyder S. H., (1973), *Science*, **179**, 1011—1014.
6. Pert C. B., Snyder S. H., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2243—2247.
7. Simon E. J., Hiller J. M., Edelman I., (1973), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 1947—1949.
8. Terenius L., (1973), *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **33**, 377—384.
9. Hiller J., Pearson J., Simon E. J., (1973), *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **6**, 1052—1062.
10. Kuhar M. J., Pert C. B., Snyder S. H., (1973), *Nature*, **245**, 447—450.
11. Pert C. B., Kuhar M. J., Snyder S. H., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1849—1854.
12. Pert C. B., Snowman A. M., Snyder S. H., (1974), *Brain Res.*, **70**, 184—188.
13. Collier H. O. J., (1973), w *Pharmacology and Future of Man — Proc. of the 5th International Congress on Pharmacology*, red. Cochin J., Way E. L., str. 65—76, Karger, Basel.
14. Goldstein A., (1974), w *Biological and Behavioral Approaches to Drug Dependence — Proc. of International Symp. Alcohol and Drug Research*, red. Cappel H., Le Blanc A. E., str. 27—41, Addiction Research Foundation, Toronto.
15. Terenius L., Wahlström A., (1974), *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **35**, suppl. 1, 5.
16. Terenius L., Wahlström A., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1759—1764.
17. Hughes J., (1975), *Brain Res.*, **88**, 295—308.
18. Hughes J., Smith T., Morgan B., Fothergill L., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1753—1758.
19. Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1765—1769.
20. Smith T. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P., (1976), w *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*, red. Kosterlitz H. W., str. 57—62, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
21. Simantov R., Snyder S. H., (1976), *Life Sci.*, **18**, 781—788.
22. Hughes J., Kosterlitz H. W., (1977), *Brit. Med. Bull.*, **33**, 157—161.
23. Klee A. W., (1977), w *Peptides in Neurobiology*, red. Gainer H., str. 375—397, Plenum Press, New York, London.

24. Segawa T., Murakami H., Ogawa H., Yajima H., (1978), *Jpn. Pharmacol.*, **28**, 13—19.
25. Waterfield A. A., Smokcum R. W., Hughes J., Kosterlitz H. W., Henderson G., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **43**, 107—114.
26. Sakai K. K., Hymson D. L., Shapiro R., (1978), *Neuroscience Letters*, **10**, 317—322.
27. Puig M. M., Gascón P., Craviso G. L., Bjur R. A., Matsueda G., Stewart J. M., Musacchio J. M., (1977), *Arch. Int Pharmacodyn. Ther.*, **226**, 69—80.
28. Simantov R., Snyder S. H., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 2515—2519.
29. Simantov R., Snyder S. H., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 987—988.
30. Simantov R., Snyder S. H., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 41—48, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
31. Terenius L., Wahlström A., (1975), *Acta Physiol. Scand.*, **94**, 74—81.
32. Birdsall N. J. M., Hulme E. C., Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 19—26, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
33. Meunier J. C., Moisand C., (1977), *FEBS Letters*, **77**, 209—213.
34. Miller R. J., Chang K. J., Leighton J., Cuatrecasas P., (1977), *Life Sci.*, **22**, 379—388.
35. Chau-Pham T. T., Dewey W. L., (1977), *Life Sci.*, **21**, 1337—1342.
36. Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 319—331.
37. Chang K. J., Miller R. J., Cuatrecasas P., (1978), *Mol. Pharmacol.*, **14**, 961—970.
38. Snyder S. H., (1978), *Am. J. Psychiatry*, **135**, 645—652.
39. Law P. Y., Loh H. H., (1978), *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **21**, 409—434.
40. Frederickson R. C. A., (1977), *Life Sci.*, **21**, 23—42.
41. Kosterlitz H. W., Hughes J., (1975), *Life Sci.*, **17**, 91—96.
42. Guillemin R., (1978), *Science*, **202**, 390—402.
43. Frederickson R. C. A., Nickander R., Smitwick E. L., Shuman R., Norris F. H., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 239—246, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
44. Jacquet Y., Marks N., Li C. H., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 411—414, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
45. Hughes J., Smith T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R., (1975), *Nature*, **258**, 577—579.
46. Pasternak G. W., Simantov R., Snyder S. H., (1976), *Mol. Pharmacol.*, **12**, 504—513.
47. Simantov R., Kuhar M. J., Pasternak G. W., Snyder S. H., (1976), *Brain Res.*, **106**, 189—197.
48. Simantov R., Goodman R., Aposhian D., Snyder S. H., (1976), *Brain Res.*, **111**, 204—211.
49. Hughes J., Kosterlitz H. W., Smith T. W., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **61**, 639—647.
50. Frederickson R. C. A., Schrimmer E. W., Grinnam E. L., Harrel C. E., Hewes C. R., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1181—1190.

51. Rossier J, Vargo T. M., Minick S., Ling N., Bloom F., Guillemain R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5162—5165.
52. Hong J. S., Yang H. Y. T., Fratta W., Costa E., (1977), *Brain Res.*, 134, 383—386.
53. Wesche D., Holtt V., Herz H., (1977), *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 301, 79—82.
54. Miller R. J., Chang K. J., Cooper B., Cuatrecasas P., (1978), *J. Biol. Chem.*, 253, 531—538.
55. Yang H. Y. T., Hong J. S., Costa E., (1977), *Neuropharmacology*, 16, 303—307.
56. Hong J. S., Yang H. Y. T., Costa E., (1977), *Neuropharmacology*, 16, 451—453.
57. Kobayashi R. M., Palkovits M., Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1977), *Life Sci.*, 22, 527—530.
58. Yang H. Y. T., Hong J. S., Fratta W., Costa E., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 18, 149—159.
59. Watson S. J., Akil H., Richardson C. W., Barchas J. D., (1978), *Nature*, 275, 226—228.
60. Miller R. J., Cuatrecasas P., (1978), *Naturwissenschaften*, 65, 507—514.
61. Cuello A. C., (1978), *Lancet*, 2, 291—293.
62. Meek J. L., Bohan T. P., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 18, 141—147.
63. Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H., (1977), *Brain Res.*, 135, 358—367.
64. Snyder S. H., (1975), *Nature*, 257, 185—189.
65. Pert C. B., Kuhar M. J., Snyder S. H., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3729—3733.
66. Kuhar M. J., (1978), *Fed. Proc.*, 37, 153—157.
67. Simon E. J., Hiller J. M., (1978), *Fed. Proc.*, 37, 141—146.
68. Atweh S., Kuhar M. J., (1977), *Brain Res.*, 129, 1—12.
69. Polak J. M., Bloom S. R., Sullivan S. N., Facer P., Pearse A. G., (1977), *Lancet*, 1, 972—974.
70. Linnoila R. J., Di Augustine R. P., Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1978), *Neuroscience*, 3, 1187—1196.
71. Puig M. M., Gascón P., Craviso G. L., Musacchio J. M., (1977), *Science*, 195, 419—420.
72. Elde R., Hökfelt T., Johansson O., Terenius L., (1976), *Neuroscience*, 1, 349—351.
73. Alumets J., Hakanson R., Sundler P., Chang K. J., (1978), *Histochemistry*, 56, 187—196.
74. Schultzberg M., Dreyfus C. F., Gershon M. D., Hökfelt T., Elde R. P., Nilsson G., Said S., Goldstein M., (1978), *Brain Res.*, 155, 239—248.
75. Hughes J., Kosterlitz H. W., Sosa R. P., (1978), *Br. J. Pharmacol.*, 63, 397P.
76. Di Giulio A. M., Yang H. Y. T., Lutold B., Fratta W., Hong J., Costa E., (1978), *Neuropharmacology*, 17, 989—992.
77. Schultzberg M., Hökfelt T., Terenius L., Elfvin L. G., Lundberg J., M., Brandt J., Elde R. P., Goldstein M., (1979), *Neuroscience*, 4, 249—270.
78. Schultzberg M., Lundberg J. M., Hökfelt T., Terenius L., Brandt J., Elde R. P., Goldstein M., (1978), *Neuroscience*, 3, 1169—1186.

79. Schultzberg M., Hökfelt T., Lundberg J. M., Terenius L., Elfvin L. G., Elde R. P., (1978), *Acta Physiol. Scand.*, **103**, 475—477.
80. Sullivan S. N., Bloom S. R., Polak J. M., (1978), *Lancet*, **1**, 986—987.
81. Osborne H., Holtt V., Herz A., (1978), *Life Sci.*, **22**, 611—618.
82. Simantov R., Snowman A. M., Snyder S. H., (1976), *Brain Res.*, **107**, 650—657.
83. Henderson G., Hughes J., Kosterlitz H. W., (1978), *Nature*, **271**, 677—679.
84. Osborne H., Holtt V., Herz A., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 219—221.
85. Iversen L. L., Iversen S. D., Bloom F. E., Vargo T., Guillemin R., (1978), *Nature*, **271**, 679—681.
86. Bayon A., Rossier J., Mauss A., Bloom F. E., Iversen L. L., Ling N., Guillemin R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3503—3506.
87. Johansson O., Hökfelt T., Elde R. P., Schultzberg M., Terenius L., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 51—70.
88. Hökfelt T., Jungdahl A., Terenius L., Elde R. P., Nilsson R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, **74**, 3081—3085.
89. Watson S. J., Akil H., Sullivan S., Barchas J. D., (1977), *Life Sci.*, **21**, 733—738.
90. Simantov R., Kuhar M. J., Uhl G. R., Snyder S. H., (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2167—2171.
91. Neale J. H., Barker J. L., Uhl G. R., Snyder S. H., (1978), *Science*, **201**, 467—469.
92. Sar M., Stumpf W. E., Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1978), *J. Comp. Neurol.*, **182**, 17—37.
93. Hökfelt T., Elde R. P., Johansson O., Terenius L., Stein L., (1977), *Neuroscience*, **5**, 25—31.
94. Uhl G. R., Goodman R. R., Kuhar M. J., Childers S. R., Snyder S. H., (1979), *Brain Res.*, **166**, 75—94.
95. Norström A., Hansson H. A., Sjöstrad J., (1971), *Z. Zellforsch.*, **113**, 271—293.
96. Hambrook J. M., Morgan B. A., Rance M. J., Smith C. F. C., (1976), *Nature*, **262**, 782—783.
97. Vogel Z., Allstein M., (1977), *FEBS Letters*, **80**, 332—336.
98. Erdös E. G., Johnson A. R., Boyden N. T., (1978), *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 843—848.
99. Dupont A., Cusan L., Garon M., Alvarado-Urbina G., Labrie F., (1977), *Life Sci.*, **21**, 907—911.
100. Huang J. T., Lajtha A., (1978), *Neuropharmacology*, **17**, 1075—1079.
101. Marks N., Grynbaum A., Neidle A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1552—1559.
102. Huang J. T., Lajtha A., (1978), *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **19**, 191—199.
103. Barclay R. K., Phillips M. A., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 1119—1123.
104. Grynbaum A., Kastin A. J., Coy D. H., Marks N., (1977), *Brain Res. Bull.*, **2**, 479—484.
105. Vogel Z., Allstein M., (1979), *FEBS Letters*, **98**, 44—48.
106. Craves F. B., Law P. Y., Hunt C. A., Loh H. H., (1978), *J. Pharm. Exp. Ther.*, **206**, 492—506.
107. Miller R. J., Chang K. J., Cuatrecasas P., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1311—1317.

108. Knight M., Klee W. A., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 3843—3847.
109. Meek J. L., Yang H. Y. T., Costa E., (1977), *Neuropharmacology*, **16**, 151—154.
110. Lane A. C., Rance M. J., Walter D., (1977), *Nature*, **269**, 75—76.
111. Pert C. B., Pert A., Chang K. J., Fong B. T. W., (1976), *Science*, **194**, 330—332.
112. Guyon A., Barbet J., Roques B. P., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 919—926.
113. Schnebli H. P., Phillips M. A., Barclay R. K., (1979), *Biochim. Biophys. Acta*, **569**, 89—98.
114. Sullivan S., Akil H., Barchas J. D., (1978), *Commun. Psychopharmacol.*, **2**, 525—531.
115. Craves F. B., Law P. Y., Hunt C. A., Loh H. H., (1978), *J. Pharm. Expt. Ther.*, **206**, 492—506.
116. Malfroy B., Swerts J. P., Guyon A., Roques B. P., Schwartz J. C., (1978), *Nature*, **276**, 523—526.
117. Benuck M., Marks N., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 215—221.
118. Swerts J. P., Perdisot P., Malfroy B., Schwartz J. C., (1979), *Eur. J. Pharmacol.*, **53**, 209—210.
119. Malfroy B., Swerts J. P., Llorens C., Schwartz J. C., (1979), *Neuroscience Letters*, **11**, 329—334.
120. Mains R. E., Eipper B. A., Ling N., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 3014—3018.
121. Roberts J. L., Herbert E., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 4826—4830.
122. Smyth D. G., (1978), *Biochem. Soc. Trans.*, **6**, 61—63.
123. Rubinstein M., Stein S., Udenfriend S., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 669—671.
124. Roberts J. L., Phillips M., Rosa P. A., Herbert E., (1978), *Biochemistry*, **17**, 3609—3618.
125. Eipper B. A., Mains R. E., (1978), *J. Biol. Chem.*, **253**, 5732—5744.
126. Bertagna X. Y., Nicholson W. E., Sorenson G. D., Pettengill O. S., Mount C. D., Orth D. N., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5160—5164.
127. Crine P., Gionoulakis C., Seidah N. G., Gossard F., Pezalla P. D., Lis M., Chretien M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4719—4723.
128. Pezalla P. D., Seidah N. G., Benjannet S., Crine P., Lis M., Chretien M., (1978), *Life Sci.*, **23**, 2281—2291.
129. Loh H. H., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 796—800.
130. Sofroniew M. V., (1979), *Am. J. Anat.*, **154**, 283—289.
131. Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura T., Chang A. C. Y., Cohen S. N., Numa S., (1979), *Nature*, **278**, 423—427.
132. Gramsch C., Kleber G., Holtt V., Pasi A., Mehraein P., Herz A., (1979), *Brain Res.*, (w druku).
133. Li C. H., Chung D., (1976), *Nature*, **260**, 622—624.
134. Li C. H., Tan L., Chung D., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 1088—1093.
135. Feldberg W., Smyth D. G., (1976), *J. Physiol.*, **260**, 30P.
136. Cox B. M., Goldstein A., Li C. H., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 1821—1823.
137. Li C. H., (1976), *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 592—604.

138. Dragon N., Seidah N. G., Lis M., Routhier R., Chretien M., (1977), *Can. J. Biochem.*, **55**, 666—670.
139. Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Leppaluoto J., Vargo T. M., Guillemin R., (1977), *Life Sci.*, **20**, 43—48.
140. Queen G., Pinsky C., La Bella F., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1021—1027.
141. Feldberg W., Smyth D. G., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **60**, 445—453.
142. Tseng L. F., Loh H. H., Li C. H., (1976), *Nature*, **263**, 239—240.
143. Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Birdsall N. J. M., Hulme E. C., (1976), *Nature*, **260**, 793—795.
144. Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein A., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1771—1776.
145. Cox B. M., Opheim K. E., Teschemacher H., Goldstein A., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1777—1782.
146. Bloom F. E., Rossier J., Battenberg E. L. F., Bayon A., French E., Henricksen S. J., Siggins G. R., Segal D., Browne R., Ling N., Guillemin R., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 89—109.
147. Gráf L., Ronai A. Z., Bajusz S., Cseh G., Székely J. S., (1976), *FEBS Letters*, **64**, 181—184.
148. Lazarus L. H., Ling N., Guillemin R., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2156—2159.
149. Bradbury A. F., Feldberg W. F., Smyth D. G., Snell C. R., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 9—17, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
150. Ling N., Guillemin R., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 3308—3310.
151. Aono J., Takahashi M., Koida M., (1978), *Jpn. J. Pharmacol.*, **28**, 930—932.
152. Pezalla P. D., Lis M., Seidah N. G., Chretien M., (1978), *Can. J. Neurol. Sci.*, **5**, 183—188.
153. Liotta A. S., Suda T., Krieger D. T., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 2950—2954.
154. Seidah N. G., Gianoulakis C., Crine P., Lis M., Benjannet S., Routhier R., Chretien M., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3153—3157.
155. Smyth D. G., Snell C. R., Massey D. E., (1978), *Biochem. J.*, **175**, 261—270.
156. Geisow M. J., Smyth D. G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 625—629.
157. Austen B. M., Smyth D. G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 477—482.
158. Patthy A., Gráf L., Kenessey A., Székely J. I., Bajusz S., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 254—259.
159. Austen B. M., Smyth D. G., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 86—94.
160. Austen B. M., Smyth D. G., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1394—1397.
161. Burbach J. P. H., Loeber J. G., Verhoef J., de Kloet E. R., de Wied D., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 1296—1303.
162. Austen B. M., Smyth D. G., Snell C. R., (1977), *Nature*, **269**, 619—621.
163. Smyth D. G., Snell C. R., (1977), *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 1397—1399.
164. Smyth D. G., Snell C. R., (1977), *FEBS Letters*, **78**, 225—228.
165. Cheung A. L., Goldstein A., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1005—1008.
166. Kenessey A., Gráf L., (1977), *Brain Res. Bull.*, **2**, 247—250.

167. Bloom F., Battenberg E., Rossier J., Ling N., Guillemin R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1591—1595.
168. Gramsch C., Holtt V., Mehraein P., Pasi A., Herz A., (1979), *Brain Res.*, **171**, 261—270.
169. Watson S. J., Barchas D., Li C. H., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5155—5158.
170. Akil H., Watson S. J., Beger P. A., Barchas J. D., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 125—139.
171. Costa E., Fratta W., Hong J. S., Moroni F., Yang H. Y. T., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 217—226.
172. Levis R. V., Stein S., Gerber L. D., Rubinstein M., Udenfriend S., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4021—4023.
173. Yang H. Y. T., Fratta W., Hong J. S., Di Giulio A. M., Costa E., (1978), *Neuropharmacology*, **17**, 433—438.
174. Kangawa K., Matsuo H., Igarashi M., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **86**, 153—160.
175. Sarne Y., Azov R., Weissman B. A., (1978), *Brain Res.*, **151**, 399—403.
176. Jhamandas K., Sawynok J., Sutak M., (1977), *Nature*, **269**, 433—434.
177. Härsing L. G. Jr., Vizi E. S., Knol J., (1978), *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **30**, 387—395.
178. Fratta W., Yang H. Y. T., Hong J., Costa E., (1977), *Nature*, **268**, 452—453.
179. Rossier J., Guillemin R., Bloom F., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 465—466.
180. Ferri S., Arrigo Reina R., Santagostino A., Scoto G. M., Spadaro C., (1978), *Psychopharmacology*, **58**, 277—281.
181. Bhargava H. N., (1978), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **9**, 167—176.
182. Tortella F. C., Moreton J. E., Khazan N., (1978), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **206**, 636—643.
183. Katz R. J., Cattoll B. J., Baldrighi G., (1978), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **8**, 493—496.
184. Carney J. M., Rosecrans J. A., (1978), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **8**, 185—189.
185. Byck R., (1976), *Lancet*, **2**, 72—73.
186. Olson R. D., Kastin A. J., Michell G. F., Olson G. A., Coy D. H., Montalbano D. M., (1978), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **9**, 111—114.
187. de Caro G., Micossi L. G., Venturi F., (1979), *Nature*, **277**, 51—53.
188. Plotnikoff N. P., Kastin A. J., Coy D. H., Christensen C. W., Schally A. V., Spirtes M. A., (1976), *Life Sci.*, **19**, 1283—1288.
189. Wei E. T., Tseng L. F., Loh H. H., Li C. H., (1977), *Life Sci.*, **21**, 321—328.
190. Pert A., Sivit C., (1977), *Nature*, **265**, 645—647.
191. Belluzzi J. D., Stein L., (1977), *Nature*, **266**, 556—558.
192. Mello N. K., Mendelson J. H., (1978), *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **9**, 579—586.
193. Stein L., Belluzzi J. D., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 299—311.
194. Quarantotti B. P., Corda M. G., Paglietti E., Biggio G., Gessa G. L., (1978), *Life Sci.*, **23**, 673—678.
195. Gessa G. L., Paglietti E., Quarantotti B. P., (1979), *Science*, **204**, 203—205.

196. Frenk H., Urca G., Liebeskind J. C., (1978), *Brain Res.*, **147**, 327—337.
197. Frenk H., McCarthy B. C., Liebeskind J. C., (1978), *Science*, **200**, 335—337.
198. Rigter H., (1978), *Science*, **200**, 83—85.
199. Wei E., Loh H., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 303—310, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
200. Zieglgänsberger W., Fry J. P., (1976), w Opiates and Endogenous Opioid Peptides, red. Kosterlitz H. W., str. 231—238, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
201. Belluzzi J. D., Grant N., Garsky V., Sarantakis D., Wise C. D., Stein L., (1976), *Nature*, **260**, 625—626.
202. Büscher H. H., Hill R. C., Römer D., Cardinaux F., Closse A., Hauser D., Pless J., (1976), *Nature*, **261**, 423—425.
203. Pert A., Simantov R., Snyder S. H., (1977), *Brain Res.*, **136**, 523—533.
204. Morgan B. A., Smith C. F. C., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W., (1976), *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 660—661.
205. Colpactr F. C., Niemegeers C. J., Janssen P. A., van Ree J. M., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 115—119.
206. Mendelson G., (1977), *Med. hypotheses*, **3**, 144—145.
207. Takagi H., Satoh M., Akaide A., Shibata T., Yajima H., Oga-wa H., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **49**, 113—116.
208. Frigeni V., Bruno F., Carenzi A., Racagni S., Santini V., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **30**, 310—311.
209. Vaught J. L., Takemori A. E., (1979), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **208**, 86—90.
210. Malick J. B., Goldstein J. M., (1977), *Life Sci.*, **20**, 827—832.
211. Gráf L., Székely J. I., Ronai A. Z., Dunai-Kovacs Z., Ba-jusz S., (1976), *Nature*, **263**, 240—241.
212. Jacquet Y., Marks N., (1976), *Science*, **194**, 632—634.
213. Knoll J., (1976), *Eur. J. Pharmacol.*, **39**, 403—407.
214. Vonvogtlander P. F., Lewis R. A., (1978), *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, **20**, 265—274.
215. La Motte C., Pert C. B., Snyder S. H., (1976), *Brain Res.*, **112**, 407—412.
216. Yaksh T. L., Huang S. P., Rudy T. A., Frederickson R. C. A., (1977), *Neuroscience*, **2**, 593—596.
217. Duggan A. W., Hall G. J., Headley P. M., (1976), *Nature*, **264**, 456—458.
218. Frederickson R. C. A., Norris F. H., (1976), *Science*, **194**, 440—442.
219. Sastry B. R., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **50**, 269—273.
220. Hill R. G., (1979), *Materialy IBRO Symposium „Neuropeptides and Neural Transmission”*, str. 22, Jabłonna.
221. Davies J., Dray A., (1977), *Br. J. Pharmac.*, **63**, 87—96.
222. Duggan A. W., Hall J. G., Headley P. M., (1977), *Br. J. Pharmac.*, **61**, 339—408.
223. Randić M., Miletić V., (1978), *Brain Res.*, **152**, 196—202.
224. Bradley P. B., Briggs I., Gayton R. J., Lambert L. A., (1976), *Nature*, **261**, 425—426.
225. Nicoll R. A., Siggins G. R., Ling N., Bloom F., Guillemin R., (1977), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 2584—2588.
226. Gent J. P., Wolstencroft J. H., (1976), *Nature*, **261**, 426—427.

227. Andersen R. K., Lund J. P., Puil E., (1978), *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 216—222.
228. Lee R. R., Lewell R. D. E., Spencer P. S. J., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **47**, 251—253.
229. Algeri A., Consolazione A., Calderini G., Achilli G., Canas E. P., Garattini S., (1978), *Experientia*, **34**, 1488—1489.
230. Henry J. L., (1976), *Brain Res.*, **114**, 439—451.
231. Brandić M., Miletić V., (1977), *Brain Res.*, **128**, 164—169.
232. Jessel T., Iversen L. L., (1977), *Nature*, **268**, 549—551.
233. Frederickson R. C. A., Burgis V., Harrell C. E., Edwards J. D., (1978), *Science*, **199**, 1359—1361.
234. Pickel V. M., Reis D. M., Leeman S. E., (1977), *Brain Res.*, **122**, 534—540.
235. Cuello A. C., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 111—123.
236. Takahashi T., Otsuka M., (1975), *Brain Res.*, **87**, 1—11.
237. Kanazawa I., Jessell T. M., (1976), *Brain Res.*, **117**, 362—367.
238. Pernow B., (1975), *Brain Res.*, **106**, 235—252.
239. Hökfelt T., Kellerth J. O., Nilsson G., Pernow B., (1975), *Science*, **190**, 889—890.
240. Mudge A. W., Leeman S. E., Fischbach G. D., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 526—530.
241. Belluzzi J. D., Stein L., Dvornch W., Dheer S., Gluckman M. J., McGregor W. H., (1978), *Life Sci.*, **23**, 99—104.
242. Martin W. R., Eades C. G., Thompson J. A., Huppler R. E., Gilbert P. E., (1976), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **197**, 517—532.
243. Della Bella D., Casacci F., Sassi A., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 271—277.
244. Lord J. A., Waterfield A. A., Hughes J., Kosterlitz H. W., (1977), *Nature*, **267**, 495—499.
245. Kosterlitz H. W., (1979), *Materiały IBRO Symposium „Neuropeptides and Neural Transmission”*, str. 21, Jabłonna.
246. Cornford E. M., Braun L. D., Crane P. D., Oldendorf W. H., (1978), *Endocrinology*, **103**, 1297—1303.
247. Florez J., Mediavilla A., (1977), *Brain Res.*, **138**, 585—590.
248. Denavit-Saubié M., Champagnat J., Zieglgansberger W., (1978), *Brain Res.*, **155**, 55—67.
249. Bolme P., Fuxe K., Agnati L. F., Bradley R., Smythies J., (1978), *Eur. J. Pharmacol.*, **48**, 319—324.
250. Simon W., Schaz K., Ganten U., Stock G., Schlör K. H., Ganten D., (1978), *Clin. Sci. Mol. Med.*, **55**, suppl., **4**, 237S—241S.
251. Laubie M., Schmitt H., Vincent M., Remond G., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **46**, 67—71.
252. Dupont A., Cusan L., Labrie F., Coy D. H., Li C. H., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 76—82.
253. Cocchi D., Santagostino A., Gil-Ad J., Ferri S., Müller E. E., (1977), *Life Sci.*, **20**, 2041—2046.
254. Bruni J. F., van Vogt D., Marshall S., Meites J., (1977), *Life Sci.*, **21**, 461—466.
255. Dupont A., Cusan L., Garon M., Coy D. H., Li C. H., Labrie F., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 311.
256. Ferland L., Fuxe K., Eneroth P., Gustafsson J. A., Skett P., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **43**, 89—90.

257. Gold M. S., Remond D. E. Jr., Donabedian R. K., (1978), *Lancet*, **1**, 323—324.
258. Lien E. L., Fenichel R. L., Garsky V., Sarantakis D., Grant N. H., (1976), *Life Sci.*, **19**, 837—840.
259. Cusan L., Dupont A., Kledzik G. S., Labrie F., Coy D. H., Schally A. V., (1977), *Nature*, **268**, 544—547.
260. Shaar C. J., Frederickson R. C. A., Dininger N. B., Clemens J. A., Hull R. N., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 311.
261. Shaar C. J., Frederickson R. C. A., Dininger N. B., Jackson L., (1977), *Life Sci.*, **21**, 853—860.
262. Lien E. L., Clark D. E., McGregor W. H., (1978), *FEBS Letters*, **80**, 208—210.
263. Meltzer H. Y., Miller R. J., Fessler R. G., Simonovic M., Fang V. S., (1978), *Life Sci.*, **22**, 1931—1937.
264. Locatelli V., Cocchi D., Bajusz S., Spampinato S., Müller E. E., (1978), *Experientia*, **34**, 1650—1651.
265. Stubbs W. A., Delitala G., Jones A., Jeffcoate W. J., Edwards C. R., Ratter S. J., Besser G. M., Bloom S. R., Alberti K. G., (1978), *Lancet*, **2**, 1225—1227.
266. Rivier C., Vale W., Ling N., Bloom M., Guillemin R., (1977), *Endocrinology*, **100**, 238—241.
267. Guidotti A., Grandisch L., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 191—198.
268. Halasz B., (1978), w *Perspectives in Endocrine Psychobiology*, red. Brambill F., Bridges P. K., Endröczy E., Heuser G., str. 41—100, Akadémiai Kiadó, Budapest.
269. Calderini G., Consolazione A., Garanthini S., Algeri S., (1978), *Brain Res.*, **146**, 392—399.
270. Biggio G., Casu M., Corda M. G., Di Bella C., Gessa G. L., (1978), *Science*, **200**, 552—554.
271. Algeri S., Calderini G., Consolazione A., Garathini S., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **45**, 207—209.
272. Algeri S., Brunello N., Calderini G., Consolazione A., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 199—210.
273. Biggio G., Corda M. G., Casu M., Gessa G. L., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 227—244.
274. Schwartz J. C., Pollard H., Llorens C., Malfroy B., Gross C., Pradelles Ph., Dray F., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 245—264.
275. Carenzi A., Frigera V., Bella D. D., (1978), *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **18**, 265—270.
276. Pollard H., Llorens-Cortes C., Schwartz J. C., (1977), *Nature*, **268**, 745—747.
277. Pollard H., Llorens C., Schwartz J. C., Gross C., Dray F., (1978), *Brain Res.*, **151**, 392—398.
278. Subramanian N., Mitznegg P., Sprugel W., Domschke W., Domschke S., Wünsch E., Demling L., (1977), *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, **299**, 163—165.
279. Bowers C. Y., Fond B. T. W., Chang J. K., (1977), *Fed. Proc.*, **36**, 311.
280. Rotsztejn W. H., Drouvo S. V., Pattou E., Kordon C., (1978), *Nature*, **274**, 281—282.
281. Rossier J., Battenberg E., Pittman Q., Bayon A., Koda L., Miller R., Guillemin R., Bloom F., (1979), *Nature*, **277**, 653—655.

282. Bisset G. W., Chowdrey H. S., Feldberg W., (1978), *Br. J. Pharmacol.*, **62**, 370—371.
283. Klee W. A., Nirenberg M., (1976), *Nature*, **263**, 609—612.
284. Minneman K. P., Iversen L. L., (1976), *Nature*, **262**, 313—314.
285. Brandt M., Gullis R. J., Fischer K., Buchen C., (1976), *Nature*, **262**, 311—314.
286. Gullis R. J., Buchen C., Moroder L., Wünsch E., Hamprecht G., (1976), w *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*, red. Kosterlitz H. W., str. 143—151, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
287. Tseng D., Tan A. T., Henry J. L., Lal S., (1978), *Brain Res.*, **152**, 521—527.
288. Walczak S. A., Wilkening D., Makman M. H., (1979), *Brain Res.*, **160**, 105—116.
289. Baxter M. G., Follenfant R. L., Miller A. A., Sethna D. M., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **59**, 523P.
290. Coy D. H., Kastin A. J., Schally A. V., Morin C., Garon N. G., Labrie F., Walker J. M., Fertel R., Berntson C. G., Sandman C. A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 632—638.
291. Dutta A. S., Gormley J. J., Hayward C. F., Morley J. S., Shaw J. S., Stacey G. J., Turnbull M. J., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **61**, 481P.
292. Dutta A. S., Gormley J. J., Hayward C. F., Morley J. S., Shaw J. S., Stacey G. J., Turnbull M. J., (1977), *Life Sci.*, **21**, 559—562.
293. Pert C. B., Bowie D. L., Pert A., Morrell J. L., Gross E., (1977), *Nature*, **269**, 73—75.
294. Roemer D., Büscher H. H., Hill R. C., Pless J., Bauer W., Cardinaux F., Closse A., Hauser D., Huguenin R., (1977), *Nature*, **268**, 547—549.
295. Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., Deakin J. W. F., Wendlandt S., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 748—754.
296. Beddell C. R., Clark R. B., Hardy G. W., Lowe L. A., Ubatula F. B., Vane J. R., Wilkinson S., Chang K. J., Cuatrecasas P., Miller R. J., (1977), *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **198**, 249—265.
297. Beddell C. R., Clark R. B., Lowe L. A., Wilkinson S., Chang K. J., Cuatrecasas P., Miller R. J., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **61**, 351—356.
298. Yamashiro D., Tseng L., Li C. H., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 1124—1129.
299. Roemer D., Pless J., (1979), *Life Sci.*, **24**, 621—624.
300. Nagaraj R., Balaram P., (1978), *FEBS Letters*, **86**, 273—276.
301. English M. L., Stammer C. H., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 780—782.
302. Vermes I., Szontegh L., Telegdy G., (1979), *Neuroscience Letters*, **11**, 201—204.
303. Székely J. I., Dunai-Kovacs Z., Mglecz E., Ronai A. Z., Bajusz S., (1978), *J. Pharm. Exp. Ther.*, **207**, 878—883.
304. Bajusz S., Patthy A., Kenessey A., Gráf L., Székely J. I., Ronai A. Z., (1978), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 1045—1053.
305. Tseng L. F., Loh H. H., Li C. H., (1978), *Life Sci.*, **23**, 2053—2056.
306. Székely J. I., Ronai A. Z., Dunai-Kovacs Z., Mglecz E., Berzotri I., Bajusz S., Gráf L., (1977), *Eur. J. Pharmacol.*, **43**, 293—294.
307. Gorin F. A., Marshall G. R., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5179—5183.

308. Terenius L., Wahlström A., Lindenberg G., Karlsson S., Ragnarsson U., (1976), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 175—179.
309. Chang J. K., Fong B. T. W., Pert A., Pert C. B., (1976), *Life Sci.*, **18**, 1473—1482.
310. Horn A. S., Rodgers J. R., (1977), *J. Pharm. Pharmacol.*, **29**, 257—265.
311. Horn A. S., Rodgers J. R., (1976), *Nature*, **260**, 795—797.
312. Marganoff B. E., Zelesko M. J., (1978), *J. Pharm. Sci.*, **67**, 590—591.
313. Bleich H. E., Cutnell J. D., Day A. R., Freer R. J., Glasel J. A., McKelry J. F., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**, 2589—2593.
314. Loew G. H., Burt S. K., (1978), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 7—11.
315. Loh H. H., Law P. Y., Ostwald T., Cho T. M., Way E. L., (1978), *Fed. Proc.*, **37**, 147—152.
316. Loh H. H., Cho T. M., Wu Y. C., Harris R. A., Way E. L., (1975), *Life Sci.*, **16**, 1811—1818.
317. Portoghese P. S., (1966), *J. Pharm. Sci.*, **55**, 865—887.
318. Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R., (1976), *Nature*, **260**, 165—166.
319. Balodis Y. Y., Nikiforovitch G. V., Grinsteine I. V., Vegner R. E., Chipens G. I., (1978), *FEBS Letters*, **86**, 239—242.
320. Fournie-Zaluski M. C., Prange T., Pascard C., Roques B. P., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 1199—1206.
321. Smith G. D., Griffin J. F., (1978), *Science*, **199**, 1214—1216.
322. Roques B. P., Garbay-Jaureguiberry C., Oberlin R., Anteuinis M., Lala A. K., (1976), *Nature*, **262**, 778—779.
323. Jones C. R., Gibbons W. A., Garsky V., (1976), *Nature*, **262**, 779—782.
324. Jones C. R., Garsky V., Gibbons W. A., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 619—625.
325. Beddell C. R., Clark R. B., Miller R., Wilkinson S., (1977), *Br. J. Pharmacol.*, **59**, 502P.
326. Khaled M. A., Long M. M., Thompson W. D., Bradley R. J., Brown G. B., Urry D. W., (1977), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 224—231.
327. Chang K. J., Cuatrecasas P., (1979), *J. Biol. Chem.*, **254**, 2610—2618.

JÓZEF JULIAN BUJARSKI *

Mechanizmy odporności roślin na zakażenie wirusowe

Mechanisms of Plant Resistance Against Virus Infection

Spis treści

- I. Biochemiczno-fizjologiczne mechanizmy reakcji nadwrażliwości
 - I-1. Rola białek w procesach lokalizowania wirusów
 - I-2. Rola etylenu w reakcji nadwrażliwości
 - I-3. Biosynteza związków fenolowych w czasie procesów lokalizowania wirusów
 - I-4. Rola fitoaleksyn w procesach lokalizacji
- II. Biochemiczno-fizjologiczne mechanizmy odporności nabytej
 - II-1. Induktory odporności nabytej
 - II-2. Specyficzność odporności nabytej
 - II-3. Wpływ aktynomycyny D na odporność nabytą
 - II-4. Białka towarzyszące odporności nabytej
 - II-5. Analogie z interferonem
- III. Uwagi końcowe

Contents

- I. Biochemical and biophysical mechanisms of hypersensitive reaction
 - I-1. Role of the proteins in localization of viruses
 - I-2. Role of the ethylene in hypersensitive reaction
 - I-3. Biosynthesis of the phenolic compounds during processes of necrotisation
 - I-4. Role of the phytoalexins in localization processes of viruses

* Dr, Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, ul. Strzeszyńska 30/36, 60-479 Poznań.

Wykaz stosowanych skrótów: AMV — wirus mozaiki lucerny; CarMV — wirus mozaiki goździka; CaulMV — wirus mozaiki kalafiora; CMV — wirus mozaiki ogórka; PVX — wirus X ziemniaka; PVY — wirus Y ziemniaka; SBMV — wirus południowej mozaiki fasoli; TMV — wirus mozaiki tytoniu; TNV — wirus nekrozy tytoniu; TomRSV — wirus pierścieniowej plamistości pomidora; TRSV — wirus pierścieniowej plamistości tytoniu; TSWV — wirus dzikiej cętkowatości pomidora; CCIMV — wirus chlorotycznej plamistości wspanięli chińskiej; AVF — czynnik antywirusowy; PAL — dezaminaza fenyloalaninowa = amoniako-liaza fenyloalaniny; AOA — kwas aminoksoctowy.

- II. Biochemical and physiological mechanisms of aquired resistance**
- II-1. Inductors of aquired resistance**
- II-2. The specificity of aquired resistance**
- II-3. Effects of actinomycine D on aquired resistance**
- II-4. Proteins connected with aquired resistance**
- II-5. Analogy to Interferon**
- III. Concluding remarks**

Wzajemne oddziaływanie wirus—roślina zależy od biologiczno-genetycznych własności zarówno rośliny jak i wirusa. Roślina może być podatna na działanie wirusa lub może wykazywać różny stopień oporności: a) tolerancja — wirus namnaża się w roślinie w sposób ograniczony nie powodując znacznych zmian stanu wegetatywnego rośliny, b) odporność — roślina uruchamia mechanizmy obronne, czemu towarzyszy wiele objawów, c) immunność — wirus nie atakuje rośliny (1).

Wirusy, w przeciwieństwie do bakterii czy grzybów nie posiadają własnego metabolizmu. Zdecydowanie obligatoryjny charakter pożytnictwa wirusów z góry wyklucza szereg możliwych w przypadku grzybów czy bakterii mechanizmów oddziaływań patogen/roślina: wirus nie wydziela do otoczenia metabolitów oddziaływujących na komórki roślinne.

Nadwrażliwość jest szczególnym rodzajem odporności, dzięki której roślina lokalizuje atakującego wirusa na niewielkim obszarze tkanki wokół miejsc infekcji — powstają plamy nekrotyczne lub chlorotyczne. Plamy otoczone są przez warstwę komórek wykazujących odporność na powtórą infekcję wirusem. Ponieważ odporność ta obejmuje ograniczony obszar tkanki, nazwano ją odpornością nabytą zlokalizowaną. W niektórych przypadkach prócz tworzenia się plam lokalnych obserwowano powstawanie odporności systemowej na powtórą infekcję. Odporność systemowa obejmuje całą roślinę a więc również części rośliny oddalone od miejsc lokalizacji.

W niniejszym przeglądzie omówiono niektóre aspekty najnowszych wyników badań nad biochemicznymi i fizjologicznymi mechanizmami reakcji nadwrażliwości roślin na infekcję wirusami oraz związanej z tym odporności nabytej.

I. Biochemiczno-fizjologiczne mechanizmy reakcji nadwrażliwości

Badania nad znalezieniem związku między pojawieniem się lokalnych plam nekrotycznych i charakterystycznymi zmianami metabolizmu tkanki roślinnej są prowadzone od wielu lat. Szczegółowe przedstawienie danych dotyczących poinfekcyjnych zmian metabolizmu komórki jak też zmiana w organellach komórkowych nie jest tematem tej pracy — zainteresowanego czytelnika autor odsyła do prac przeglądowych (2—4). Wie-

le poinfekcyjnych zmian metabolicznych komórki ma charakter wtórny — wynika bowiem z ogólnego rozprężenia procesów regulacyjnych. Badając mechanizmy procesów lokalizowania wirusów poszukuje się pierwotnych zmian metabolicznych tzn. procesów bezpośrednio uczestniczących w powstawaniu nadwrażliwości. Niżej omówiono wyniki badań nad kilkoma zjawiskami, które prawdopodobnie mają istotne znaczenie omawianych procesów.

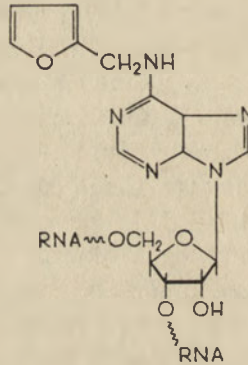
I-1. Rola białek w procesach lokalizowania wirusa

Powstawanie plam lokalnych aktywuje w tkankach otaczających nekrozy enzymy głównych przemian metabolicznych jak np.: enzymy cyklu heksozofosforanów (5) czy enzymy oddechowe (6). W układzie *N. tabacum* Samsun NN/TMV wykazano związek pomiędzy aktywizacją metabolizmu w tkankach otaczających plamy i hamowaniem rozprzestrzeniania się wirusa. Stwierdzono bowiem, że aktynomycyna D hamowała indukcję stanu antywirusowego w tkankach otaczających plamy (7). Podobne hamowanie obserwowano w układach *N. glutinosa*/TMV i *Phaseolus vulgaris* Pintho/TMV po traktowaniu aktynomycyną D lub chloramfenikolem (8—10), *Vigna sinensis*/CCIMV po traktowaniu 2-tiouracylem (11) lub *N. tabacum* Samsun NN/TMV po naświetlaniu UV (12). Wszystkie te obserwacje wskazują na udział biosyntezy białek w zjawisku lokalizowania wirusów. Prawdopodobnie aktywizacja syntezy białek prowadzi do wytwarzania stanu antywirusowego komórek otaczających plazmy (13).

Powyższe przypuszczenia wydają się potwierdzać wyniki badań nad wpływem cytokinin na procesy lokalizowania. Wykazano, że cytokiny stymulują syntezę białek i kwasów nukleinowych (14—16). Kinetyna, syntetyczna cytokinina, włączając się do rRNA jako N^6 — furfuryloadenozyna (17) powoduje specyficzne zmiany procesów transkrypcji i translacji (18).

Stwierdzono, że traktowanie zakażonych TMV liści *N. tabacum* Samsun NN lub *Phaseolus vulgaris* cytokininami — kinetyną lub N^6 -benzyloadeniną, powodowało zmniejszenie liczby nekroz (19—20). Podobny efekt obserwowano w innych układach *N. glutinosa*/TMV, *G. globosa*/PVX i *Datura stramonium*/TMV (21—24). Redukcja liczby nekroz może świadczyć o wzroście odporności rośliny na infekcję wirusową. W świetle późniejszych badań okazało się jednak, że zmniejszenia liczby nekroz jak również zmniejszenie ich wymiarów, nie można tłumaczyć wyłącznie wzrostem odporności rośliny. Stwierdzono bowiem, że kinetyna zmniejsza również szybkość namnażania wirusa w tkance roślinnej (23). Autorzy przypuszczają, że może to być spowodowane deficytem określonych metabolitów niezbędnych do namnażania wirusa. Skądinąd wiadomo, że szybkość namnażania wirusa wpływa na rozmiary i liczbę nekroz (25).

Tak więc redukcja liczby nekroz może być bezpośrednio spowodowana stymulacją przez cytokiny syntezę białek i kwasów nukleinowych a bezpośrednio może wynikać z zahamowania procesów replikacji wirusów. Wiele danych doświadczalnych wskazują, że szybkość replikacji wirusów zależy od stężenia cytokiny (26—28). Stwierdzono, że w układzie *N. glutinosa*/TRSV (26), w którym wirus namnaża się systemowo, małe stężenie kinetyny (0,1 mg/l) przyspiesza namnażanie wirusa a stężenia duże (1—10 mg/l) — hamowały. Na tej podstawie sformułowano hipotezę, że małe ilości kinetyny indukują nagromadzenie metabolitów koniecznych do namnażania wirusa. W miarę wzrostu stężenia kinetyny zachodzą współzawodniczące procesy bezpośredniego blokowania replikacji wirusów przez kinetynę. Nie można również wykluczyć bezpośredniego wpływu kinetyny na syntezę wirusa poprzez modyfikację wirusowego RNA (29—30).



Ryc. 1. Rybozyd kinetyny (N^6 -furfuryloadenozyna) w łańcuchu RNA

Próby scharakteryzowania substancji białkowych odpowiedzialnych za procesy hamowania rozprzestrzeniania się wirusa prowadzono na roślinach *N. tabacum* zawierających gen N odpowiedzialny za reakcję nadwrażliwości *N. tabacum* na TMV (31—36). Z liści *N. glutinosa*, zakażonych TMV, wyizolowano i częściowo oczyszczono czynnik antywirusowy (AVF = Antiviral factor) (31—32). Stosując chromatografię wobec konkanawaliny A (33), elektroforezę w żelu poliakrylamidowym (34), znakowanie [32 P] fosforanem oraz trawienie specyficznymi hydrolazami (36) — stwierdzono, że uzyskany związek jest fosfoglikoproteiną o m.c. około 22 000 D. Analiza PAGE znakowanego czynnika antywirusowego wykazała, że wytwarzają go tylko odmiany *N. tabacum*, które posiadają gen nekrotyzacji N (34).

Badając mechanizm działania genu N stwierdzono, że warunkuje on funkcjonowanie systemu enzymatycznego, który przekształca nieaktywny prekursor czynnika w jego formę aktywną (35). Obecność formy nieaktywnej stwierdzono również w odmianach nieposiadających genu N

Drugim czynnikiem stymulującym działanie systemu enzymatycznego *in vivo* było zainfekowanie rośliny przez TMV. Autorzy przypuszczają, że aktywujący system enzymatyczny jest nieczynny w zdrowej roślinie. Infekcja wirusem mozaiki tytoniu odblokowuje system prawdopodobnie poprzez fosforylację jednego z komponentów białkowych. Nieznany pozostaje mechanizm przekształcenia prekursora czynnika antywirusowego w formę aktywną.

Mechanizm antywirusowego działania omawianego czynnika jest również nieznan. Stwierdzono, że w roślinach *N. glutinosa* zakażonych wirusem namnażającym się systemowo, np.: wirusem mozaiki lucerny, powstaje nieporównywalnie mniej czynnika antywirusowego (37). Można więc sądzić, że zdolność rośliny do reakcji nadwrażliwości zależy od stężenia czynnika produkowanego przez roślinę pod wpływem zakażenia wirusem.

W izolowanych protoplastach *N. tabacum* po zakażeniu wirusem mozaiki tytoniu nie stwierdzono reakcji nekrotycznej (38). Przypuszczenie, że do ekspresji genu N niezbędny jest wzajemny kontakt komórek (38) oparto na obserwacji, że działanie genu N w tkankach liściowych *N. tabacum* Xanthi-nc jest hamowane przez czynniki osmotyczne powodujące plazmolizę (39—42). Plazmoliza likwiduje kontakt między komórkami, jaki zapewniają plazmodesmy.

Innymi przyczynami braku ekspresji genu N w protoplastach czy tkankach poddanych plazmolizie może być rozregulowanie metabolizmu w izolowanych protoplastach (43) albo hamowanie syntezy RNA (39) wirusowych pod wpływem szoku osmotycznego.

Rolę białek w powstawaniu systemowej odporności nabytej omówiono w rozdziale II-4.

I-2. Rola etylenu w reakcji nadwrażliwości

Rozprzestrzenianiu się infekcji wirusowej w roślinie towarzyszą zmiany aktywności regulatorów wzrostu, m.in. etylenu (45—46). Wyniki wielu badań wskazują, że wraz z rozwojem plam nekrotycznych lub chlorotycznych w tkankach roślinnych zakażonych wirusem wzrasta intensywność syntezy etylenu (47—49). Przeprowadzono wiele doświadczeń, aby wyjaśnić związek przyczynowy między produkcją etylenu a rozwojem procesów lokalizacyjnych. Stwierdzono, że stosowanie inhibitorów syntezy etylenu takich jak CO_2 lub KMnO_4 powodowało hamowanie rozwoju plam chlorotycznych w siewkach *Cucumis sativus* zainfekowanych wirusem mozaiki ogórka (50). W układzie lokalizującym *Vigna sinensis* wirus mozaiki ogórka (51) określono efekty czterech różnych inhibitorów biosyntezy etylenu. Były to: galusan propylu, cysteina, dwuetylotiokarbaminian sodu oraz EDTA. W krótkim okresie po infekcji (do 2 godz.) je-

dynie galusan hamował produkcję etylenu. Natomiast po wytworzeniu nekroz (20 godz. po inokulacji) układ był najbardziej wrażliwy na hamujące działanie EDTA. Wyniki te wskazują na istnienie różnych prekursorów etylenu przed i po wytworzeniu nekroz a więc zmianę mechanizmu biosyntezy etylenu. Synteza etylenu zależała by od przemian biochemicznych towarzyszących postępującemu procesowi lokalizacji wirusa (51).

Wyniki badań nad wpływem prekursorów biosyntezy etylenu oraz auksyn na procesy lokalizowania wirusów zdają się potwierdzać powyższe wnioski. Wykazano, że prekursor etylenu — kwas 2-chloroetylofosfonowy zmniejszał wielkość plam nekrotycznych w układzie *N. tabacum* Samsun NN/TMV (52, 53). W podobny sposób działały auksyny: kwas indooloocowy i α -naftyloocowy (54, 55). Zmniejszenie wielkości nekroz wskazuje na wzrost zdolności rośliny do lokalizowania wirusa.

Na podstawie wyników przedstawionych wyżej można jedynie wnioskować o korelacji między procesami lokalizowania a produkcją etylenu. Nie pozwalają one jednak na określenie zależności przyczynowej między tymi zjawiskami.

I-3. Biosynteza związków fenolowych w czasie reakcji nekrotyzacji

Biosynteza fenoli przebiega w roślinie w zasadzie dwiema drogami. W jednej fenyloalanina przekształca się do kwasu *trans*-cynamonowego przy udziale amoniako-liazy fenyloalaniny (PAL) dając substrat do syntezy wielu flawonoidów i lignin (56), (Ryc. 2). Kwas cynamonowy jest też substratem do syntezy fitoaleksyn (56), patrz I-4. Druga droga biosyntezy fenoli przebiega poprzez kondensację malonylo-koenzymu A (57).

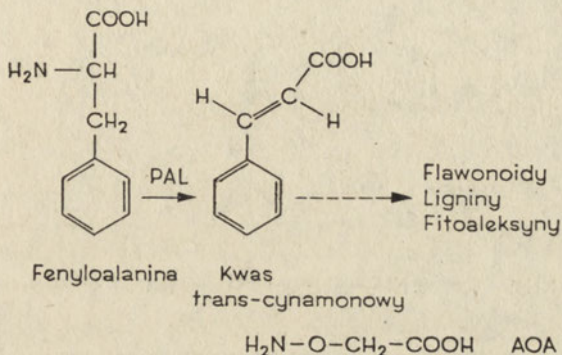
Związki fenolowe wykazują dużą aktywność biologiczną, która wynika przede wszystkim z ich łatwości utleniania do hinonów, działających często jako inhibitory procesów utleniania biologicznego (58).

Modyfikacje metabolizmu fenoli obserwuje się we wczesnych etapach odpowiedzi nekrotycznej na zakażenie wirusem. Szczegółowe badania wykazały, że w kilku układach wirus/roślina odpowiedzi nekrotycznej towarzyszy aktywacja procesów utleniania, manifestująca się wzrostem aktywności oksydaz. Między innymi stwierdzono aktywację oksydazy polifenolowej w układach *N. glutinosa*/TMV, *Datura stramonium*/TMV, *Vigna sinensis*/CMV i TMV oraz *N. glutinosa*/CMV (59—62). Sugerowano, że aktywacja oksydazy polifenolowej powoduje gromadzenie się chinonów a w konsekwencji — śmierć komórki: pojawienie się obszaru obumarłych komórek hamuje rozprzestrzenianie się wirusa. Z drugiej strony stwierdzono, że aktywacja oksydazy rozpoczyna się później niż formowanie się nekroz. Poinfekcyjną aktywację oksydazy polifenolowej obser-

wowano również w tkankach *N. tabacum* w temperaturze podwyższonej (35°C), w której nekrozy nie powstawały (63). Należy więc raczej sądzić, że zjawisko aktywacji tego enzymu ma charakter wtórny (64).

Nie można wykluczyć możliwości bezpośredniego wpływu utlenionych fenoli na wiriony. Stwierdzono np., że *o*-benzochinon oraz utlenione formy kwasu chlorogenowego, katecholu i dwuhydroksyfenyloalaniny (DOPA) inaktywują wirusy poprzez tworzenie trwałych kompleksów z białkami płaszczowymi wirionów (65—68) lub z RNA wirusowym (69).

Traktowanie feniloalaniną ilości zakażonych TMV powodowało zwią-



Ryc. 2. Kluczowy etap biosyntezy związków fenolowych w roślinie: konwersja feniloalaniny do kwasu *trans*-cynamonowego

szenie średnicy plam nekrotycznych (70). Wyciągnięto stąd wniosek, że feniloalanina w jakiś sposób inicjuje powstawanie plam — prawdopodobnie wpływa na enzymy syntezy fenoli (71). W związku z tym zwrócono uwagę na kluczowy enzym przemian feniloalaniny amoniako-liazę feniloalaniny (72—80). Badano kilka układów m.in. *N. tabacum* Xanthi-nc/TMV, *N. tabacum* Samsun NN/TMV, *Phaseolus vulgaris*/TNV i *N. glutinosa*/TMV (72—73). Stwierdzono ścisłą korelację między ilością plam, czasem ich pojawiania się oraz aktywnością amoniako-liazy. Ostatnio badając rośliny *N. tabacum* Xanthi-nc zakażone TMV wykazano nawet wcześniejszą aktywację amoniako-liazy w stosunku do pojawiania się plam (74).

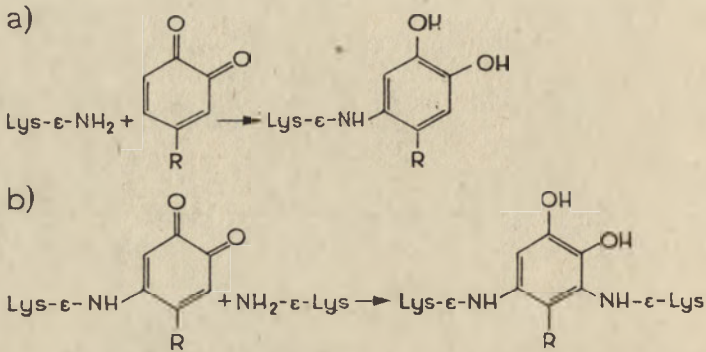
W roślinach *N. tabacum* zawierających gen nadwrażliwości N obserwowano wzrost aktywności tego enzymu również w temperaturze 35°C, gdzie nie powstawały nekrozy. W roślinach *N. tabacum* zaś nie zawierających genu N, np.: *N. tabacum* Xanthi/TMV, takiej aktywacji nie obserwowano, niezależnie od temperatury (74).

Aktywacja amoniako-liazy zachodzi początkowo w tkankach ulegających bezpośrednio nekrotyzacji, później jednak obejmuje obszar komórek otaczających plamę nekrotyczną (75).

Mechanizm aktywacji amoniako-liazy jest nieznan. Ostatnie badania Fritiga (76) wskazują, że amoniako-liaza jest enzymem o dłu-

gim okresie półtrwania. Jego skład białkowy nie zmienia się pod wpływem zakażenia — wzrasta natomiast jego stężenie. Wzrost stężenia enzymu jest wynikiem stymulacji jego syntezy *de novo* (77).

Istotne znaczenie amoniako-liazy w reakcji nadwrażliwości wykazano ostatnio przez zastosowanie inhibitorów kompetycyjnych tego enzymu a mianowicie kwasu aminoksyoctowego (AOA) (78). Hodowanie zainfekowanych TMV liści *N. tabacum* Samsun NN na pożywce zawierającej AOA powodowało kilkakrotne zwiększenie średnicy plam a więc obniże-



Ryc. 3. Struktura adduktu kwasu chlorogenowego z grupami ξ -NH₂ reszt lizyny białka kapsydowego PVX tworzącego się w pH 7,0: a) addukt 1 cząsteczki kwasu chlorogenowego z 1 cząsteczką lizyny, b) kwas chlorogenowy jako reagent dwufunkcyjny

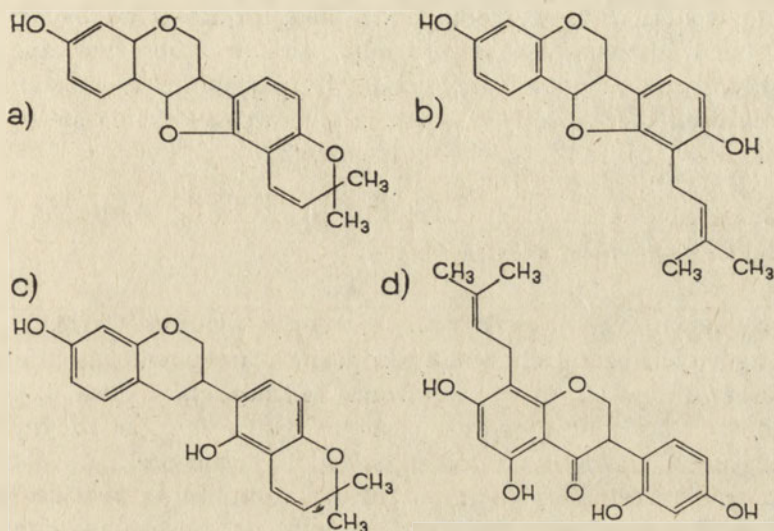
nie odporności. Jednocześnie stwierdzono, że AOA nie wpływało na stężenie amoniako-liazy w badanych tkankach. Generalnie można powiedzieć że aktywność amoniako-liazy jest tak związana ze zjawiskiem nekrotyzacji, że może służyć jako marker tego procesu (79).

Obserwowano również zmiany aktywności innych enzymów szlaku fenolowego: hydroksylaza kwasu cynamonowego, transaminaza fenyloalaninowa, ligaza kwas hydroksycynamonowy: koenzym A oraz *o*-metylo transferazy *o*-dwufenoli (80). Te ostatnie są bezpośrednio zaangażowane w biosyntezę lignin (81).

I-4. Rola fitoaleksyn w procesach lokalizowania wirusów

Rośliny zainfekowane grzybami wytwarzają tzw. fitoaleksyny, związki fenolowe o aktywności antygrzybowej (82—86). W soi pod wpływem zakażenia grzybem z rodzaju *Phytophthora* powstaje fazeolina (Rys. 4) — w odmianach odpornych tworzy się ona 20—50 razy szybciej niż w podatnych (87). Wykazano, że w niektórych przypadkach infekcji wirusowej towarzyszy również synteza fitoaleksyn (88). Podczas lokalizowania

wirusa nekrozy tytoniu w liściach soi maksimum produkcji fazeoliny było skorelowane w czasie z powstawaniem plam nekrotycznych. Wzrost syntezy fazeoliny obserwowano w tkankach otaczających nekrozy. W związku z tym autorzy przypuszczają, że fazeolina jest zaangażowana w regulacji wielkości plam powodując odporność tkanek otaczających plamy na dalszą infekcję wirusem.



Ryc. 4. Fitoaleksyny powstające w roślinie pod wpływem infekcji wirusowej: a) fazeolina, b) fazeolidyna, c) izoflawn fazeoliny d) kiewiton

W innych roślinach wykazujących zdolność lokalizowania wirusów, np.: *N. tabacum* Samsun NN/TMV (89, 91) lub TNV (92) oraz *Phaseolus vulgaris* Pintho/TMV (90a, 93), substancje o charakterze fitoaleksyn były syntetyzowane w całej roślinie a więc również w liściach niezakażonych. W związku z tym, rośliny po infekcji wirusem stawały się odporne na wtórne zakażenie grzybami.

Skład fitoaleksyn badano dokładniej w układzie *P. vulgaris*/TNV (90b). Z hipokotyli *P. vulgaris* zakażonych TNV wyizolowano cztery związki fenolowe o aktywności antygrzybowej: fazeolinę, fazeolidynę, izoflawn fazeoliny i kiewiton (Rys. 4). Te same substancje powstawały po infekcji hipokotyli grzybem *C. lindemuthianum*.

Wytwarzanie fitoaleksyn podczas lokalizowania wirusów jest zjawiskiem zaobserwowanym niedawno. Dotychczasowe wyniki badań ograniczają się do stwierdzenia faktu i wstępnych wyjaśnień. Zupełnie nie wiadomo czy fitoaleksyny biorą udział w procesie lokalizacji wirusów, a jeżeli tak, to jaki jest mechanizm tego zjawiska. Nie jest wykluczone, że akumulacja fitoaleksyn jest tylko wynikiem ogólnych zmian metabolizmu fenoli w tkankach lokalizujących (I-3).

II. Biochemiczno-fizjologiczne mechanizmy odporności nabytej

Odporność nabyta rozwija się w niezainfekowanych częściach rośliny po zakażeniu innych jej części wirusem lub działaniu czynnikami niewirusowymi (94). Czynniki wywołujące odporność nabytą nazywamy induktorami tej odporności.

Odporność nabyta bardzo często powstaje jako wynik procesów lokalizowania wirusa. Stosowanie układów lokalizujących do badań mechanizmów odporności nabytej jest dogodnie, ponieważ obserwowane zmiany metaboliczne nie mogą być wywołane bezpośrednim namnażaniem wirusa w liściach niezakażonych — wirus nie rozprzestrzenia się w roślinie i jest lokalizowany w liściach inokulowanych.

II-1. Induktory odporności nabytej

Porażenie dolnych liści *Dianthus barbatus* wirusem CarMV wywoływało w górnych częściach rośliny odporność na powtórny infekcję CarMV. Obserwowano ok. 90% hamowania namnażania wirusa w porównaniu z kontrolną rośliną nieporażoną (95). Odporność o podobnym charakterze uzyskano w wielu innych układach induktor/roślina. W tablicy 1 pokazano niektóre układy induktor/roślina, czynniki aktywujące oraz zakres powstałej odporności. Jak widać z tablicy, szczególnie dobrze zbadano odporność nabytą w różnych gatunkach i odmianach rodzaju *Nicotiana*.

Induktorami odporności nabytej, prócz wirusów, mogą być takie czynniki jak wirusy inaktywowane (115), ekstrakty z bakterii (120—122), zarodniki grzybów (121), wirusowe białka płaszczowe (107), polisacharydy (123), obce kwasy rybonukleinowe (124—125), dwuniciowy polinukleotyd poli (I×C) (106), kwas poliakrylowy (109—110), kwas inozytolosześcioletyfosforowy (108), bezwodnik etyleno-maleinowy (126).

Mechanizm indukcji odporności nabytej jest nieznan. Nie wiadomo, czy induktor przenikając przez błonę stymuluje procesy odpornościowe wewnątrz komórki czy też nie przenika przez błonę lecz aktywuje odpowiedni receptor błonowy podobnie jak hormony czy interferon w tkankach zwierzęcych.

Wyniki badań nad wpływem wielkości cząsteczki kwasu poliakrylowego na jego własności aktywujące wykazały, że w zakresie ciężarów cząsteczkowych od 3000 do 1 000 000 zdolność do aktywacji zmniejszała się ze wzrostem długości łańcucha polimeru (109). Autorzy przypuszczają, że świadczy to o malejącej przepuszczalności błony komórkowej dla polianionu o wzrastającej wielkości. Nie można jednak wykluczyć swoistej aktywacji receptora błonowego przez kwas poliakrylowy. W tkankach zwierzęcych obserwujemy zjawisko odwrotne: zdolność do stymulacji

Tabela 1

Zestawienie niektórych układów wirus/roślina wykazujących odporność nabytą, czynniki indukujące oraz wielkość i specyficzność powstałej odporności

Lp.	Induktor	Roślina	Odporność nabyta		Piśmien- nictwo
			Wirus	% hamowania ¹⁾	
1	2	3	4	5	6
1.	CarMV	<i>Dianthus barbatus</i>	CarMV	80	95
2.	TMV, TNV	<i>N. tabacum</i>	TMV	60	96
		„Samsun NN”	TNV	—	97
			TRSV	40	98
			TomRSV	—	99
3.	<i>Pseudomonas siringae</i>	<i>N. tabacum</i>	TMV	95	100
		„Samsun NN”			
4.	<i>Pseudomonas fluo- rescens</i>	<i>N. tabacum</i>	TMV	65	101
		„Xanthi-nc”			
5.	<i>E. coli-ekstrakt</i>	<i>N. tabacum</i> „SamsunNN”	TMV	70	102
		<i>N. tabacum</i> „Xanthinc”	TMV	60	
6.	RNA — drożdże	<i>N. tabacum</i> „SamsunNN”	TMV	—	104, 105
7.	<i>Bacillus uniflagel- latus</i> — ekstrakt	<i>N. tabacum</i> „Xanthi”	TMV	70	103
8.	TMV — białko kap- sydu	<i>N. glutinosa</i>	TMV, PVX	50	107
		<i>Datura stramonium</i>	TMV, PVX	90	
9.	kw. inozytolosze- sciofosforowy	<i>N. tabacum</i>	TMV	100	108
10.	kw. poliakrylowy	<i>N. tabacum</i> „Xanthi-nc”	TMV	100	109
			TNV	100	110
			PVX	0—10	110
11.	TMV	<i>N. glutinosa</i>			112
12.	poli(I × C)	<i>N. tabacum</i> „SamsunNN”	TMV	50	106
		<i>Datura stramonium</i>	TMV	60	106
13.	TNV, TMV inakt. UV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	TMV	—	116
14.	Białko kapsydu TMV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	TMV	45	115
15.	AMV, TMV, TNV, SBMV, CMV	<i>Phaseolus vulgaris</i>	AMV, TMV		
		<i>Vicia faba</i>	CMV, TNV, SBMV	—	113a, b
16.	TMV, PVX	<i>Datura stramonium</i>	TMV, PVX	—	114
		<i>Gomphrena globosa</i>	TMV, PVX	—	114
17.	inakt. PVX PVX	<i>Capsicum pendulum</i>	PVX	64	115
			PVX	72	115

¹⁾ % hamowania — hamowanie namnażania wirusa oszacowane w warunkach optymalnych i wyrażone jako stosunek nekroz powstałych na liściach roślin traktowanych induktorem i nietraktowanych

syntezy interferonu wzrasta ze wzrostem długości polimeru — induktora (127).

II-2. Specyficzność odporności nabytej

Na podstawie dotychczasowych, bardzo niepełnych danych trudno wnioskować o specyficzności odporności nabytej w roślinach. Nie ustalono pełnego zestawu wirusów namnażających się w poszczególnych roślinach odpornych (patrz Tabela 1). Można jedynie stwierdzić, że w wielu wypadkach zakażenie rośliny określonym wirusem dawało odporność przeciwko innym wirusom. Podobne efekty obserwowano po zastosowaniu induktorów nie-wirusowych.

W roślinach *Phaseolus vulgaris* Pintho można wywołać odporność pięcioma różnymi wirusami — w każdym przypadku roślina staje się odporna na wszystkie pozostałe wirusy (tabela 1). Podobne zjawisko stwierdzono również w roślinach *N. tabacum* Samsun NN oraz *Vicia faba*. Z drugiej strony białko płaszczowe wirusa mozaiki tytoniu wywoływało w roślinach *N. glutinosa* i *Datura stramonium* odporność przeciwko TMV i PVX lecz nie przeciwko CMV (Tabela 1, pozycja 7).

Należy generalnie podkreślić, że odporność nie oznacza immunności — stąd też obserwuje się jedynie pewne hamowanie namnażania wirusa w tkankach odpornych w porównaniu z podatnymi. Wyraża się to zmniejszeniem liczby lub wielkości plam lokalnych albo też zmniejszeniem stężenia wirusa w tkankach. Na tej podstawie można określić ilościowo stopień powstałej odporności przeciwko danemu wirusowi wyrażając go w % hamowania namnażania wirusa w stosunku do roślin nieodpornych (Tabela 1).

II-3. Wpływ aktynomycyny D na odporność nabytą

Aktynomycyna D na ogół nie wpływa hamująco na replikację wirusów (128), przeciwnie, w wielu wypadkach stwierdzono stymulujący wpływ tego antybiotyku na namnażanie, np.: w układach *N. tabacum*/TMV (127) lub *Datura stramonium*/PVX (129). Jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie się odporności nabytej pod wpływem aktynomycyny D. W liściach *Cucumis sativus*, odpornych na wirusa mozaiki ogórka, po traktowaniu aktynomycyną D na jeden dzień przed zaszczepieniem wirusa, wzrastała szybkość namnażania CMV (130—131).

Traktowanie liści *N. tabacum* Xanthi-nc kwasem poliakrylowym wywoływało całkowitą odporność na TMV i TNV — immunność (109). Powstaniu odporności towarzyszyła synteza czterech dodatkowych białek (patrz II-4). Jeżeli roślinę traktowano mieszaniną kwasu poliakrylowego i aktynomycyny D — odporności nie uzyskano. Stosowanie aktynomy-

cyny D nie później niż w ciągu dwóch dni po zaszczepieniu wirusa również likwidowało odporność. Nie stwierdzono tworzenia dodatkowych białek (110).

Podobne do omawianych wyżej wyniki uzyskano badając wpływ aktywności D na powtórny infekcję *N. tabacum* Samsun NN przez TMV — zakażonego uprzednio TMV lub PVY (99, 110).

Fakt, że procesy odpornościowe są hamowane przez aktywność D, wskazuje na ich zależność od procesów transkrypcji komórkowego DNA. Nie jest wykluczone, że roślina pod bezpośrednim lub pośrednim wpływem wirusa albo innego induktora, produkuje substancje odpornościowe o charakterze białkowym (patrz II-4).

II-4. Białka towarzyszące odporności nabytej

Wyniki badań nad charakterystycznymi własnościami odporności nabytej oraz nad jej aktywatorami i inhibitorami sugerują powstawanie w roślinie substancji o aktywności antywirusowej.

Porażenie dolnych części liści *Datura stramonium* przez TMV wywoływało odporność na infekcję tym wirusem w górnych częściach liści. Po ekstrakcji górnych części liści buforem boranowym i wytrąceniu octanem cynkowym — wyizolowano substancję białkową o m.c. około 28 000 D (132). Podobne białko wyizolowano z liści *N. tabacum* oraz *Datura stramonium* po traktowaniu kwasem inozytolo sześciofosforowym (133). Wyizolowane białka hamowały infekcję *N. tabacum* Samsun NN przez TMV.

Również w nieoczyszczonych ekstraktach z odpornych liści *Capsicum pendulum* zakażonej PVX (115) i z liści *Phaseolus vulgaris* zakażonej TNV (117) oraz TMV po naświetleniu UV (115), w ekstraktach z niezakażonych połówek liści roślin *N. glutinosa* i *D. stramonium* aktywowanych TMV, *Chenopodium amaranticolor* i *Phaseolus vulgaris* Prince aktywowanych TNV (134) — znajdowały się substancje o aktywności inhibitorów infekcji. W roślinach niezakażonych nie stwierdzono obecności tych związków.

Wykazanie, że w odpornych częściach rośliny powstają substancje wykazujące aktywność inhibitorów infekcji, nie pozwala oczywiście jednoznacznie stwierdzić, że substancje te pozostają w ścisłym związku przyczynowym z mechanizmem odporności. Test biologiczny pozwala bowiem jedynie określić zdolność tych substancji do hamowania infekcji wybranych roślin testowych. Przyczyną takiego hamowania może być jedynie blokowanie miejsc receptorowych błony komórkowej lub działanie inhibitora jako aktywatora odporności (135).

W związku z tymi zastrzeżeniami podjęto badania nad dokładniejszym scharakteryzowaniem substancji towarzyszących odporności nabytej. Badania prowadzono na takich roślinach, w których odporność na-

byta była wywołana reakcją nadwrażliwości na zakażenie danym wirusem. Wirus był zlokalizowany w obrębie plam nekrotycznych tylko na liściach inokulowanych.

Za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wykazano, że ekstrakty z liści *N. tabacum* Xanthi-nc i Samsun NN zainfekowanych TMV — zawierają przynajmniej cztery dodatkowe białka w porównaniu z roślinami zdrowymi (136—137). Przypuszczano, że białka te, oznaczone b_1 , b_2 , b_3 i b_4 , biorą udział w powstawaniu odporności nabytej. Działanie podwyższonej temperatury (109, 138), lub aktynomycyny D (110) hamowało powstawanie zarówno odporności jak i tych białek dodatkowych.

Przynajmniej trzy spośród czterech białek typu b pojawiały się w roślinach *N. tabacum* Xanthi-nc traktowanych kwasem poliakrylowym (109—110). W przeciwieństwie do indukcji wirusami, odporność wykazywały tylko liście traktowane kwasem poliakrylowym (140). Prawdopodobnie kwas poliakrylowy jest słabszym induktorem odporności i w związku z tym rośliny produkują mniej białek „odpornościowych”.

Białka b_1 , b_2 i b_3 częściowo oczyszczona i badano ich budowę (142). Białka b_2 i b_3 stanowiły odpowiednio dimer i trimer białka b_1 — białko b_4 było monomerem o innym składzie. Niemniej ze względu na stosowanie kwaśnych buforów do ekstrakcji białek (pH 2,8) powyższe wyniki budzą wątpliwości.

Ostatnio opracowano nową metodę oczyszczania białka b_1 stosując chromarografię na DEAE-celulozie i sączenie na żelu Sephadex (141). Uzyskano homogenne białko o ciężarze cząsteczkowym około 15 000. Nie oczyszczono do stanu homogennego pozostałych białek b. Próbowano wykryć aktywność antywirusową białka b_1 badając wpływ tego białka na namnażanie TMV w protoplastach *N. tabacum* (142). Nie stwierdzono jednak żadnego efektu hamującego.

W tkankach kalusa *N. tabacum* Xanthi-nc nie zachodzi synteza białek b (142). Wyjaśnienie różnej reakcji tkanek liściowych i kalusowych nie jest proste. Autorzy sugerują, że brak tych białek w kalusie może być w jakiś sposób związany z obserwowaną różnicą szybkości syntezy białek płaszczowych i powstawania wirionów w obu rodzajach tkanek (143).

Białka dodatkowe, podobne do białek b tworzyły się również w roślinach *N. tabacum* zakażonych innymi wirusami (122, 139, 140) jak też w innych roślinach np.: *Vigna sinensis* po infekcji TNV (143).

Ponieważ białka dodatkowe pojawiały się w liściach niezakażonych, wykazujących odporność nabytą — przypisywano im istotną rolę w powstawaniu odporności nabytej na zasadzie analogicznej do działania inetrferonu. Jak pokazano wyżej, nie stwierdzono jednak ich aktywności antywirusowej. Co więcej, w *N. tabacum* Samsun NN indukowano odporność nabytą na TMV za pomocą chlorku rtęciowego bez tworzenia się białek dodatkowych (144).

Ostatnio zaobserwowano zjawisko odwrotne do odporności nabytej (152). Stwierdzono zwiększenie podatności górnych liści *N. glutinosa* na infekcję TMV pod wpływem uprzedniej infekcji i lokalizacji TMV w liściach dolnych. Pojawianiu się tej tzw. podatności nabytej towarzyszyło powstawanie białek dodatkowych typu b. Zjawisko to, całkowicie przeciwne do wyników dotychczas stwierdzanych w roślinach *N. tabacum*, na razie nie zostało wyjaśnione. Tym niemniej poddaje w wątpliwość istotne znaczenie białek b dla odporności nabytej.

W liścieniach *Cusumis sativus* zakażonego TSWV lub CMV, wykryto dodatkowe białko E₁ o masie cząsteczkowej około 22 000 (145, 146). Na podstawie analizy immunochemicznej stwierdzono, że białko E₁ nie jest serologicznie pokrewne wirusowym białkom strukturalnym. Prawdopodobnie więc jest kodowane przez genom roślinny. Białko nie było jednak związane z odpornością, ponieważ występowało również w liściach ogórka zainfekowanych systemowo oboma wirusami.

II-5. Analogie z interferonem

W komórkach zwierzęcych zakażonych wirusami powstają substancje o charakterze białkowym zwane interferonem. Interferon wykazuje własności antywirusowe. Nie posiada on swoistości względem określonych wirusów, natomiast wykazuje swoistość gatunkową a nawet tkankową (147).

Stymulatorami syntezy interferonu, prócz wirusów, są substancje o charakterze polianionowym: dwuniciowy RNA, dezaktywowane wirusy, polinukleotyd poli (I×C), kwas poliakrylowy oraz antybiotyki helezyna i statolon (148, 149). Syntezę interferonu hamują antybiotyki aktynomycyna D i cykloheksyloimid (150) jako inhibitory syntezy białka.

Przypuszcza się, że interferon wiążąc się ze specyficznym receptorem błony komórkowej indukuje powstawanie w komórce białek aktywnych, odpowiedzialnych za stan antywirusowy komórki (147). Indukcja stanu antywirusowego jest hamowana przez aktynomycynę D i cykloheksyloimid. Prawdopodobnie więc interferon pobudza biosyntezę nowego białka odpowiedzialnego za stan odporności.

Wyniki badań układów bezkomórkowych, uzyskanych z komórek poddanych działaniu interferonu sugerują, że powstała odporność komórki ma charakter złożony. Polega ona głównie na hamowaniu syntezy białek i kwasów nukleinowych zarówno komórkowych jak i wirusowych. Ze względu na wykładniczy charakter namnażania wirusy podlegają działaniu hamującemu w sposób nieporównywalnie silniejszy (147).

Przedstawione wyżej charakterystyczne cechy interferonu w porównaniu z cechami niektórych białek związanych z odpornością nabytą w roślinach (białka typu b, czynnik antywirusowy AVF) — pozwalają na wyciągnięcie pewnych analogii (32, 36, 110, 140). I tak, struktura chemicz-

na czynnika antywirusowego (glikoproteid), czynniki stymulujące syntezę oraz hamowanie syntezy przez aktynomycynę D jak również jego aktywność antywirusowa — są analogiczne do cech interferonu. Jednak w przeciwieństwie do interferonu — omawiany czynnik antywirusowy nie wykazuje specyficzności gatunkowej (35, 115, 151).

Ponieważ, jak stwierdzono wyżej, nic nie wiadomo o molekularnym mechanizmie działania białek dodatkowych typu b jako również czynnika antywirusowego — nie wiadomo zatem, czy są one analogicznymi do interferonu stymulatorami odporności komórki. Badania wpływu czynnika antywirusowego AVF na różne etapy biosyntezy białek i kwasów nukleinowych pozwolą prawdopodobnie bliżej określić analogie między interferonem a białkami związanymi z odpornością nabytą w roślinach.

III. Uwagi końcowe

Dotychczasowe wyniki badań nad mechanizmami odporności roślin na wirusy, jak to wynika z przedstawionego wyżej przeglądu, nie pozwalają na jednoznaczne ich wyjaśnienie. Można jednak już sformułować wstępne hipotezy.

I tak wydaje się, że procesy lokalizowania wirusów polegają na indukcji w komórkach zakażonych pewnych czynników odpornościowych, np.: AVF, które działają podobnie do interferonu w tkankach zwierzęcych. Przenikając do sąsiednich komórek stymulują one stan odpornościowy. W związku z tym wokół komórek zainfekowanych pojawia się warstwa komórek odpornych na zakażenie, stanowiąca barierę dla dalszego rozprzestrzeniania się wirusa.

Dokładnie nie wiadomo, na czym polega ten stan odporności — na pewno charakteryzuje się wzmożeniem procesów biosyntezy białek i ogólną aktywizacją metabolizmu.

Aktywizacji ulegają m.in. procesy syntezy związków fenolowych: utlenianie fenoli do chinonów powoduje zamieranie komórek wcześniej zainfekowanych. W rezultacie powstają plamy nekrotyczne. Wydaje się, że nekrotyzacja tkanek jest procesem wtórnym i nie jest odpowiedzialna za zahamowanie rozprzestrzeniania się wirusów.

Zjawisko odporności nabytej powstałe w wyniku uprzedniego zakażenia wirusami lub działania czynników niewirusowych — często towarzyszy procesom lokalizacji. Jest to bardzo dogodny układ do badania mechanizmów odporności nabytej, gdyż wszelkie zmiany biochemiczne w tkankach odpornych napewno nie są spowodowane bezpośrednim namnażaniem wirusów.

Na obecnym etapie badań trudno nawet w przybliżeniu podać mechanizm odporności nabytej. Zbyt mało jest bowiem danych charakteryzujących stan odporności nabytej.

Istotną rolę próbowano przypisać białkom dodatkowym obserwowanym w tkankach odpornych. Ostatnio jednak stwierdzono te same białka w tkankach o zwiększonej podatności na zakażenie wirusowe. Stąd także ich rola jest conajmniej niepewna.

Niewątpliwie ciekawym byłoby wyjaśnić, na ile oba zjawiska: lokalizowanie wirusów i odporność nabyta mają wspólny mechanizm powstawania i działania. Na podstawie dotychczasowych wyników można jedynie przypuszczać, że zarówno odporność nabyta jak i lokalizacja są wynikiem stymulującego działania czynników rozchodzących się w tkankach roślinnych a powstałych w komórkach zainfekowanych wirusami. Nie wiadomo jednak, czy są to te same czynniki.

Zaakceptowano 29.2.1980

PIŚMIENNICTWO

1. Loebenstein, G., (1972), *Ann. Rev. Phytopathol.* **10**, 177—200.
2. Diener, T.O. (1963), *Ann. Rev. Phytopathol.*, **1**, 197—213.
3. Arcichowska, J., Rubin, B. (1971), „Biochemia i fizjologia odporności roślin”, tłum. j. ros., W-wa, PWRiL.
4. „Patofizjologiczieskaja fiziologia i immunitiet rastienij”, praca zbiorowa pod red. N. I. Czugireva, Izd. Moskowskowo Uniwersyteta 1976.
5. Solymosy, F., Farkas, G. L. (1963), *Virology*, **21**, 210—221.
6. Merrett, M. J., Sunderland, D. W. (1967), *Bot. Rev.*, **32**, 371—92.
7. Loebenstein, G., Rabina, S., van Praagh, T., (1968), *Virology*, **34**, 264—268.
8. Loebenstein, G., Sela, B., van Praagh, T., (1969), *Virology*, **37**, 42—48.
9. Sela, B., Loebenstein, G., van Praagh, T. (1969), *Virology*, **37**, 260—64.
10. Sander, E. (1969), *J. Gen. Virol.*, **4**, 232—44..
11. Kuhn, C. W. (1971), *Virology*, **43**, 101—09.
12. Loebenstein, G., Chazen, R., Eisenberg, M. (1970), *Virology*, **41**, 373—76.
13. Miczyński, K. (1976), *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, **182**, 69—81.
14. Erismann, K. H., Fankhauser, M. (1967), *Experimentia*, **23**, 621—622.
15. Osborne, D., (1971), *Plant Physiol.*, **37**, 595—602.
16. Romanko, E. G., Selinvankina, S. Y. (1977), *Fiziol. Rastenii*, **24**, 1014—1020.
17. Murai, N., Toller, B. J., Skoog, F. (1977), *Plant Physiol.*, **60**, 197—202.
18. Berrige, M. V., Ralph, R. K., Letham, D. S. (1970), *Biochem. J.*, **119**, 75—84.
19. Kiraly, Z., El Hammady, M. (1968), *Phytopath. Z.*, **63**, 47—63.
20. Nakagaki, Y., (1971), *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, **37**, 307—309.
21. Cheo, P. C., (1970), *Phytopathol.*, **60**, 41—6.
22. Simons, T. J., Ross, A. F., (1963), *Phytopathol.*, **55**, 1076—7.
23. Reunov, A. V., Reunova, G. D., Zhilina, T. T. (1977)
24. Milo, G. E., Srivastava, B.L.S. (1969) *Virology*, **38**, 26—31.
25. Simons, T. J., Israel, H. W., Ross, A. F. (1972), *Virology*, **48**, 502—506.
26. Tavantzis, S. M., Smith, S. H., Witham, F. H. (1979) *Physiol. Pl. Pathol.*,

- 14, 227—30.
27. Omura, T., Wahimoto, S. (1978) *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **22**, 211—219.
 28. Altwinkle, H. S. (1975) *Virology*, **66**, 341—343.
 29. Matthyse, A. G., Abrams, M. (1970) *Bioch. Bioph. Acta*, **190**, 511—518.
 30. Hendry, L. B., Witham, F. H., Chapman, O. L. (1977) *Persp. Med. Biol.*, **21**, 120—130.
 31. Anton, Y., Harpaz, I., Sela, I. (1977) *J. Gen. Virol.*, **35**, 107—116.
 32. Mozes, R., Antignus, R., Sela, I., Harpez, I. (1978) *J. Gen. Virol.*, **38**, 241—9.
 33. Antignus, Y., Sela, I., Hauschner, A. (1971), *Phytopath. Z.*, **70**, 345—350.
 34. Antignus, Y., Sela, I., Harpaz, I. (1975) *Physiol. Pl. Pathol.*, **6**, 159—168.
 35. Sela, I., Hauschner, A., Mozes, R. (1978), *Virology*, **89**, 1—10.
 36. Sela, I., Harpaz, I., Birk, Y. (1965) *Virology*, **25**, 80—82.
 37. Gulyas, A., Farkas, G. L. (1978) *Phytopath. Z.*, **91**, 182—187.
 38. Premech, G., Olah, T., Farkas, G. L. (1977) *Plant Sci. Lett.*, **1**, 53—57.
 39. Burke, D. C. (1977), *Scient. Amer.*, **236**, 42—44.
 40. Otsuki, Y., Shimomura, T., Takebe, I., (1973), *Virology*, **50**, 45—57.
 41. Coutts, R. H. A. (1978), *Pl. Sci. Lett.*, **12**, 77—85.
 42. Heller, E. (1963), *Virology*, **21**, 652—656
 43. Goodman, A., (1972), *Phytopathol.*, **62**, 1327—1331
 44. Kopp, M., Fritig, B. (1978), *Phytochemistry*, **16**, 895—899.
 45. Mathews, R. E. F. (1970), „Plant Virology”, Acad. Press, London, New York.
 46. Abeles, F. B. (1973), „Ethylene in Plant Biology”, str. 58—86, Acad. Press, London, New York.
 47. Nakagaki, Y., Hirai, T., Stahmann, M. A. (1970) *Virology*, **40**, 1—9.
 48. Gaborjanyi, R., Balazs, E., Kiraly, Z. (1971) *Acta Phytopath. Hung.*, **6**, 51—5.
 49. Pitchard, D. W., Ross, A. F. (1975), *Virology*, **64**, 295—307.
 50. Ceo, P. C. (1971), *Phytopathology*, **61**, 869—872.
 51. Sikari, K. (1976) *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, **43**, 587—589.
 52. van Loon, L. C. (1978), Proceedings 3rd Intern. Congress of Plant Pathology, Munchen, RFN.
 53. van Loon, L. C. (1977), *Virology*, **80**, 417—420.
 54. Abeles, F. B. (1973), „Ethylene in Plant Biology, Academic Press, London.
 55. van Loon, L. C. (1979), *Physiol. Pl. Pathol.*, **14**, 213—226.
 56. Rubin, A., Arciszewska, J.,
 57. Hadwiger, L. A. (1966) *Phytochemistry*, **5**, 523—525.
 58. Lehninger, A. L. (1976), „Biochemistry”, Worth Publ., Inc. (2nd ed).
 59. Parish, G. L., Zaitlin, M., Siegel, A., (1965), *Virology*, **26**, 413—418.
 60. Milo, G. E., Santili, V., (1967), *Virology*, **31**, 197—206.
 61. Betes, G. C., Chant, S. R., (1970), *Ann. Appl. Biol.*, **65**, 105—110.
 62. Jokusch, H., (1966), *Phytopathol. Z.*, **55**, 185—192.
 63. Cabanne, F., Scalla, R., Martin, C., (1968) *Ann. Physiol. Vég.*, **10**, 199—208.
 64. Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F., Voros, J. (1977) „Fitopatologia—wybór metod badawczych”, tłum. 1977, PWRiL, Warszawa.
 65. Mink, G. L., Saksena, K. L., (1971) *Virology*, **45**, 755—763.
 66. Saksena, K. N., Mink, G. I., (1970) *Virology*, **40**, 540—546.
 67. Hampton, R. E., (1970) *Phytopathol.* **60**, 1677—1681.
 68. Pierpoint, W. S., Ireland, R. J., Carpenter, J. M., (1977) *Phytochemistry* **16**, 29—34.
 69. Woods, T. L., Agrios, G. N. (1974) *Phytopathology*, **64**, 35—37.

70. Santilli, W., Khan, N., (1977) w Current topics in Plant Pathology, red. Z. Kiraly, Academia Kiadó, Budapest, str. 385—8.
71. Walton, D. C., (1968) *Plant Physiol.*, **43**, 1120—1124.
72. Minamikawa, T., Uritani, I. (1964) *Arch. Biochem. Bioph.* **108**, 573—574.
73. Paynot, M., Martin, C., w Current Topic in Plant Pathology, red. Z. Kiraly, Academia Kiadó, Budapest, str. 375—383.
74. Duchesne, M., Fritig, B., Hirth, L. (1977) *Bioch. Bioph. Acta*, **485**, 465—481.
75. Duchesne, M., Fritig, B., Hirth, L. (1977), *Ann. Phytopathol.*, **9**, 535—536.
76. Fritig, B., Legrand, M., Duchesne, M. (1977) *Ann. Phytopathol.*, **8**, 123—130.
77. Fritig, B., Kopp, M., Legrand, M. (1979), CNRS/IBMC, Rapport d'activite, Strasbourg, str. 209—215.
78. Kopp, M., Fritig, B., (1977) *Phytochemistry*, **16**, 895—898.
79. Paynot, M., Martin, C., Giraud, M. (1973) *C. R. Acad. Sci. Paris, Série D*, **276**, 669—670.
80. Legrand, B., (1978) *Planta*, **144**, 101—108.
81. Fritig, B., Legrand, M., Hirth, L. (1978), Proceedings 3rd Intern. Congr of Plant Pathology, München.
82. Muller, R., (1957), *Phytopath. Z.*, **27**, 237—254.
83. Schwochau, M. E., Hadwiger, L. A. (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 731—733.
84. Sims, J. J., Keen, N. T., Honwad, V. K. (1972), *Phytochemistry*, **11**, 827—828.
85. Keen, N. T. (1971), *Physiol. Pl. Pathol.*, **1**, 265—275.
86. Klarman, W. L., Sanford, J. B. (1968), *Life Sci.*, **7**, 1095—1103.
87. Klarman, W. L., Garraway, M. O. (1972), *Phytopathology*, **62**, 719—721.
88. Hammerschlag, F., Klarman, W. L. (1969), *Phytopathology*, **59**, 1557.
89. Klarman, W. L., Hammerschlag, F. (1972), *Phytopathology*, **62**, 719—721.
90. Starr, J. L., Garraway, M. O. (1972) *Phytopathology*, **62**, 1111—1116.
91. Hecht, E. I., Bateman, D. F. (1964), *Phytopathology*, **54**, 523—530.
92. Smith, D. A., Van Etten, H. D., Bateman, D. F. (1971), *Phytopathology*, **61**, 912—14.
93. Bailey, J. A., Ingham, J. L. (1971), *Physiol. Pl. Pathol.*, **1**, 451—456.
94. Hirai, T. (1977) w „Plant Disease, An Advanced Treatise”, red. Horsfall, J. G., Cowling, E. B., t. 1, str. 285—305, Academic Press, London.
95. Gilpatrick, J. D., Weintraub, M. (1952), *Science*, **115**, 701—702.
96. Yarwood, C. E. (1960), *Phytopathology*, **50**, 741—744.
97. Bozarth, R. F., Ross, A. F. (1964), *Virology*, **24**, 446—455.
98. Ross, A. F., (1961), *Virology*, **14**, 340—358.
99. Loebenstein, G., Rabina, S., van Praagh, T. (1968), *Virology*, **34**, 264—268.
100. Loebenstein, G., Levrekovich, L. (1966), *Virology*, **30**, 587—591.
101. Klement, Z., Kiraly, Z., Porsar, B. I., (1966), *Acta Phytopath. Hung.*, **1**, 11—18.
102. Albouy, J., Lapierre, H., Maury, Y., Staron, T., (1969) *Ann. Phytopathol.*
103. Mann, E. W. (1969), *Phytopathology*, **59**, 658—662.
104. Gicherman, G., Loebenstein, G. (1968) *Phytopathology*, **58**, 405—409.
105. Cheo, P. C., Linder, R. C., (1968) *Virology*, **35**, 82—86.
106. Stein, A., Loebenstein, G. (1970), *Nature*, **226**, 363—364.

107. Loebenstein, G. (1962), *Virology*, **17**, 574—581.
108. Maia, E., Morel, G., (1965), *C. R. Acad. Sci. Paris*, **261**, 27—29.
109. Gianninazzi, S., Kassanis, B. (1974), *J. Gen. Virol.*, **23**, 1—9.
110. Kassanis, B., White, R. F. (1974), *J. Gen. Virol.*, **25**, 323—324.
111. Prochazkova, Z., (1975), *Biol. Plantarum*, **17**, 120—129.
112. Mozes, R., Antignus, Y., Sela, I., Harpaz (1978), *J. Gen. Virol.*, **38**, 241—249.
- 113a. Ross, A. F. (1966), w „Viruses of Plants”, red. Breemster, A. B., Dijkstra, J., str. 127—150, North Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- 113b. Conti, G. G. (1978), *Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung.*, **13**, 1—20.
114. Loebenstein, G., (1963), *Phytopathology*, **53**, 306—308.
115. Nagaigh, B. B., Singh, S. (1970), *Virology*, **40**, 267—271.
116. Hofferek, H., Proll, E., (1967), w Plant Virology, Proceedings of 6th Conf. Chech. Plant Virologists, str. 77—84, Olomouc, Academia, Prague.
117. Yoshizaki, T., (1966), *J. Microbiol.*, **10**, 85—91.
118. Hirai, T., Toru, T., Kiyonori, T. (1977), *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.*, **43**, 528—536.
119. Ota, N., (1978), *Ann. Phytop. Soc. Jpn.* **44**, 47—51.
120. Mann, E.W. (1969), *Phytopathology*, **59**, 678—682.
121. Wheeler, H., Pirone, T. P. (1969), *Science*, **166**, 1415—1417.
122. Gianninazzi, S., Martin, C., (1975), *Phytopath. Z.*, **83**, 23—26.
123. Gupta, B. M., Chandra, K., Verma, H. N., Verma, G. S. (1974), *J. Gen. Virol.* **24**, 211—213.
124. Gicherman, G., Loebenstein, G. (1968), *Phytopathology*, **58**, 405—409.
125. Ceo, P. C., Lindner, R. C., McRitchie, J. J. (1968), *Virology*, **35**, 82—86.
126. Stein, A., Loebenstein, G. (1970), *Phytopathology*, **62**, 1461—1466.
127. Reunova, G. D., Reunova, A. V., Reifman, V. G. (1973), *Virology*, **52**, 502—506.
128. Hirai, T., (1968), w Biochemical Regulation in Diseased Plants or Injury, red. Hirai, T., str. 105—114.
129. Magnanodisanlio, G., Davino, M. (1977), *Rivista di Path. Veg.*, **13**, 77—90.
130. Silberschmidt, K., Caner, J., (1967), *Arq. Inst. Biol. S. Paulo*, **34**, 127—133.
131. Loebenstein, G., Ross, A. F., (1963), *Virology*, **20**, 507—513.
132. Kimmins, W. G., (1969), *Can. J. Bot.*, **47**, 1879—1886.
133. van Loon, L. C., van Kammen, A. (1970), *Virology*, **40**, 199—211.
134. Gianninazzi, S., Valee, J. C., Martin., (1969), *Compt. Rend. Acad. Sci. Par.*, **268**, 800—802.
135. Loebenstein, G., (1972), *Ann. Rev. Phytopathol.*, **10**, 177—200.
136. van Loon, L. C. (1975), *Physiol. Pl. Pathol.*, **6**, 289—300.
137. van Loon, L. C. (1975), *Virology*, **67**, 566—575.
138. Kassanis, B., Gianninazzi, S., White, R. F. (1974), *J. Gen. Virol.*, **23**, 11—16.
139. Gianninazzi, S., Praatt, H. M., Shewry, P. R., Mifflin, B. J. (1977), *J. Gen. Virol.*, **34**, 345—351.
140. Beachy, R. N., Murakishi, H. H. (1973), *Virology*, **55**, 320—328.
141. Antoniow, J. F. (1978), *J. Gen. Virol.*, **39**, 343—348.
142. Tas, P. W. L., Peters, D., (1977), *Neth. J. Pl. Pathol.*, **83**, 5—12.
143. Ziemicki, A., Wood, K. R., (1976), *Physiol. Pl. Pathol.*, **7**, 78—89.
144. van Loon, L. C., (1975), *Virology*, **67**, 566—575.
145. Scalla, R., Boudon, E., Rigoud, J., (1976), *Virology*, **69**, 339—345.
146. Scalla, I., Appelbaum, W. S., (1962), *Virology*, **17**, 573—548

147. Friedman, R. M., (1977), *Bact. Reviews*, Sept. 1977, 543—567.
148. De Clercq, A., Ecstein, F., Merigan, T. C., (1972), *Ann. N. York Acad. Sci.*, **173**, 444—461.
149. Burke, D. C., (1977), *Scient. Amer.*, **236**, 42—44.
150. Heller, E., (1963), *Virology*, **21**, 652—656.
151. Chadha, K. C., McNeill, B. H., (1969), *Can. J. Bot.*, **47**, 513—518.
152. Fraser, R. S. S., Loughlin, S. A. R., Whenham, R. J., (1979), *J. Gen. Virol.*, **43**, 131—141.

NOWE W BIOCHEMII

Model rybosomu eukariotycznego

Kluczowe miejsce w procesie biosyntezy białka zajmują rybosomy. Wiele już wiadomo na temat struktury rybosomów prokariotycznych, natomiast budowa rybosomów eukariotycznych jest znacznie mniej poznana. Do chwili obecnej nie stwierdzono zasadniczych różnic w podstawowych funkcjach rybosomu w obu układach. Jednakże znacznie większa złożoność struktury rybosomów eukariotycznych sugeruje bardziej złożony mechanizm realizacji informacji genetycznej (patrz obszerne prace przeglądowe 1 i 2).

Badacze pracujący w różnych laboratoriach na różnorodnym materiale eukariotycznym stosowali odmienną terminologię, która wymagała ujednoczenia. Wyjaśnienia wymagała również istota problemu: czy rybosomy eukariotyczne, niezależnie od tego, z jakiego materiału pochodzą, posiadają taką samą strukturę. W tym celu w laboratorium E. H. McConkey'a (3) wykonano dwukierunkową elektroforezę żelową białek rybosomalnych wydzielonych z różnego materiału w następujących laboratoriach: z wątroby szczura (H. Bielka—Berlin, NRD; K. Ogata—Niigata, Japonia; I. G. Wool—Chicago, USA), z retikulocytów królika (J. A. Traugh—Riverside, USA), z komórek HeLa i wątroby myszy (E. H. McConkey—Boulder, USA). Przeprowadzona w identycznych warunkach analiza elektroforetyczna wykazała bardzo duże podobieństwo, jeżeli nie identyczność, wszystkich badanych preparatów białek rybosomalnych. Występujące niewielkie różnice (np. w ilości białek kwaśnych) przypisane zostały różnicom w procedurach izolacji.

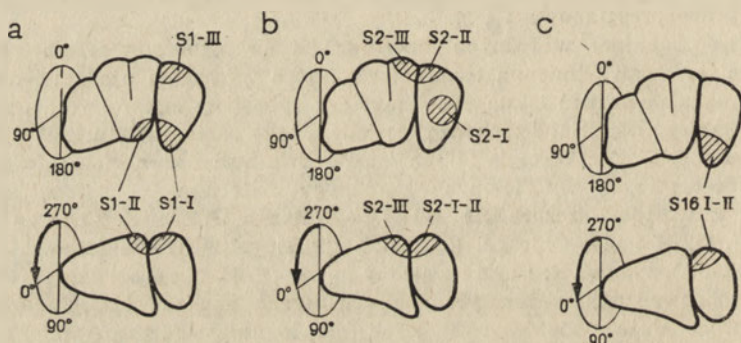
Eksperyment powyższy umożliwił wprowadzenie jednolitej nomenklatury białek rybosomalnych eukariotycznych oraz postawienie hipotezy, iż badania rybosomów prowadzone na dowolnym materiale eukariotycznym można uogólniać na wszystkie rybosomy typu 80 S.

W trakcie prac nad rybosomami z wątroby szczura w laboratorium H. Bielki w Centralnym Instytucie Biologii Molekularnej Akademii Nauk w Berlinie—Buch stwierdzono występowanie 30 białek w mniejszej podjednostce (40 S) oraz 40 w większej podjednostce (60 S). Wszystkie z nich zostały wydzielone w stanie homogenym. W mniejszej podjednostce rybosomalnej występują białka o ciężarach cząsteczkowych 8 000—35 000, w większej zaś o c. cz. 11 000—55 000. Stwierdzono, że przyjmują one kształt wydłużonych elipsoid o długości ok. 10 nm i stosunku osi 4 : 1. Najbardziej wydłużony kształt posiadają białka S2 i S3 o długości odpowiednio 19 i 14 nm przy stosunku osi 9,5 : 1 (4,5). Na podstawie krzyżowych reakcji immunologicznych stwierdzono, iż każde z wyizolowanych białek rybosomalnych daje inną odpowiedź immunologiczną (5). Oznacza to, że nie ma dwóch identycznych białek w rybosomie eukariotycznym.

Badania nad rolą biologiczną specyficznych białek rybosomalnych prowadzono m.in. z zastosowaniem homogennych przeciwciał. Inhibicja procesu translacji w

konsekwencji dodania do układu poszczególnych przeciwciał świadczy o uczestnictwie badanego białka w owym procesie. Przeanalizowano w ten sposób biosyntezę polifenyloalaniny w układzie *in vitro*. Stwierdzono, że proces ten hamują przeciwciała względem następujących białek rybosomalnych: S9, S12 oraz w mniejszym stopniu S15. A zatem te trzy białka są bezpośrednio zaangażowane w procesie syntezy polifenyloalaniny. Zaobserwowano ponadto, że przeciwciała względem rybosomalnego białka S15 z wątroby szczura inhibuje syntezę polifenyloalaniny w układzie rybosomów z zarodków pszenicy (6). Fakt ten sugeruje wysoki stopień podobieństwa strukturalnego białka rybosomalnego S15 z zarodków pszenicy i wątroby szczura (a co najmniej jego fragmentu odpowiedzialnego za aktywność immunologiczną). Nie wykryto natomiast efektu inhibitorowego przeciwciał względem następujących białek: S1, S2, S16 i S23 (5,7).

Istotną cechą struktury rybosomów jest występowanie wszystkich białek rybosomalnych, lub przynajmniej ich fragmentów, na powierzchni rybosomu. Stwierdzenie to wynika z obserwacji, iż wszystkie białka rybosomalne dają pozytywny wynik reakcji immunologicznej. W laboratorium H. Bielki dokonano lokalizacji niektórych białek rybosomalnych z wątroby szczura za pomocą techniki immunomikroskopii elektronowej (z j. ang. *immuno-electron microscopy*). Rycina 1 przedstawia położenie białek S1, S2 i S16 na modelu mniejszej podjednostki rybosomalnej (8 i prace tam cytowane).

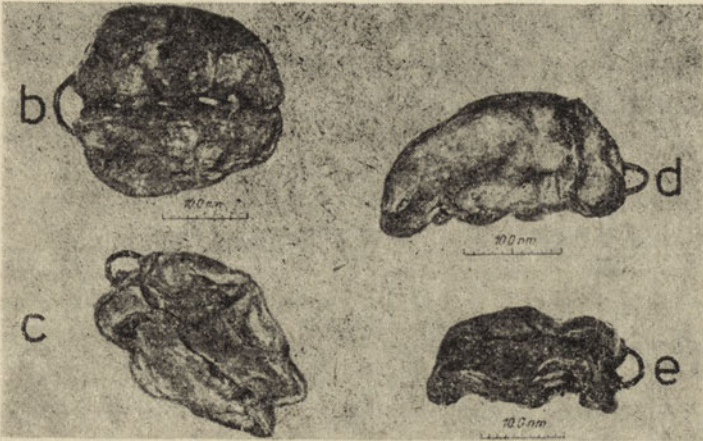
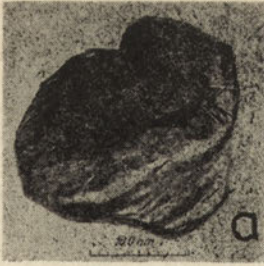


Ryc. 1. Lokalizacja białek rybosomalnych S1, S2 i S16 na podstawie immunomikroskopii elektronowej kompleksu podjednostka 40S — przeciwciała (wg 8).

Kolejne ujęcia przedstawiają podjednostkę w różnych rzutach

Znakowanie powinowactwa (z j. ang. *affinity labelling*) umożliwia identyfikację szeregu białek rybosomalnych znajdujących się w centrach aktywnych rybosomu, jak np. w centrum transferazy peptydylowej, miejscu aminokwasowym A lub też peptydylowym P. Przy zastosowaniu radioaktywnego kwasu 2-nitro-4-azydo-benzoowego (NAB) przyłączonego do fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA) stwierdzono jednoznacznie występowanie w centrum transferazy peptydylowej białka L10 oraz prawdopodobnie białek L7 i L23/23a (9). Oznaczenie polegało na uformowaniu kompleksu NAB-Phe-tRNA-rybosom-poliU, a następnie wytworzeniu w nim wiązania kowalentnego poprzez naświetlenie promieniowaniem nadfioletowym. Wiązanie kowalentne powstaje w tych warunkach pomiędzy radioaktywnym NAB a pobliskim białkiem rybosomalnym. Analiza techniką dwukierunkowej elektroforezy żelowej umożliwia identyfikację tych białek, które ulegają związaniu z grupą radioaktywną.

Przy zastosowaniu radioaktywnej NAB-puromycyny za pomocą tej techniki stwierdzono przyłączanie znacznika wyłącznie do białek większej podjednostki, przede wszystkim do białek L28/29 i w nieco mniejszym stopniu do L4, L10, L6 i L24



Ryc. 2. Model rybosomu eukariotycznego na podstawie prac nad rybosomem z wątroby szczura. (wg 12).

a) podjednostka 60 S, Pozostałe rysunki przedstawiają kolejno po 2 ujęcia z różnych stron: b, c) podjednostka 40 S w konformacji P, d, e) podjednostka 40 S w konformacji O, f, g) rybosom 80 S w konformacji O, h, i) rybosom 80 S w konformacji P Na rysunku zaznaczono skalę schematów oraz naniesiono model cząsteczki tRNA

(10). Natomiast stosując N-bromoacetylopuromycynę wykryto włączenie radioaktywności do białek L27 i L29 (11). Powyższe dwa znaczniki wykazują podobne powinowactwo wobec białek, odmienne są jednak odległości ich centrów aktywnych. NAB może reagować na odległość 8 Å, a grupa bromoacetalowa — 3,5 Å.

Eksperymenty z zastosowaniem wymienionych znaczników oraz przeciwciał umożliwiły zlokalizowanie szeregu białek w centrach aktywnych rybosomu; dane te zebrano w tabeli 1.

Tabela 1

Funkcja i lokalizacja wybranych białek rybosomalnych (wg 8).

Funkcja — region	białka rybosomalne
centrum transferazy peptydylowej	L4, L6, L10, L21, L24, L27, L28, L29
wiązanie Met-tRNA _F i miejsce P	S2, S3, S9, S15, S18
synteza poli — Phe w systemie poli — U	L10, L17, L23/23a, S9, S12, S15

W laboratorium H. Bielki opracowany został ogólny model rybosomu (głównie w oparciu o dane z mikroskopii elektronowej) (8, 12 i prace tam cytowane).

Większa podjednostka rybosomalna (60S) przypomina swym ogólnym kształtem fotel czy też ścięty pień drzewa (z. j. niem. *Kegelstumpfe*) (Ryc. 2a). Na płaskiej powierzchni znajduje się głębokie wgłębienie, bruzda, którą zajmuje mniejsza podjednostka — 40S. Podjednostka ta składa się z dwóch części połączonych ze sobą, geometrycznie sobie odpowiadających i występujących w dwóch skrajnych konformacjach: — konformacji P (z j. ang. *prolate*), o strukturze zwartej, owalnej (Rys. 2 b, c), — konformacji O (z j. ang. *oblate*), o strukturze rozwartej, płaskiej (Rys. 2 d, e).

W związku z różnymi konformacjami mniejszej podjednostki również rybosom jako całość może występować w dwóch granicznych strukturach:

— konformacji O (rys. 2 f, g),

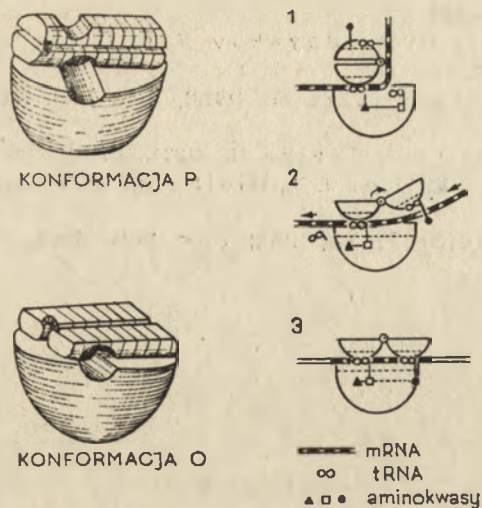
— konformacji P (rys. 2 h, i).

Warto zauważyć, że ostatnie opublikowane dane Boublika dotyczące struktury rybosomu z *Arthemiasalina* bardzo przypominają model Bielki w konformacji O (13).

Rozwinięciem koncepcji występowania rybosomu w dwóch konformacjach uczestniczących w procesie biosyntezy białka jest przedstawienie dynamicznego modelu rybosomu zilustrowanego na rys. 3.

W przebiegu translacji każdy cykl wydłużania łańcucha peptydowego o jeden aminokwas jest związany z przemianami dynamicznymi rybosomu: z przejściem konformacyjnym P→O (zwanym przez autorów „*rack*”) oraz z przejściem O→P (tzw. „*roll*”). Proces biosyntezy łańcucha peptydowego związany ze zmianami konformacyjnymi jest schematycznie przedstawiony na Rycinach 3—1, 3—2 i 3—3. Rycina 3—1 ilustruje rozpoznanie właściwego kodonu mRNA oraz transport AA-tRNA do miejsca biosyntezy. Kolejny AA-tRNA przyłącza się do większej podjednostki w trakcie zmiany konformacji (Ryc. 3—2). Wytwarzane jest wówczas pomiędzy obu podjednostkami centrum reakcji syntezy wiązania peptydowego. Po syntezie wiązania peptydowego (Rys. 3—3) układ powraca do poprzedniej konformacji, następuje przesunięcie mRNA i cykl może się powtórzyć.

Przedstawiony model rybosomu eukariotycznego wydaje się jednocześnie i atrakcyjny i budzący pewne wątpliwości. Podstawę eksperymentalną przedstawionej koncepcji stanowią zdjęcia mikroskopii elektronowej, których interpretacja jest trudna i często kontrowersyjna. Założone zmiany konformacyjne w trakcie procesu



Ryc. 3. Schemat działania dynamicznego modelu rybosomu eukariotycznego (wg 12) 3—1) przyłączenie AA-tRNA, 3—2) przesunięcie kolejnego AA-tRNA z miejsca A do P, 3—3) synteza wiązania peptydowego

translacji wymagałyby niewątpliwie bardzo dużego nakładu energetycznego. Na dyskutowanym etapie ta kwestia nie jest w ogóle analizowana. Zasadniczą zaletą i nowością koncepcji jest uwzględnienie możliwości dynamicznych zmian molekuly rybosomu. Dotychczas przedstawiane modele zakładały stan statyczny tej cząsteczki. Przyjęcie zmian dynamicznych rybosomu umożliwiłoby pełnienie przez niego pewnych, bliżej w chwili obecnej nie sprecyzowanych, funkcji kontrolnych procesu biosyntezy.

T. Twardowski
 J. Pulikowska

PISMIENICTWO

1. Bielka H., Stahl J., (1978), *Internat. Rev. Biochem.*, **18**, 79—188.
2. Stöffler G., Wittmann H. G., (1977), w *Molecular Mechanism of Protein Biosynthesis*, red. Weissbach H., Pestka S., str. 117—202, Acad. Press, New York.
3. McConkey E. H., Bielka H., Gordon J., Lastick S. M., Lin A., Ogata K., Reboud J.-P., Traugh J. A., Traut R. R., Warner J. R., Welfe H., Wool J. G., (1979), *Molec. Gen. Genet.*, **169**, 1—6.
4. Behlke J., Theise H., Noll F., Bielka H., (1979), *FEBS Letters*, **106**, 223—225.
5. Theise H., Noll F., Bielka H., (1978), *Acta Biol. Med. Germ.*, **37**, 1353—1362.
6. Stahl J., Noll F., Twardowski T., dane niepublikowane.
7. Bielka H., Bommer U. A., Gross B., Lutsch G., Noll F., Westermann P., (1979) XI International Congress of Biochemistry, Toronto, (1979), komunikat nr 2-H15.
8. Bielka H., Noll F., Welfe H., Westerman P., Bommer U. A.,

- Gross B., Goerl M., Henkel B., (1978), XII FEBS Meeting, Dresden, *Gene Function*, **51**, 387—399.
9. Stahl J., Bohm H., Pozdnyakov V. A., Girschovich A. S., (1979), *FEBS Letters*, **102**, 272—276.
 10. Böhm H., Stahl J., Bielka H., (1979), *Acta Biol. Med. Germ.*, **33**, 1447—1452, (w druku).
 11. Stahl J., Dressler K., Bielka H., (1974), *FEBS Letters*, **47**, 167—170.
 12. Damaschun G., Müller J. J., Bielka H., (1975), *Acta Biol. Med. Germ.*, **34**, 229—239.
 13. Boublik M., Hellman W., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2829—2833.

**Zebrania naukowe w Oddziałach Polskiego Towarzystwa Biochemicznego
w 1979 roku**

BIAŁYSTOK

Doc. dr hab. Z. Schneider (Poznań): Funkcje biologiczne witaminy B₁₂

Doc. dr hab. R. Lorenc (Warszawa): Współczesne poglądy na homeostazę wapnio-
wo-fosforanową

Doc. dr hab. L. Jaroszewicz (Białystok): Biochemiczne i kliniczne aspekty bio-
syntezy hormonów tarczycy

W. Łopaczyński (Białystok): Białka rybosomowe organizmów eukariotycznych

GDAŃSK

Prof. E. J. Davis (Indianapolis, USA): Anaplerotic reactions in muscle, and inter-
organ collaboration

KATOWICE

Mgr E. Kalinowska (Gliwice): Mutageneza i karcinogeneza

Prof. L. Stevens (Stirling, W. Brytania): The role of polyamines in the control
of macromolecular biosynthesis

KRAKÓW

Dr Z. Wasylewski (Kraków): Fizyko-chemiczne badania oddziaływań białek z de-
tergentami

Prof. dr A. Koj (Kraków): Synteza i metabolizm osoczowych inhibitorów proteaz

Dr S. Kahl (Kraków): Wpływ fluorków na czynność tarczycy

Prof. dr W. Ostrowski (Kraków): Sprawozdanie z XI Kongresu Biochemicznego
w Toronto

LUBLIN

Prof. dr D. Rożynkowa (Lublin): Konstruowanie map genomu człowieka

Prof. J. Morrow (Lubbock, USA): Regulation of gene function

Dr L. Kiss (Debrecen, Węgry): The role of carbohydrate part in emulsin beta-
glucosidase enzyme

Dr Z. Józwiak (Lublin): Biologiczne i lecznicze właściwości kitu pszczelego

Dr R. Russa (Lublin): Badania nad strukturą lipidu A u *Rhizobium*

Dr N. Grankowski (Lublin): Regulacja biosyntezy białka w retikulocytach kró-
liczych

ŁÓDŹ

Dr K. Lipecka (Łódź): Oznaczanie ATP w mózgu metodą lucyferazową

Dr M. Michalska (Łódź): Wpływ rtęci na proces krzepnięcia krwi

Dr R. Górny (Łódź): Wpływ dwusiarczku węgla na procesy biochemiczne zależne od witaminy B₆

Dr A. Żelazowski, dr J. Szymańska, dr C. Cierniewski (Łódź): Immunologiczne właściwości niskocząsteczkowych białek wiążących metale ciężkie w wątrobie i nerwach

Dr S. Bielecki (Łódź): Drobnoustrojowe enzymy lityczne i ich zastosowanie

OLSZTYN

Dr H. Kostyra (Olsztyn): Struktura i dynamika centrum aktywnego enzymu

Prof. dr J. Załęski (Olsztyn): Procesy enzymatyczne w przetwórstwie żywności

Doc. dr hab. Z. Przeździecki (Olsztyn): Metabolizm związków toksycznych w organizmach żywych

POZNAŃ

(Tytułów wykładów nie podano)

SZCZECIN

Dr M. Kęsik (Szczecin): Molekularny mechanizm działania hormonów

Dr S. Zajączek (Szczecin): Indukowane aberacje chromosomów w komórkach somatycznych

Mgr T. Rogala (Szczecin): Metabolizm wybranych rozpuszczalników organicznych u ludzi

Dr M. Koćwin-Podsiadły (Szczecin): Testy biochemiczne jako wczesny wskaźnik przyszłej użytkowości mięsnej trzody chlewnej

Prof. A. N. Klimov (ZSRR): Lipids and lipoproteins in newborns, adults and long-livers

Dr U. Nowotko (Szczecin): Zadania i wyposażenie nowoczesnego laboratorium klinicznego

Doc. dr hab. K. Wysocka (Szczecin): Choroby z immunoagresji

Mgr K. Chrzanowska (Szczecin): Rola oznaczeń enzymatycznych w diagnostyce ostrej fazy zawału mięśnia sercowego

TORUŃ

Mgr S. Kowalczyk (Toruń): Niektóre aspekty przemiany energii na poziomie błon plazmatycznych w świetle badań Mitchella i Boyera.

Dr R. Skórko (Gdańsk): Zmiana czynności biologicznej białek w wyniku modyfikującego wpływu reszt ADP-rybozylowych

Doc. dr hab. J. Kwiatkowska-Korczak (Wrocław): Fosforylacja jako mechanizm regulacji metabolizmu

WARSZAWA

Prof. A. Wollenberger (Berlin, NRD): Membrane-bound phosphoproteins and regulation of cardiac contraction.

Prof. dr L. Wojtczak (Warszawa): Teoria chemiosmotyczna Mitchella

Doc. dr hab. M. Fikus (Warszawa): Enzymy restrykcyjne

Doc. dr P. Węgleński (Warszawa): Zastosowanie enzymów restrykcyjnych

Doc. dr hab. H. Wehrowa (Warszawa): Lipoproteidy osocza a regulacja ilości cholesterolu w komórkach

Doc. dr hab. K. Madaliński (Warszawa): Badania odporności humoralnej i komórkowej u dzieci.

Dr D. Pieniżkowa (Warszawa): Badania wad metabolicznych uwarunkowanych genetycznie

Prof. dr L. Wojtczak, dr Z. Grabarek, mgr M. Nałęcz (Warszawa): Sprawozdanie z Międzynarodowego Kongresu Biochemicznego w Toronto

Prof. J. C. Loper (USA): Aspects of environmental mutagenesis residues of drinking water

Prof. dr L. Piekarski (Warszawa): Mechanizmy aktywacji kancerogenów

Doc. dr hab. I. Pietrzykowska (Warszawa): Mechanizmy mutagenezy i naprawy DNA

Doc. dr hab. J. Koziorowska (Warszawa): Mechanizmy transformacji nowotworowej na poziomie komórkowym

WROCLAW

Dr E. Izbicka (Wrocław): Kinetyka i termodynamika reakcji α -chymotrypsyny z cyklicznymi estrami

Doc. dr hab. W. Hendrich (Wrocław): Nowe poglądy na fosforylacje fotosyntetyczne

Prof. J. N. BeMiller (USA): Biochemistry of ageing in plant tissues

Prof. A. Jacobs (Cardiff): The biology of ferritin and its clinical significance

Prof. dr W. Mejbaum-Katzenellenbogen (Wrocław): Osiągnięcia biochemii wrocławskiej

Doc. dr hab. A. Polanowski, doc. dr hab. T. Wilusz (Wrocław): Naturalne inhibitory serynowych proteaz, ich struktura i funkcja

Prof. dr A. Szewczuk (Wrocław): Immobilizowane enzymy

RECENZJE

Stand und Fortschritte der Methoden in der Experimentellen Medizin

Red. K. Lohman

Seria Ergebnisse der Experimentellen Medizin, t. 32

VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1978, Berlin, str. 120, cena 29 M.

Bardzo interesująca książka, zarówno z merytorycznego jak i redakcyjnego punktu widzenia. Zaczniemy od tego drugiego. 120 stron druku rozszerzone jest dodatkowo o 200 stron zawarte na 4 mikro-fiszach przeznaczonych do odczytywania w specjalnym zunifikowanym czytniku, którego egzemplarz znajduje się np.: w Głównej Bibliotece Lekarskiej. Oszczędność papieru znakomita. Tekst drukowany spełnia podwójną rolę: albo jest rozszerzeniem pełnego tekstu zawartego w mikro-fiszach albo jest pełnym referatem.

Stanowiskiem wyjściowym wydawnictwa jest interdyscyplinarność biochemii, której metodyka znajduje się u podłoża bardzo różnych dyscyplin specjalistycznych, mówiących „różnymi językami” jednak pracujących w oparciu o jednolite zasady doświadczalno-biochemiczne i metodyczne.

Wszystkie artykuły są po niemiecku, jeden po angielsku.

Przedmiotowo materiał podzielony jest na osiem grup: rozdział i charakterystyka organelli komórkowych — mitochondria, lizozomy, synaptosomy, biochemiczne metody rozdziału — chromatografia powinowactwa, rozdział kwasów nukleinowych — aminokwasów, metody fizykalne stosowane w nowoczesnej medycynie — dyfrakcji rentgenowskiej, EMR, NMR, ultrawirówka, dichroizm cyrkularny — metody skanningowe, tomografia całego ciała — ultradźwięki, hodowle tkanek i ich znaczenie dla diagnostyki i leczenia, metody histo- i immunochemii komórkowej, systemowa organizacja chemii klinicznej i diagnostyki laboratoryjnej — postępy w diagnostyce enzymatycznej, biotelemetria, sprawność czynnościowa i jej ocena.

Recenzja książek czy artykułów metodycznych o charakterze multidyscyplinarnym jest bardzo trudna i niewdzięczna. Niezainteresowany odrzuca je, zainteresowany musi wejść w szczegóły, woli więc tekst niż streszczenie.

Istnieje jednak pewna grupa badaczy, tzw. integracjonistów, ustawionych zwykle na styku różnych dyscyplin, którym konieczne jest dobre, bardzo dobre rozeznanie w istotach metody. Ta właśnie wiedza jest podstawą ich interdyscyplinarnej działalności.

Jako specjalista w dziedzinie patobiochemii, diagnostyki laboratoryjnej i wybranej specjalności klinicznej, książkę tę przeczytałem bardzo uważnie i z dużym pożytkiem. Artykuły pisane są przez znakomitych specjalistów w swych dziedzinach. Niektóre noszą charakter wybitnie prospektywny, np.: artykuł prof. Haschena, co podnosi jeszcze bardziej ich wartość.

Sprawdziłem też w Głównej Bibliotece Lekarskiej przydatność posługiwania się czytnikiem. To wygodna forma zdobywania informacji ale... traci się domowo-gabineutową intymność czytania.

L. Tomaszewski

The Biochemical Genetics of Man

Red. Brock D. J. H., Mayo O.

Academic Press, 1978, London, New York, San Francisco, str. 832, cena 30 £.

Oceniana książka stanowi II wydanie (I ukazało się w roku 1972) znanego europejsko-australijskiego dzieła poświęconego biochemicznej genetyce człowieka.

Od I do II wydania wzrosła liczba stron prawie o 100, wzrosła znacznie liczba cytowanych źródeł piśmienniczych, doprowadzono piśmiennictwo mniej więcej do roku 1976, wzrosła ponad trzykrotnie również i cena.

Zbiorowe dzieło pod redakcją Brocka i Mayo powstało jako próba stworzenia czegoś szerszego, aniżeli znakomita książka Harrisa, a zarazem czegoś szczuplejszego i mniej zorientowana w kierunku patologii aniżeli znane dzieło zbiorowe pod redakcją Stanbury'ego i wsp.

Redaktorzy oparli się o współpracę z badaczami europejskimi i australijskimi; jedyny autor, który w obecnym wydaniu podaje swój adres na zachodniej półkuli, prof. Fraser — jest z pochodzenia i przyzwyczajenia Europejczykiem.

Książka składa się z 3 zasadniczych części. Pierwsza z nich zajmuje się genetycznymi podstawami zmienności i w niej przedstawione są współczesne poglądy na budowę i czynność białek, zależność pomiędzy genami a białkami i na regulację ekspresji genów oraz związek między chromosomami a zmiennością białek.

Część druga poświęcona jest zmienności „normalnej” i zawiera szereg informacji, dotyczących zarówno biochemii, jak i genetyki populacyjnej. W części genetycznej uwagę zwracają szczególnie informacje dotyczące polimorfizmu, selekcji i ewolucji, a także informacje dotyczące nowszych badań nad sprzężeniem genowym i oceną odległości genetycznych. W dziale biochemii szczegółowo przedstawiona jest zmienność w zakresie enzymów, białek osocza, antygenów grupowych krwi oraz antygenów leukocytarnych.

Część trzecia dotyczy zmienności „patologicznej”. W poszczególnych rozdziałach omówiono problematykę wrodzonych wad metabolizmu, hemoglobinopatii, immunoglobulinopatii oraz zaburzeń krzepnięcia.

Książkę kończy inteligentny esej Fräsera o niezbadanych chorobach mendlowskich. Książka zawiera bardzo dużo nowej informacji, stanowi ambitną próbę unowocześnienia zarówno strony faktycznej, jak i koncepcyjnej naszych poglądów na biochemiczne aspekty genetyki człowieka. Próba to udana tylko częściowo. Układ książki jest niezwykle logiczny, wykład jest na ogół jasny, informacja przedstawiona jest w sposób pełny i przejrzysty. Mimo to książka jest bardzo przekonywującym dowodem na rzecz tezy, że nowsze informacje w zakresie genetyki współczesnej doprowadziły wprawdzie do podważenia wielu przejrzystych paradygmatów, ale nie pozwoliły jeszcze na stworzenie nowej syntezy. Szczególnie widowym przykładem tego jest sytuacja w dziedzinie naszych poglądów na regulację genetyczną czy zagadnienie związku między chromosomami a białkami. Nie jest to oczywiście zarzut pod adresem autorów. Książka jest po prostu zwierciadłem naszej wiedzy i dlatego

sądzę, że książka stanowi cenne świadectwo sytuacji w dziedzinie genetyki biochemicznej człowieka. Jest to ponadto wartościowe źródło informacji, interesujące zarówno dla biochemików, biologów, jak i lekarzy i myślę, że podobnie jak I wydanie odegra bardzo pozytywną rolę.

I. Wald

KOMUNIKAT

Na podstawie decyzji Władz Polskiej Akademii Nauk, Komitet Biochemii i Biofizyki PAN oraz Komitet Mikrobiologii PAN powołał Zespół d/s Bezpieczeństwa Badań Metodami Inżynierii Genetycznej w składzie:

Przewodniczący — prof. dr Z. Lorkiewicz, UMCS Lublin
Członkowie — prof. dr W. Gajewski, UW Warszawa
— doc. dr M. Fikus, IBB Warszawa
— doc. dr S. Kałużewski, PZH Warszawa
— doc. dr W. Magdziak PZH Warszawa
— doc. dr A. Piekarowicz, UW Warszawa
— doc. dr P. Węgleński, UW Warszawa

Zespół będzie współpracował z Komitetem Mikrobiologii PAN.

W Polsce podjęto ostatnio badania nad klonowaniem genów przy użyciu technik rekombinowania DNA *in vitro*. Badania te winny być prowadzone w sposób zapewniający ich pełne bezpieczeństwo. Zadaniem więc Zespołu jest opracowanie, w oparciu o doświadczenia krajowe i zagraniczne, odpowiednich przepisów dotyczących bezpieczeństwa tych badań.

Do czasu jednak opracowania i wprowadzenia w praktykę badawczą tych przepisów Zespół będzie:

1. oceniał projekty badań, które mają być wykonywane metodami inżynierii genetycznej z punktu widzenia potencjalnego zagrożenia, jakie mogą one stanowić dla człowieka i środowiska,

2. zalecał takie zmiany w zaplanowanych badaniach z w.w. zakresu lub w warunkach ich prowadzenia, które by to zagrożenie w jak największym stopniu ograniczały.

W związku z tym Komitet Biochemii i Biofizyki PAN, Komitet Mikrobiologii PAN, Polskie Towarzystwo Biochemiczne, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, Polskie Towarzystwo Genetyczne, Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych zwracają się do wszystkich instytucji naukowych i gospodarczych oraz do wszystkich pracowników nauki w kraju o zgłaszanie na adres Zespołu projektów badań, w których stosowane mają być metody inżynierii genetycznej.

Informacje o projektach tych badań winny zawierać następujące dane:

a) Nazwa i adres placówki, nazwiska, imiona, stopnie naukowe kierownika i pozostałych wykonawców badań;

b) Cel badań;

c) Pochodzenie klonowanego DNA, rodzaj wektora i organizmu, w którym będzie klonowany hybrydowy DNA;

d) Przewidywane metody badawcze;

e) Warunki lokalowe i wyposażenie laboratorium w zakresie dotyczącym bezpieczeństwa planowanych badań;

f) Projektowane kontrole bezpieczeństwa przebiegu badań;

g) Przewidywane wykorzystanie i posługiwanie się uzyskanymi hybrydami.

Informacje należy kierować na adres:

prof. dr Zbigniew Lorkiewicz
Instytut Mikrobiologii UMCS
20-033 Lublin, Akademicka 19

Jeśli nie będą potrzebne dodatkowe dane lub badania kontrolne, oceny będą przygotowane w terminie nie dłuższym niż 1 miesiąc.

Biorąc pod uwagę absolutną konieczność zapewnienia całkowitego bezpieczeństwa badań z zakresu inżynierii genetycznej i wysokie poczucie naukowej i społecznej odpowiedzialności polskich uczonych i instytucji badawczych, liczymy na pełne podporządkowanie się zaleceniom zawartym w tym komunikacie.

Przewodniczący Komitetu
Biochemii i Biofizyki PAN
prof. Włodzimierz Ostrowski

Prezes
Polskiego Towarzystwa
Biochemicznego
Prof. Lech Wojtczak

Prezes
Polskiego Towarzystwa
Nauk Weterynaryjnych
prof. Edmund Prost

Prezes
Polskiego Towarzystwa
Genetycznego
prof. Lucjan Wiśniewski

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologii
prof. Władysław Dobrzański

Prezes
Polskiego Towarzystwa
Mikrobiologicznego
prof. Józef Kubica

Prezes
Polskiego Towarzystwa
Epidemiologów i Lekarzy
Chorób Zakaźnych
doc. Andrzej Gajda

Prof. dr Z. Lorkiewicz

Redaktorzy Tomu przepraszają Autorów i Czytelników za spóźnione ukazanie się 3 zeszytu tomu 26 (1980) Postępów Biochemii i spodziewają się, że zeszyt 4 tegoż tomu ukaże się z mniejszym opóźnieniem.

POSTĘPY BIOCHEMII

SEPTEMBER 1980

ARTICLES IN POLISH

Volume 26

Number 3

Professor Dr. Irena Mochacka 1905—1979 (<i>Obituary note</i>)	257
Molecular Properties of Antianemic Factor — 50th Years of Research (W. Ostrowski)	259
J. Kuźnicki, W. Drabikowski — Calmodulin — Activator of Ca^{2+} — Re- gulated Processes (Dept. Biochem. Nerv. System and Muscle, Nencki Insti- tute of experimental Biology, Pol. Acad. Sci., Warszawa)	265
R. Farbiszewski, H. Gabryel — Role of Arginine Residues in Biological Function of Peptides and Proteins (Dept. Inorganic Chemistry, Inst. Chem., Biophys. School of Medicine, Białystok)	291
Z. Żak — Disulphide Bounds in the Structure and Function of Proteins (Dept. Animals Biochem., Inst. Mol. Biol., Jagiellonian Univ., Kraków)	313
Z. Żak — Physical Methods Applied in the Study of Disulphide Bound Geo- metry (Dept. Animals Biochem., Inst. Mol. Biol., Jagiellonian Univ., Kra- ków)	329
A. Stasiak — Restriction Enzymes I. Mechanisms of Action of Type II Rest- riiction — Modification Systems (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	343
A. Stasiak — Restriction Enzymes II. Mechanisms of Action of Type I and III Restriction — Modification Systems (Inst. Biochem. Biophys., Pol. Acad. Sci., Warszawa)	369
R. Winter, D. Piskorska — Glyoxalase Enzyme System (Dept. Biochem., Silesian School of Medicine, Zabrze)	389
B. Rzeszotarska, I. Zozłowska — Structure and Function of Luliberin (Inst. Chem. Pedagogical Univ., Opole)	411
M. A. Konecka — Enkephalins — Biologically Active Compounds of Central Nervous System (Inst. Genetics and Animal Breeding, Pol. Acad. Sci., Ja- strzębiec)	443
J. J. Bujarski — Mechanisms of Plant Resistance Against Virus Infection (Inst. Plant Genetics, Pol. Acad. Sci., Poznań)	477
News in Biochemistry	499
Book reviews	509
Announcement	512

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 ołówkiem) nazwiskiem pierwszego autora i początkowymi wyrazami tytułu pracy.

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

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

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

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

Profesor dr Irena Mochnacka	257
Molekularne właściwości czynnika przeciwanemicznego — 50-lecie rozpoczęcia badań — (W. Ostrowski)	259
J. Kuźnicki, W. Drabikowski — Kalmodulina — aktywator procesów regulowanych przez jony wapnia	265
R. Farbiszewski, H. Gabriel — Znaczenie reszt arginylowych dla funkcji biologicznej peptydów i białek	291
Z. Żak — Rola wiązań dwusiarczkowych w strukturze i funkcji białek	313
Z. Żak — Badania geometrii wiązań dwusiarczkowych za pomocą metod fizycznych	329
A. Stasiak — Enzymy restrykcyjne. I. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu II	343
A. Stasiak — Enzymy restrykcyjne. II. Mechanizmy działania systemów restrykcyjno-modyfikacyjnych typu I i III	369
R. Winter, D. Piskorska — Enzymy układu glioksalazy	389
B. Rzeszotarska, I. Kozłowska — Struktura i funkcja luliberyny	411
A. M. Konecka — Enkefalininy — aktywnie biologiczne związki ośrodkowego układu nerwowego	443
J. J. Bujarski — Mechanizmy odporności roślin na zakażenie wirusowe	477
Nowe w biochemii	499
Model rybosomu eukariotycznego (T. Twardowski, J. Pulikowska)	499
Z życia PTBIOCH	505
Recenzje książek	509
Ergebnisse der Experimentellen Medizine, t. 32	509
The Biochemical Genetics of Man	510
Komunikat	512